



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**EFFECTOS DE LA MODULACIÓN
COLINÉRGICA Y LA
ADMINISTRACIÓN DE R-(+)-8-OH-
DPAT SOBRE LA EVITACIÓN
INHIBITORIA A LO LARGO DEL
CICLO VITAL EN RATONES**

DOCTORADO DE NEUROCIENCIAS

Alumno: Encarnación Rama Galdón

Director/tutor: Santiago Monleón Verdú

Al Dr. Andrés Parra, mi
mentor y amigo, por su confianza
y lucha, por su transmisión de
conocimiento y valores. Sé que
estarías orgulloso

In memoriam

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Santiago Monleón, mi director, por su ayuda y apoyo en los últimos tiempos. Porque pese a las circunstancias ha adoptado con mucha profesionalidad el papel de tutelarme esta tesis.

A la Dra. Concha Vinader, por su ánimo, cariño y opinión cuando la he necesitado.

A Arancha, por su ayuda desde el principio, por ser compañera y amiga, por sus reflexiones y su manera de motivarme, por ser mi hombro tantas veces.

A mis padres, por haberme enseñado a ser lo que soy, por haberme apoyado en este proyecto pese a las circunstancias. Con una mención especial a mi madre por estar siempre ahí para escucharme y animarme a seguir.

A Juan, mi novio, por su paciencia y ánimo, por su comprensión y empatía. Pocos hubieran aguantado.

Al Dr. Jorge Luis Arias y su equipo de la Universidad de Oviedo por darme la oportunidad de aprender en mi estancia en su laboratorio. Al Dr. Vicent Teruel por compartir conmigo su conocimiento al permitirme realizar una estancia en su laboratorio y por su paciencia.

A mi prima Amparo por motivarme a distancia para ser la primera “Doctora” de la familia. A mis amigos por estar siempre ahí para escuchar mis discusiones científicas.

A todos MUCHÍSIMAS GRACIAS porque sin vuestra colaboración de distintas maneras esta tesis no hubiera sido posible.

Encarna Rama Galdón.

1. Introducción..... 05

PARTE TEÓRICA

2. Memoria 13

2.1. Introducción 15

2.2. Clasificación de la memoria..... 16

2.3. Anatomía del aprendizaje y la memoria 24

3. Evitación inhibitoria..... 33

3.1. Introducción 35

3.2. Modalidades de evitación inhibitoria 37

3.3. Neurobiología de la evitación inhibitoria..... 43

3.4. Sistemas de neurotransmisión en evitación inhibitoria 49

4. Evitación inhibitoria y antidepresivos 57

4.1. Introducción 59

4.2. Antidepresivos..... 64

4.3. Antidepresivos y memoria 68

PARTE EXPERIMENTAL

5. Objetivos e hipótesis 87

**6. Efectos de administración de escopolamina y R-8-OH-
DPAT en evitación inhibitoria de ratones prepuberales
Harlan (Experimento 1)..... 97**

6.1. Introducción 99

6.2. Material y método	100
6.3. Resultados	106
6.4. Discusión	111
7. Efectos de administración de escopolamina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones pospuberales Harlan (Experimento 2).....	115
7.1. Introducción	117
7.2. Material y método	119
7.3. Resultados	121
7.4. Discusión.....	126
8. Efectos de la administración de escopolamina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones adultos Harlan (Experimento 3).....	133
8.1. Introducción	135
8.2. Material y método	136
8.3. Resultados	139
8.4. Discusión.....	143
9. Evitación inhibitoria en ratones CD-1 de distinta procedencia (Experimento 4)	147
9.1. Introducción	149
9.2. Material y método	152
9.3. Resultados	154
9.4. Discusión.....	158

10. Efectos de la administración de escopolamina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones prepuberales Charles River (Experimento 5)	165
10.1. Introducción	167
10.2. Material y método	169
10.3. Resultados	171
10.4. Discusión.....	173
11. Efectos de la administración de escopolamina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones pospuberales Charles River (Experimento 6)	181
11.1. Introducción	183
11.2. Material y método	185
11.3. Resultados	187
11.4. Discusión.....	192
12. Efectos de la administración de escopolamina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones adultos Charles River (Experimento 7)	197
12.1. Introducción	198
12.2. Material y método	200
12.3. Resultados	202
12.4. Discusión.....	207
13. Efectos de la administración de fisostigmina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones prepuberales Charles River (Experimento 8)	211
13.1. Introducción	213

13.2. Material y método	215
13.3. Resultados	218
13.4. Discusión.....	224
14. Efectos de la administración de fisostigmina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones pospuberales Charles River (Experimento 9)	231
14.1. Introducción	233
14.2. Material y método	235
14.3. Resultados	236
14.4. Discusión.....	241
15. Efectos de la administración de fisostigmina y R-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria en ratones adultos Charles River (Experimento 10).....	247
15.1. Introducción	249
15.2. Material y método	251
15.3. Resultados	254
15.4. Discusión.....	258
16. DISCUSIÓN GENERAL	265
17. CONCLUSIONES.....	283
18. REFERENCIAS.....	289
FINANCIACIÓN	331

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. Introducción

El estado actual de la ciencia todavía no ha logrado descifrar el mecanismo por el cual funcionan muchos fármacos que son de uso común para diferentes dolencias. El desarrollo de los agentes farmacológicos para el tratamiento de los trastornos mentales en multitud de ocasiones ha comenzado de forma accidental encontrando efectos terapéuticos de distintas sustancias para este grupo de enfermedades (e.g. el descubrimiento de la imipramina, un inhibidor de la enzima MAO a partir del tratamiento de la tuberculosis). En Europa, el tratamiento de estos trastornos del sistema nervioso central supone un gasto de 386.000 millones de euros según el “*Cost of disorders of the Brain in Europe*” (Andlin-Sobocki y cols., 2005), y solamente el trastorno depresivo mayor cuenta con una incidencia del 20% de la población adulta, siendo considerada como una enfermedad incapacitante y con una estimación por la Organización Mundial de la Salud como segunda causa de muerte no natural o invalidez para el año 2020 en todo el mundo (Pacher y Kecskemeti, 2004). Aunque el tratamiento de elección para estos pacientes es mediante antidepresivos de diferente composición o mecanismo de acción, todavía sigue sin conocerse totalmente la base bajo la cual se desarrolla el trastorno y la acción farmacológica que explica la no mejoría completa de los síntomas, la no responsividad de entre el 10 y el 30% de los pacientes y la recurrencia a lo largo de su vida de los que sí responden al tratamiento.

En 1972, Janowsky y cols. plantearon la hipótesis de que el sistema colinérgico jugaba un papel central en el origen de los trastornos de ánimo, afirmando que la base de éstos podía residir en los balances entre la acción central de los neurotransmisores acetilcolina y noradrenalina. Según ellos, la depresión, sería la manifestación de una dominancia colinérgica (Howland, 2009). Mucho ha llovido desde entonces, descubriendo diferentes sistemas de neurotransmisión afectados en este trastorno emocional y probando los efectos que la neuromodulación con psicofármacos tiene sobre éstos. Lo que parece claro es que la depresión es un trastorno que cuenta con un patrón de síntomas más o menos amplios, que tiene distintos tratamientos entre los que está el farmacológico y que entre estos síntomas cursa con distintas alteraciones del funcionamiento cognitivo. Una asociación recurrente en la literatura relaciona el trastorno depresivo mayor con un deterioro en el aprendizaje y la memoria (e.g. Contador-Castillo y cols., 2009; Gotlib y Joormann, 2010). Y también son obvios distintos efectos secundarios tanto en humanos como en animales al tratamiento mediante antidepresivos (e.g. Amado-Boccaro y cols., 1995; Riedel y Van-Praag, 1995). Por ello, diferentes autores entre los que se incluye Parra, 2003, plantearon una hipótesis de trabajo en la que se intentó investigar las asociaciones que existen entre los sistemas de neurotransmisión y la memoria y el aprendizaje, suponiendo unos mecanismos neurológicos comunes que promueven un

mal funcionamiento de la neurotransmisión en la depresión que queda grabado o aprendido en nuestro cerebro.

Algunas pruebas de ello que desde los años 70 van apoyando esta hipótesis serían: los hallazgos relacionados con la enfermedad de Alzheimer y la neurotransmisión colinérgica (Bartus, 1981; Deutsch, 1971), las acciones conductuales de los antidepresivos en animales y humanos en pruebas de memoria (Monleón y cols., 2008; Myhrer, 2003), el descubrimiento de las estructuras implicadas en ciertos tipos de memoria (Paizanis y cols., 2007) que también se verían implicados en la depresión y los mecanismos celulares que subyacen a la memoria (McGaugh e Izquierdo, 2000).

Dos de los mecanismos de neurotransmisión más importantes para estos procesos son el sistema colinérgico y el serotoninérgico (Jeltsch-David y cols., 2008; Stancampiano y cols., 1999). Esta tesis tuvo como objetivo investigar la intervención de estos dos sistemas mediante la administración de sustancias moduladoras post-entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras de tres etapas del ciclo vital (pre-puberal, post-puberal y adulta). La mayoría de experimentos de aprendizaje y memoria son realizados en sujetos adultos, contrariamente, en este caso se pretendió observar los efectos que los diferentes fármacos podían tener en la memoria de sujetos en distinto momento vital y de forma global en su desarrollo.

La elección de las sustancias escopolamina, fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT se justifica por la alusión a éstas en la literatura mostrando una influencia en diferentes pruebas de memoria (Myhrer, 2003) y por su gran selectividad para influir en los dos sistemas de neurotransmisión que hemos destacado como relevantes para la memoria en el marco de un grupo de investigación que ha trabajado con distintas sustancias normalmente con uso clínico para el tratamiento de la ansiedad o la depresión con acción farmacológica sobre estos dos sistemas. En este caso las sustancias elegidas no fueron antidepresivos, sino sustancias más específicas sobre cada sistema de neurotransmisión para poder observar los efectos de la manipulación de uno u otro o ambos en combinación. La escopolamina cuenta con un gran apoyo en la literatura como fármaco deteriorante de la memoria en diferentes tareas por ser un anticolinérgico no específico de los receptores muscarínicos presentes en el hipocampo y en otras estructuras cerebrales implicadas en la memoria (para una revisión véase Klinkenberg y Blokland, 2010). La fisostigmina, ha demostrado contrarrestar los efectos de deterioro de memoria en roedores producidos por otros fármacos en algunas dosis por ser un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, que aumenta la disponibilidad de acetilcolina (Jafari-Sabet, 2006; Monleón y cols., 2009) y ha sido utilizada en ensayos clínicos con pacientes de Alzheimer para disminuir los déficits cognitivos debidos a la enfermedad. Por último, el R-(+)-8-OH-DPAT, un agonista serotoninérgico

de los receptores 5-HT_{1A} ha mostrado un poder deteriorante en pruebas de memoria con roedores (e.g. Misane y Ogren, 2000). Todos ellos se administraron a ratones CD1 machos y hembras, para mayor representatividad de la naturaleza, bajo el paradigma de evitación inhibitoria, una prueba de condicionamiento emocional de las más utilizadas en roedores por su rapidez en el procedimiento, rapidez en el aprendizaje de los sujetos y que puede ser testada varios meses después fácilmente y de forma fiable (McGaugh e Izquierdo, 2000). Además esta administración se realizó post-entrenamiento para observar los efectos de los fármacos en la fase de consolidación del aprendizaje y poder separarlos de los efectos no relacionados con mecanismos de aprendizaje (Gold, 2003; Power y cols., 2003).

En los párrafos siguientes se presenta el contenido de los demás capítulos de esta tesis doctoral.

En los primeros capítulos se realizó un resumen de los aspectos más relevantes relacionados con: la memoria y su estudio, la anatomía y los mecanismos de neurotransmisión implicados (Capítulo 2), la evitación inhibitoria y los mecanismos neurales implicados (Capítulo 3) y el estudio de los antidepresivos en la tarea de evitación inhibitoria (Capítulo 4). En el Capítulo 5 se describieron los objetivos e hipótesis que motivaron la realización de esta tesis y los experimentos realizados con los correspondientes resultados alcanzados se

presentaron en los capítulos siguientes (Capítulos del 6 al 15, ambos incluidos).

Estos experimentos versaron en primer lugar sobre la administración de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Experimentos 1-3 y 5-7). Los Experimentos 1 y 5 se realizaron con sujetos pre-puberales, los Experimentos 2 y 6 con sujetos post-puberales y los Experimento 3 y 7 con sujetos adultos, machos y hembras en todos los casos. El Experimento 4 se realizó con sujetos controles, sin tratamiento para observar las diferencias de aprendizaje de la misma tarea de evitación inhibitoria en sujetos de distintos proveedores. Finalmente, los Experimentos 8-10 trataron de observar los efectos de la fisostigmina y el R-(+)-8-OH-DPAT en ratones prepuberales (Experimento 8), post-puberales (Experimento 9) y adultos (Experimento 10), en machos y hembras en todos los casos.

Por último y para concluir, los capítulos 16, 17 y 18 recogen la discusión general, las conclusiones y las referencias bibliográficas consultadas para la realización de esta tesis doctoral.

CAPÍTULO 2: MEMORIA

2.1. Introducción.

Al intentar definir la memoria, a uno le viene al pensamiento algún hecho de su pasado que ha sido importante para sí mismo, un acontecimiento familiar, una persona importante, un lugar... y aunque actualmente sabemos que existen muchos tipos y clasificaciones de lo que llamamos memoria, podríamos afirmar que es un proceso mental superior que ha llamado la atención de muchos y se ha intentado analizar de muy distintas maneras, buscando pistas para interpretar algo tan difícil de explicar. Aun así podemos decir que es algo que nos permite almacenar y casi siempre (que no siempre) recuperar algún tipo de información de diferente naturaleza.

Por ser un fenómeno tan curioso, muchos autores han intentado definir este proceso y estudiarlo cada uno desde una perspectiva distinta. Ya en la antigua Grecia encontramos pensadores que intentaban conceptualizar lo que hoy día entendemos como memoria.

Para Platón la memoria era considerada como una tabla de cera en la que se puede grabar una huella que permanece en el tiempo cuando esta se ha marcado intensamente y para Aristóteles, creador de las leyes del asociacionismo, se seguían unos principios para la recuperación de la información: similaridad, contraste y contigüidad.

Herman Ebbinghaus (1879), fue el primero en estudiar de forma científica un proceso cognitivo tan complejo como la

memoria, midiéndola y realizando experimentos con contenido verbal usando listas de sílabas sin sentido. Abordó el tema del olvido y proponiendo unas leyes aplicables al estudio de este proceso cognitivo de manera objetiva.

William James en su obra clásica “Principios de Psicología” (1932) ya diferenciaba dos tipos de memoria, la primaria y la secundaria. La primaria era frágil y su duración corta y la secundaria era permanente y consistía en la información acerca de hechos pasados en la vida de las personas.

Con críticas al trabajo de Ebbinghaus, por limitarse a un estímulo simplista, por no tener en cuenta actitudes ni el conocimiento previo del sujeto y por no tener aplicación a los aprendizajes de relevancia de la vida cotidiana, Frederick C. Bartlett en su obra “Remembering” (1932) dio su propia definición del recuerdo como proceso esquemático que interpreta los estímulos en base a un conocimiento previo en forma de esquemas o modelos adquiridos por la experiencia vivida.

2.2. Clasificación de la memoria.

En referencia a la taxonomía, clasificación y estadios de la memoria a lo largo de la historia, podemos encontrar diferentes modelos y criterios de clasificación, relacionándola con diferentes tipos de aprendizaje y distintos enfoques de lo que sería el propio proceso en sí, ya que como hemos visto

desde el comienzo del estudio de la memoria han aparecido voces totalmente contrapuestas. Algunas de esas clasificaciones las veremos a continuación.

Memoria a corto plazo / Memoria a largo plazo:

Esta categorización sigue un criterio temporal, es decir, divide la memoria en base al tiempo. La distinción se entiende bajo el punto de vista de la memoria como multialmacén, que defiende la existencia de distintos almacenes de memoria con distintas propiedades y a través de los cuales va pasando la información secuencialmente.

Atkinson y Shiffrin, en 1968, proponen este modelo como forma de estudiar la memoria, describiendo la entrada de información a través de un tercer tipo o almacén de memoria a lo que llamarán memoria sensorial. Después, la información se codifica y almacena por un corto periodo de tiempo en lo que llamará memoria a corto plazo, donde hay un espacio limitado para unidades de información por un tiempo determinado y tras el cual, en ocasiones se trasvasará a un almacén con capacidad y persistencia ilimitadas, es decir, pasará a la memoria a largo plazo.

En la memoria a corto plazo en principio se pensó que la información era almacenada con un formato auditivo-verbal-lingüístico (Atkinson y Shiffrin, 1968; Conrad, 1964), aunque investigaciones posteriores han aportado pruebas a favor de que también podemos encontrar representaciones visuales en ella (Cooper y Shepard, 1973; Posner, 1978).

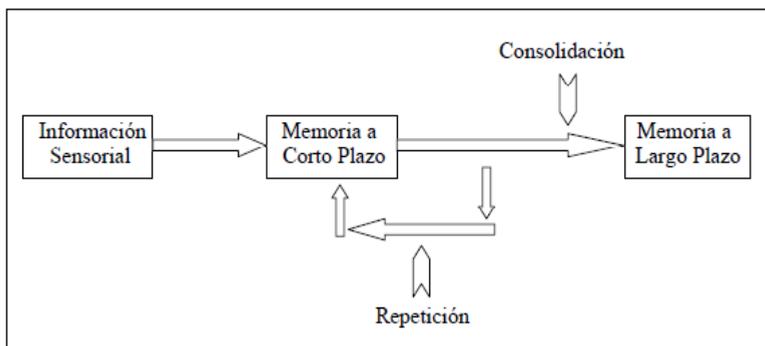


Fig. 2.1. Modelo multialmacén o secuencial. Extraído de Carlson (2014).

Una mención especial requiere lo que actualmente conocemos como memoria de trabajo, ya que algunos la equiparan a lo que hemos llamado memoria a corto plazo del modelo multialmacén y otros la definen como entidad propia entre los dos procesos. Se podría explicar como el almacenamiento temporal de información que necesita mantenerse accesible mientras está siendo procesada y es puesta en funcionamiento en el aprendizaje de habilidades complejas en las que hay un uso simultáneo de distintos tipos de información. Fue definida por Baddeley en 1974 (Wickelgren, 1997; Baddeley, 1998) explicando que con la memoria de trabajo se establecía una conexión entre memoria, percepción y atención con diferentes subcomponentes que interactúan (no almacén unitario) y lo relacionó con lo que hemos llamado memoria a corto plazo aunque con posterioridad algunos autores la han separado de ésta, concibiéndola como una entidad en sí misma incluso

estableciéndola en áreas cerebrales distintas (Barros y cols., 2005; Izquierdo y cols., 2002).

Memoria declarativa o explícita / Memoria no declarativa o implícita:

Esta distinción y clasificación de la memoria se basa en un criterio de contenido de la memoria y normalmente se refiere a tipos de memoria a largo plazo (Vianna y cols., 2000) que se pueden observar en la memoria humana. Ha recibido varios nombres a lo largo de la historia (Squire y cols., 1993; Squire y Zola, 1996).

La memoria no declarativa, implícita o procedimental es la relacionada con los aprendizajes más básicos. Son los recuerdos no conscientes en que se basan nuestros hábitos perceptivos y motores; es automática, consciente y difícil de verbalizar. Mejora con la práctica y con la experiencia e incluye varios tipos de habilidades, los cuales son inconscientes y vienen expresados a través de la ejecución.

Su aprendizaje es lento pero más estable y seguro que en el caso de la memoria declarativa (Squire y Zola, 1996). Se han hecho también varias clasificaciones de los tipos de aprendizaje que incluye, entre los que en primer lugar se diferencia el aprendizaje asociativo del no asociativo. El aprendizaje no asociativo se produce cuando se expone a un sujeto, una o repetidas veces, a un solo tipo de estímulo, adquiriendo experiencia y no teniendo necesariamente una relación temporal. De este tipo son los aprendizajes que se dan

en la vida cotidiana como la habituación y la sensibilización. La habituación es el proceso por el cual una respuesta refleja disminuye ante la presencia repetida de un estímulo inocuo. La sensibilización por el contrario, consiste en la intensificación de una respuesta refleja ante estímulos moderados que sean precedidos de otros intensos o nocivos (Bailey y cols., 1996; Morgado, 1998). Por otra parte, como tercer tipo de aprendizaje no asociativo, encontramos la impronta, fenómeno muy discutido por ser considerado por una parte de la ciencia como conducta de tipo innato (no aprendido) pero que otros definen como forma de aprendizaje no asociativo en la cual algunos animales que nacen en un estado relativamente avanzado (precociales), en los primeros días aprenden a acercarse y a seguir al primer objeto relativamente grande que ven en movimiento (que normalmente es su madre).

El aprendizaje asociativo, por otra parte, se define como el que se produce por relación de varios eventos, un estímulo y una respuesta, una respuesta y sus consecuencias o bien dos o más estímulos entre sí. Aquí podríamos incluir en primer lugar el aprendizaje perceptivo, que es el que permite que un sujeto después de percibir cualquier tipo de estímulo una o varias veces, sea capaz de reconocerlo.

Además, dentro de esta categoría, cabría definir dos de los paradigmas de aprendizaje más estudiados que son el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante o

instrumental (Kandel y cols., 1997). Por una parte, en el condicionamiento clásico, la asociación repetida entre un estímulo originalmente neutro y un estímulo incondicionado que produce una respuesta refleja, hace que el primer estímulo por sí solo produzca la respuesta que en principio era incondicionada y después de esta asociación pase a ser condicionada. Por otra parte, en el condicionamiento instrumental se produce la asociación entre un estímulo y una respuesta, es una forma de aprendizaje más flexible ya que permite que el organismo modifique su conducta en función de las consecuencias de la misma. Esta asociación permite la adquisición inicial y ejecución de los aprendizajes.

Algunos autores, siguiendo con la memoria implícita o no declarativa y el aprendizaje asociativo, incluyen también el aprendizaje de habilidades, de tipo motor o procedimental, que son las destrezas para operar en el mundo (Squire y cols., 1993; Gabrieli, 1998). Aquí incluyen también los hábitos ya que igual que las habilidades se pueden adquirir de forma inconsciente y automática.

Finalmente, encontramos la otra categoría principal de memoria, la memoria explícita, declarativa o relacional, que implica la adquisición, retención y recuperación de conocimientos que puedan ser recordados de forma consciente e intencional (Alvarez y Squire, 1994; Baddeley, 1994; Bailey y cols., 1996; Gabrieli, 1998; Morgado, 1998; Reber y cols., 1996; Squire y Zola, 1996; Thompson y Kim, 1996) y que

pueden verbalizarse a través del lenguaje (declarativa). Esta memoria nos permite ser conscientes de la tarea aprendida, pudiendo describirla si queremos (Thompson y Kim, 1996) pueden ser recordadas por un acto deliberado de evocación (Kandel y cols., 1997), son aprendizajes rápidos pero menos duraderos que los que requieren de la memoria implícita ya que son más flexibles.

Dentro de la memoria declarativa, se pueden distinguir dos tipos (Rolls, 2000): la memoria episódica, que se refiere a la memoria autobiográfica, de los eventos que tuvieron lugar en un determinado contexto espacial y temporal (Duka y cols., 1996; Gabrieli, 1998; Klein, 1994; Squire y cols., 1993), ésta es esencial para orientarse en el tiempo y el espacio; y por otro lado, la memoria semántica, más genérica y hace referencia a los conocimientos que se tienen del mundo (Nyberg y Tulving, 1996).

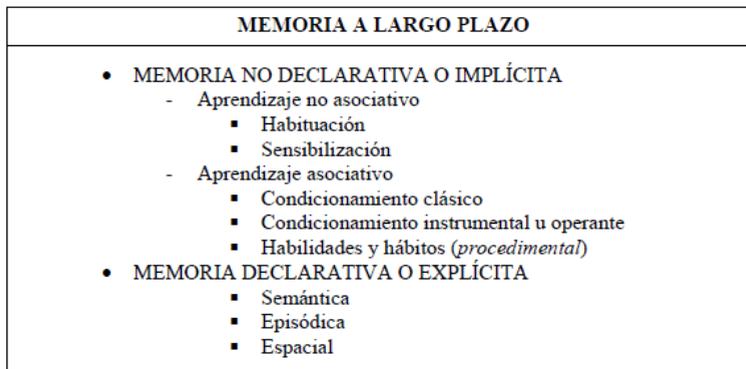


Fig. 2.2. Esquema de clasificación de la memoria a largo plazo.

Además de repasar todos estos tipos de memoria y clasificaciones nos detenemos ahora en los procesos de codificación, consolidación y recuperación, característicos de toda la memoria.

En primer lugar, la información sensorial entra en nuestro sistema nervioso y llega a lo que hemos llamado memoria a corto plazo; esto es el proceso de *codificación* de la información. Después, la información pasará desde el almacén de corto plazo a la de largo plazo en lo que llamaríamos almacenamiento o *consolidación*; y para hacer esta información disponible y recordar lo que se ha almacenado se pondría en marcha el proceso de *recuperación*.

Aparte de éstos, aparecen dos fenómenos más en la memoria que podemos comentar que son el *olvido*, que consiste en la pérdida normal de la información almacenada en la memoria y la *extinción*, que sobretodo hace referencia a los aprendizajes de condicionamiento (memoria no declarativa), en los que la disminución de la intensidad y desaparición gradual de la respuesta previamente condicionada es consecuencia de la presentación repetida del estímulo que nos provocaba la respuesta sin el estímulo incondicionado, o en el caso de una respuesta instrumental, se produce una desaparición de la respuesta por desaparición del refuerzo de ésta.

Estos procesos son importantes porque al analizar el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria nos

detendremos en los distintos componentes o momentos de la memoria para determinar en cuál de ellos estamos influyendo, ya que existen experimentos distintos diseñados para intervenir en los distintos subprocesos.

2.3. Anatomía del aprendizaje y la memoria.

No existe una estructura tan especializada ni un único centro donde se almacene físicamente la información como podría pensarse cuando hemos descrito los procesos mnésicos y el modelo de almacenes de memoria, sino que según han mostrado las investigaciones más recientes son varias las estructuras y sistemas neuronales implicados en una capacidad tan compleja como esta.

Además, como hemos visto anteriormente, existen distintas clasificaciones de memoria, de tipos de aprendizajes y subprocesos de esta función cognitiva que complican más aún el ubicarla en una entidad física única como sería una estructura cerebral concreta. En palabras de Kandel y cols. (1997) “las bases neurales de la memoria se resumen en dos principios generales: (1) la memoria tiene fases, y (2) la memoria se localiza en diferentes lugares en todo el sistema nervioso.”

Existen tres casos clínicos que fueron reveladores por excelencia de los sistemas encefálicos responsables del almacenamiento a corto plazo y la consolidación de la información declarativa y son reconocidos por neurólogos y psicólogos de todo el mundo; éstos son los pacientes H.M.,

N.A. y R.B. (Purves, 2008). Tomados los tres casos en conjunto, proporcionan pruebas irrefutables de la relevancia de estructuras diencefálicas de la línea media y temporales mediales, entre ellas destacan las siguientes:

Formación hipocampal

La formación hipocampal está localizada en la zona profunda del lóbulo temporal medial y está constituida por la corteza entorrinal, el complejo subicular, la circunvolución dentada y el hipocampo. El hipocampo desde el principio ha sido el centro neural por excelencia considerado como un almacén de información por las primeras investigaciones sobre anatomía de la memoria pero con posterioridad, aunque importante, se ha considerado como una de las estructuras temporales mediales que interviene junto a otras en este proceso, siendo considerado un almacén temporal de memoria donde se guarda información a consolidar (Squire, 1993). Esta estructura, al igual que sus múltiples conexiones, es crucial en muchos tipos de memoria ya sea en humanos como en animales. En humanos, parece estar muy relacionada con la memoria declarativa (Eichenbaum, 1999; Eichenbaum y cols., 1996; Squire, 1993). Se ha observado que un daño bilateral en el hipocampo produce amnesia anterógrada severa (Squire y Zola, 1996) y su papel principal parece que sea el de organizar nuestra memoria manteniendo en relación recuerdos adquiridos de forma independiente y permitiendo el acceso a un conjunto de memorias relacionadas una vez se activa la

recuperación de una memoria particular (Alkon y cols., 1991). Las lesiones en la formación hipocampal causan deterioros en la memoria declarativa y de acontecimientos recientes (Squire y cols., 2001).

Es también crucial en el aprendizaje y la memoria al establecer extensas y recíprocas conexiones con la neocorteza (Gluck y Myers, 1998; Lavanex y Amaral, 2000; Rosembaum y cols., 2001) y esencial para la memoria declarativa en humanos, tanto semántica como episódica (Cipolotti y cols., 2001; Eichembaum, 2001; Eichembaum y cols., 1996; Gluck y Myers, 1998; Nadel y Bohbot, 2001; Nadel y Moscovitch, 1997; Rolls, 2000; Suzuky y Clayton, 2000), mediando en la secuenciación y el contexto de la información.

La pérdida de volumen hipocampal que se genera en la depresión explicaría problemas de memoria que se producen en estos trastornos (Sheline y cols., 1999) y podría ser el resultado del aumento de la muerte neuronal por niveles distintos de glucocorticoides en las células piramidales CA3 del hipocampo (Sapolsky, 2000; Sapolsky y cols., 1986).

En cuanto al papel del hipocampo en animales, éste es relevante para el aprendizaje relacional, espacial, olfativo y en los condicionamientos (Ambrogio Lorenzini y cols., 1999; Chan y cols., 2001; Eichembaum, 1999; Squire, 1993). Su lesión, al igual que en humanos, produce un deterioro en la memoria en la cual se necesita de claves contextuales (Rosembaum y cols., 2001). Además, el fórnix, mayor proyección hipocampal

subcortical en el cerebro, cuando se lesiona, provoca deterioros de memoria (Squire y Zola, 1996). En animales, el entrenamiento en algunas tareas, incrementa la fosforilación hipocampal del CREB, pero no en aquellos que tenían el fórnix lesionado y que además no fueron capaces de aprender (Taubenfeld y cols., 1999).

Cabe mencionar el fenómeno que en principio se observó en el hipocampo y luego se encontró en otras estructuras cerebrales de la potenciación a largo plazo, siendo un tipo de plasticidad sináptica que parece ser el cambio neuronal capaz de proporcionar una base para el aprendizaje y la memoria (Malenka y Nicoll, 1999).

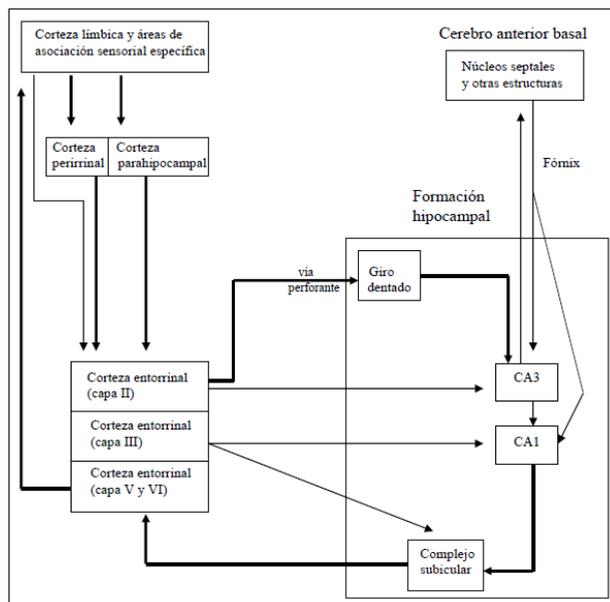


Fig. 2.3. Estructuras de la región hipocampal y asociaciones con otras estructuras sobretodo temporales. Adaptado de Gluck y Myers (1998).

Amígdala

Como en el hipocampo, inicialmente se pensó que la amígdala era el centro de memoria donde se almacenaban las claves para el reconocimiento de los objetos a largo plazo. Experimentos posteriores refutaron estas hipótesis y apuntaron en la dirección de la importancia de ésta para la memoria de tipo emocional (McGaugh, 2000; McGaugh y cols., 1996; Roozendaal, 2000; Roozendaal y McGaugh, 1996) en los que el recuerdo emocional se bloquea tras la lesión de esta estructura.

De acuerdo con Torras y cols., (2001) la amígdala es el sistema modulador de la memoria en el condicionamiento del miedo y modularía el almacenamiento de la memoria en otras regiones del cerebro, como son el núcleo caudado y el hipocampo. Ésta además se relaciona en los efectos de los glucocorticoides y la epinefrina en la memoria (McGaugh y cols., 1996; Roozendaal, 2000) al igual que en la potenciación a largo plazo (Kim y Jung, 2006; Maren, 2005).

La amígdala, al estar relacionada con aprendizajes emocionales y con el almacenamiento de memorias afectivas, forma asociaciones entre estímulos y recompensas que ayudarían a establecer un significado emocional de algunos contextos, tanto en animales como en seres humanos (Adolphs y cols., 1998; Anderson y Phelps, 2001; García y cols., 1999; Maren, 1999; McGaugh y cols., 1996; Morris y cols., 1998; Torras y cols., 2001) y juega un importante papel en

condicionamientos clásicos (Schafe y LeDoux, 2000; Wilensky y cols., 2000).

Otras estructuras

Además de las dos estructuras más importantes explicadas en este capítulo, otras estructuras implicadas en procesos de memoria y aprendizaje serían el cerebelo y el cuerpo estriado (compuesto por los núcleos caudado y putamen). La primera de las partes, el cerebelo se ha concebido como lugar donde se almacenan los recuerdos de las habilidades sensoriomotoras aprendidas (Pinel, 2001). Se ha estudiado su función en el condicionamiento pavloviano de la respuesta del parpadeo del conejo mostrando un papel crucial para condicionar esta conducta (Daum y Schugens, 1996).

El cuerpo estriado, parece que almacena los recuerdos que se forman a lo largo de muchos ensayos (hábitos y destrezas), para establecer relaciones entre estímulos y respuestas y que actúa en paralelo junto al hipocampo y la amígdala (Ambrogio Lorenzini y cols., 1999).

Por último, deberíamos hacer referencia a diferentes partes de la corteza cerebral, que aunque no son áreas especializadas en procesos mnésicos se han confirmado como implicadas en diferentes tipos de memoria. Para la memoria declarativa, además de estructuras del lóbulo temporal medial y el hipocampo también cabría señalar la corteza cerebral (Eichbaum y cols., 1996). Además pacientes con daño en

ciertas áreas corticales son incapaces de recordar la secuencia temporal de los acontecimientos (Wood y cols., 2000). Para el reconocimiento de objetos, la corteza de asociación jugaría un papel esencial (Carlson, 2014) y diversos estudios describen la corteza cerebral como el lugar donde la información adquirida y guardada temporalmente en el hipocampo es almacenada de forma permanente (Matynia y cols., 2001).

Cada zona del neocortex es responsable para determinado tipo de percepción: el lóbulo inferotemporal participaría en la memoria de estímulos visuales concretos y de reconocimiento visual de objetos complejos (Carlson, 2014); el lóbulo parietal posterior, se relaciona con la percepción espacial y su lesión produce deterioro en tareas como la navegación (Kolb y Walkey, 1987) y el lóbulo temporal medial, junto con la amígdala y el hipocampo juegan un papel muy importante en la formación de memoria relacional de acontecimientos y la formación de nuevos aprendizajes en general (Stefanacci y cols., 2000).

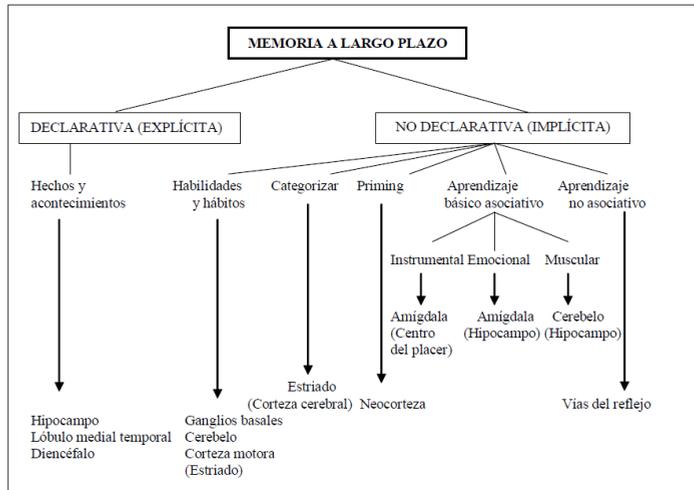


Fig. 2.4. Clasificación de la MLP y las estructuras cerebrales asociadas (adaptado de Thompson y Kim, 1996; Thomson, 2005). Entre paréntesis se indican otras estructuras implicadas con menor importancia.

CAPÍTULO 3:
EVITACIÓN
INHIBITORIA

3.1. Introducción

De entre los procedimientos para estudiar los procesos de aprendizaje y memoria en animales podemos encontrar una gran variedad en función de la modalidad de aprendizaje que se quiera analizar (aprendizaje espacial, emocional, de miedo...) y del paradigma elegido para el aprendizaje a cuantificar. Uno de los más utilizados es la prueba de evitación inhibitoria, también llamada evitación pasiva.

En los experimentos de farmacología, la evitación inhibitoria ha sido un procedimiento de elección con gran tradición y se ha utilizado para demostrar la relación entre diferentes momentos de administración de un fármaco y el aprendizaje de una tarea. Las razones para la elección de este paradigma han sido su fiabilidad, su facilidad de uso y su rapidez de ejecución, ya que la tarea es aprendida por los animales en un solo ensayo y puede seguir testándose durante meses (McGaugh e Izquierdo, 2000).

La prueba de evitación inhibitoria consiste en la evitación de un estímulo aversivo para el sujeto de experimentación mediante una conducta que aprende en contra de su comportamiento innato. Después veremos que hay diferentes modalidades en función de la conducta que aprende el sujeto para evitar este estímulo aversivo.

En general, en cualquier modalidad de prueba de evitación pasiva o inhibitoria, este tipo de condicionamiento tiene unas

peculiaridades que se tienen que tener en cuenta cuando se va a realizar y planificar un experimento con una tarea de evitación inhibitoria que según Bures y cols. (1983) son las que siguen:

a) La conducta activa que debe ser inhibida, ha de ser bien definida, ser reproducible y fácilmente medible.

b) El estímulo aversivo debe estar claramente asociado con la conducta activa que se debe inhibir.

c) El hecho de que sea una situación aprendida y de gran carga emocional para el animal (emociones de miedo y dolor) y la simplicidad de la conducta que tiene que producir el animal (es decir, no mostrar una conducta), hace que el proceso de adquisición de ésta sea muy rápido. La mayoría de las tareas de aprendizaje que tienen una única sesión de adquisición o ensayo son tareas de evitación inhibitoria, que es una gran ventaja como hemos comentado anteriormente.

d) La rapidez en la adquisición permite establecer el momento en que la información entra en el sistema nervioso.

e) La retención de la información se mide mediante la comparación de la conducta antes y después de haberse producido el aprendizaje, o bien comparando la conducta de animales no entrenados y animales que si lo han sido.

3. 2. Modalidades de evitación inhibitoria

Existen distintas modalidades de este procedimiento o variantes en cuanto a la instrumentación (caja de evitación) y en cómo se desarrolla la prueba, como hemos comentado en este capítulo anteriormente. Entre estas variantes podemos destacar la modalidad de “descenso del escalón” o *step down*, uno de los más empleados dentro de esta tipología de pruebas (Bammer, 1982; Bures y cols., 1993; Izquierdo y cols., 2006; Jafari-Sabet y cols., 2014). Esta técnica descrita por Jarvik y Essman en 1960 (Bures y cols., 1983) consiste en colocar una plataforma de madera en un compartimento de la caja, el suelo del cual consiste en una rejilla con la que se le proporciona una descarga eléctrica al animal al descender de la plataforma de madera. El animal se coloca como punto de origen sobre la plataforma central, registrándose el tiempo que tarda en descender de ésta.

Esta modalidad ha sido muy utilizada como modelo experimental a partir de la década de los 90 para investigar la memoria y los efectos que distintos fármacos tienen sobre ésta y el aprendizaje en roedores, tanto en ratones (Sansone y cols., 1993; Zarrindast y cols., 1996; Senda y cols., 1997) como en ratas (Zanatta y cols., 1996; Izquierdo y cols., 1997; Paratcha y cols., 2000; Rubin y cols., 2001).

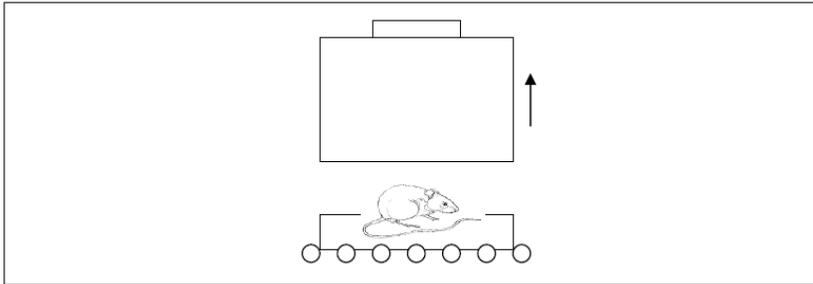


Fig. 3.1. Representación esquemática del procedimiento de evitación inhibitoria “descenso del escalón”. Adaptado de Bures y cols., 1983.

Otra modalidad muy empleada para este tipo de estudios, es el llamado “test de los dos compartimentos” o *two-compartment test*, desarrollado por Kurz y Pearl en 1960 (recogido en Bures y cols., 1983), consiste en la división de la caja de evitación en dos compartimentos, uno iluminado y grande y otro pequeño y oscuro conectados por una pequeña puerta deslizante, que permanece abierta un tiempo hasta que el animal, que se coloca de origen de espaldas a la puerta en el compartimento grande, ha explorado todo el espacio de los dos compartimentos (se toman medidas de los tiempos que el animal permanece en ambos); es entonces cuando se recluye al animal en el compartimento pequeño y oscuro y se le propicia una descarga intermitente durante un tiempo determinado. El test de recuerdo debe hacerse a partir de las 24 horas después, midiendo el tiempo que el animal pasa explorando cada compartimento y lo que tarda en pasar al compartimento pequeño y oscuro.

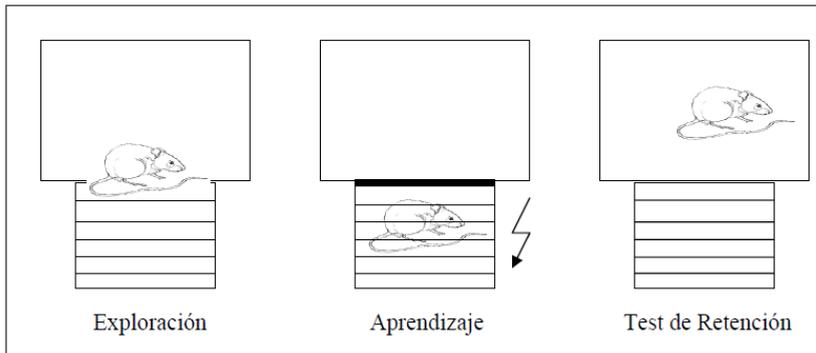


Fig. 3.2. Representación esquemática del procedimiento de evitación inhibitoria “test de dos compartimentos”. Adaptado de Bures y cols., 1983.

Por otra parte, dentro de las modalidades de evitación inhibitoria, encontramos la “supresión del picoteo” o *supression of pecking*, procedimiento utilizado en otras especies como gatos y polluelos en la que se utiliza el estímulo de la comida o bebida (en supresión del lametazo) como reclamo para animales hambrientos o sedientos.

La modalidad más utilizada en roedores junto con la primera de las que hemos descrito, de “descenso del escalón”, es la de “pasar a través de” o *step-through*. La técnica fue descrita por primera vez por Jarvik y Kopp en 1967 y modificada por King y Glasser en 1970 (recogido en Bures y cols., 1983).

Como señalan Bures y cols. (1993), los ratones y ratas son animales nocturnos, evitan la luz intensa y tienen preferencia por la oscuridad; y cuando se colocan en un lugar con gran iluminación y tienen la posibilidad de huir hacia la parte más

oscura, tienen un comportamiento innato que les lleva a hacerlo. En este procedimiento se coloca al animal en una caja dividida en dos compartimentos de iguales dimensiones, uno iluminado y el otro no. Estos dos compartimentos están comunicados a través de una puerta que se abre y se cierra. El roedor se coloca en el compartimento iluminado o de salida, y tras unos segundos de adaptación al aparato, se abre la puerta que comunica los dos espacios. Los animales, por la tendencia natural mencionada anteriormente, cruzan rápidamente al compartimento oscuro. En cuanto el animal ha introducido sus patas en la zona oscura, recibe una descarga eléctrica a la vez que se cierra la puerta que separa los dos compartimentos, quedándose recluido en esa parte, después es retirado y devuelto a su jaula. En el procedimiento habitual la prueba de retención se realiza 24 horas después del entrenamiento (e.g. Honarmand y cols., 2014). En nuestro caso, dicha fase de retención se realiza una semana después del entrenamiento, al igual que otros estudios (e.g. Baratti y Boccia, 1999; Boccia y cols., 2011). El índice de retención del aprendizaje es el tiempo que tardan los animales en cruzar de un compartimento a otro (la latencia de respuesta).

En los experimentos realizados para esta tesis, el procedimiento utilizado ha sido el que sigue a continuación, siguiendo con el procedimiento habitual de las pruebas de evitación inhibitoria de la modalidad “pasar a través de” o *step-through*, que consta de dos fases experimentales:

a) Fase de entrenamiento

Se coloca al animal en el compartimento iluminado con la puerta que separa los dos compartimentos cerrada, el animal permanece durante un tiempo llamado periodo de adaptación al aparato de 90 segundos en los que el animal explora y se familiariza con el espacio en el que se encuentra (e.g. Parra y cols., 2002). Pasado este periodo, la puerta que separa los compartimentos se abre y deja paso al compartimento oscuro. El animal, en general tarda pocos segundos en cruzar al otro compartimento y es entonces cuando al contacto podal del animal al otro lado la puerta se cierra mientras recibe una descarga eléctrica y es cuando se produce el aprendizaje. El tiempo que tarda en cruzar se mide por segundos mediante un controlador propio del aparato que cuenta exactamente a partir de que la puerta se ha abierto. Así, registramos la latencia de respuesta para esta fase.

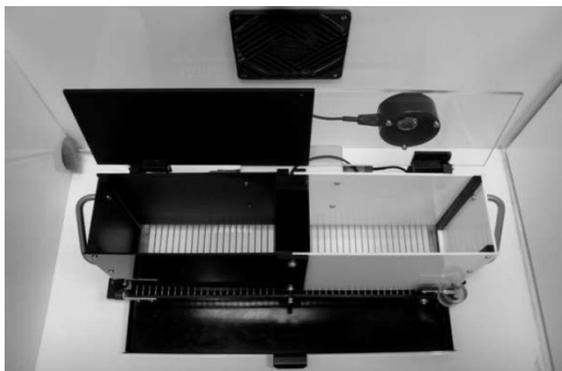


Fig. 3. 3. Fotografía caja evitación inhibitoria utilizada para los experimentos de esta tesis.

b) Fase de test o retención

Tras siete días el animal es colocado de nuevo en el compartimento iluminado igual que en la fase de entrenamiento. Aquí se muestra si el animal ha aprendido la evitación. La prueba se realiza exactamente como en la fase anterior y se vuelve a registrar la latencia de cruce al compartimento oscuro.

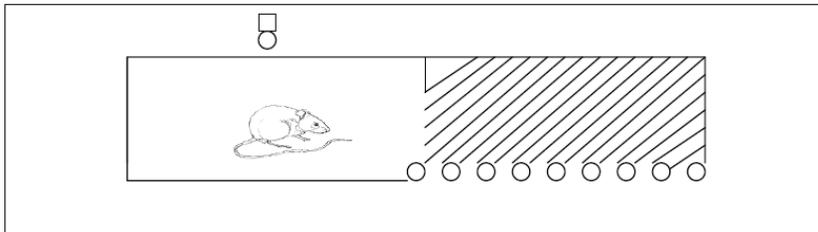


Fig. 3.4. Representación esquemática del procedimiento de evitación inhibitoria “pasar a través de”. Adaptado de Bures y cols., 1983.

Esta modalidad se ha utilizado en multitud de estudios tanto en ratones (Assi, 2001; Boccia y cols., 2004; Hozumi y cols., 2003; Ishida y cols., 2007; Parra y cols., 2010; Seminerio y cols., 2013; Tanabe y cols., 1997), como en ratas (Borowicz y cols., 2001; D’Agata y Cavallaro, 2003; Mathis y cols., 1994; Misik y cols., 2014; Piri y cols., 2013; Souza y cols., 2004). Todos ellos con variaciones en los parámetros empleados dentro de la misma modalidad, al igual que en los procedimientos anteriores: diferencias en tamaño de los compartimentos por diferencias de tamaño de ratón a rata, variaciones en intensidad y duración de la descarga eléctrica

por variaciones en la sensibilidad a estímulos aversivos de las distintas cepas de ratones y ratas, intervalo de tiempo entre fases, momento de administración de los fármacos, tiempo de habituación del animal al aparato antes de comenzar la prueba y tiempo máximo que se le da al animal para que pueda cruzar.

3. 3. Neuroanatomía de la evitación inhibitoria

Este procedimiento también se ha empleado para el análisis de las estructuras implicadas en la memoria de los animales utilizados, entendiendo como memoria “conservar la conducta aprendida en el entrenamiento, medida por la diferencia en la ejecución entre entrenamiento y test” (Heise, 1981). Según algunos autores, este sería un procedimiento más para poder ir perfilando las bases que rigen en estos tipos de procesos, permitiendo una medida indirecta de los mecanismos moleculares de la memoria (Izquierdo y McGaugh, 2000) y la diferenciación entre memoria a corto y largo plazo (Barros y cols., 2005; Cammarota y cols., 2005; Izquierdo y cols., 2000a; Medina y cols., 1999; Souza y cols., 2002; Vianna y cols., 2000; Walz y cols., 2005).

Esta tarea ha sido el paradigma más utilizado cuando se pretende estudiar el papel del lóbulo temporal en los procesos de memoria después de la adquisición, requiriendo un buen funcionamiento del hipocampo, la amígdala, el septum medial

la corteza entorrinal y la corteza parietal (Izquierdo y cols., 2000a, 2000b; Rubin y cols., 2001).

Además la técnica permite la manipulación de algunos de los procesos implicados (adquisición, consolidación y recuperación), es decir, podemos manipular el funcionamiento normal del aprendizaje de la tarea de evitación (Dudai, 2000; Shulz, 2000). Esta manipulación puede ser entendida desde tres puntos de vista distintos; Abel y Lattal (2001) distinguen estos tres grandes bloques de intervenciones en el aprendizaje: la manipulación genética, la manipulación mediante lesiones y la farmacológica. La primera de ellas, la genética (entendida por Izquierdo y McGaugh (2000) como lesión molecular) presentan esta influencia a lo largo de todo el proceso de aprendizaje; la manipulación mediante lesiones es iniciada en la etapa de interés y después puede mantenerse o no (en función de su reversibilidad) pudiendo afectar a más de un sistema de neurotransmisión, ya que algunas estructuras los comparten y por último, la manipulación farmacológica, considerada la más ventajosa para este objeto de estudio ya que es más específica en cuanto al sistema a incidir, se puede aplicar la sustancia en el momento de interés, actuando principalmente en el proceso de interés (Abel y Lattal, 2001).

De esta manera, si administramos el fármaco antes de la sesión de entrenamiento, estaremos incidiendo en el momento de la adquisición; si administramos el fármaco después del entrenamiento influimos en la consolidación del aprendizaje y

si lo administramos antes de la fase de test, influiremos en el proceso de la recuperación (Heise, 1981).

Las estructuras más relacionadas, como hemos visto anteriormente en esta tesis, con la memoria, son el hipocampo, la amígdala, la corteza entorrinal y parietal. Estas estructuras que están conectadas entre sí, intervienen en un orden secuencial (Bonini y cols., 2003, Izquierdo y cols., 1997b; McGaugh, 2000; McGaugh y cols., 1996; Rossato y cols., 2004; Rubin y cols., 2001; Wilensky y cols., 2000). El hipocampo y la amígdala participan inmediatamente después de la adquisición, la corteza entorrinal treinta minutos después de ésta y la corteza parietal sesenta minutos después de adquirida la conducta de evitación. En todo ello, parece que juegan un papel crucial, los receptores NMDA de glutamato. Esta secuenciación a la que hacemos referencia, no está muy clara en la literatura pero parece lógico por la naturaleza de sus conexiones. Podría ser que la potenciación a largo plazo generada en el hipocampo y en la amígdala, al mantenerse varios minutos, ayudara a incentivar la actividad la corteza entorrinal; el proceso se repetiría entre las dos cortezas y en otras posibles conexiones. Todas ellas actuarían de forma integrada y para ello deberían mantenerse intactos los receptores de glutamato (Izquierdo y Medina, 1997b; Zanatta y cols., 1996).

La amígdala, no está directamente relacionada con el aprendizaje y con el condicionamiento aversivo llevado a cabo

por la evitación inhibitoria, sin embargo, ésta modula la consolidación de la memoria que ocurre en otras estructuras extraamigdalares (McGaugh, 2000). Aunque otros autores señalan a la amígdala como moduladora de la consolidación, adquisición y recuperación de la información a través del papel del glutamato (Barros y cols., 2005; Bonini y cols., 2003).

Existen discrepancias también en cuanto a la conceptualización de la prueba como prueba de memoria a corto o a largo plazo; ya que algunos autores remarcan que la prueba solamente mide memoria a largo plazo (Borowicz y cols., 2001). Otros autores, consideran por el contrario, que mediante esta prueba se puede medir ambos tipos de memoria en función del tiempo que se deja pasar tras el ensayo de adquisición o entrenamiento hasta la realización de la prueba de retención (memoria a corto plazo sería si la prueba de retención se realiza antes de una hora y media después de la adquisición) (Vianna y cols., 2000). Según McGaugh (2000), la consolidación de este tipo de aprendizaje empezaría inmediatamente después de la adquisición. Algunos autores apuntan a que esta consolidación puede durar horas (Bernabeu y cols., 1997; Izquierdo y Medina, 1997b; McGaugh, 2000). Una vez se ha consolidado la memoria de evitación inhibitoria, esta corresponde ya a memoria a largo plazo y el recuerdo de esta conducta persiste un largo periodo de tiempo, dados distintos resultados en investigaciones de extinción de evitación pasivas, en los cuales se ha comprobado que en

ocasiones puede haber recuerdo (Roldan y cols., 2001) y en ocasiones no (Boccia y cols., 2005) bajo determinadas circunstancias.

Por otra parte, diferentes autores afirman que en la evitación inhibitoria, la memoria a largo plazo coexiste con la memoria a corto plazo, sin ser dependiente la una de la otra (Izquierdo y cols., 1999; Vianna y cols., 1999; Walz y cols., 1999). Izquierdo y cols. (2002) realizan experimentos para diferenciar estos dos mecanismos de memoria, midiendo ésta en dos momentos distintos después de la adquisición y viendo que diferentes fármacos afectan a un tipo de memoria, a otra o a las dos, puesto que influyen en un sistema o en otro de memoria. La explicación que da a la influencia que diferentes fármacos tienen en la memoria a corto y a largo plazo al mismo tiempo, se basa en que aunque sean mecanismos distintos de memoria y haya redes neuronales diferenciadas entre ellos, en realidad existe un vínculo entre las dos que corresponde a algunos mecanismos en común que en este caso serían sinapsis de algunos grupos de neuronas (por ejemplo, receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos en hipocampo, receptores AMPA en corteza entorrinal y parietal, PKA inmediatamente después del entrenamiento en hipocampo, mecanismos muscarínicos colinérgicos en todas las regiones estudiadas, PKC y guanilil ciclase en corteza entorrinal pero no en hipocampo y eventos desencadenantes

de BDNF en la región CA1 del hipocampo que actúan en los dos tipos de memoria.

Además, y corroborando esta idea, existen receptores que solamente se ven implicados en la memoria a corto plazo (e.g. los receptores dopaminérgicos D_1 y los receptores serotoninérgicos $5-HT_1$), frente a otros que solamente se ven implicados en la memoria a largo plazo de la evitación inhibitoria (e.g. los noradrenérgicos). Sin embargo, hay estudios como el de Lalumiere y cols. (2004) que muestran que la consolidación de la memoria está modulada por los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 que activan los receptores β -adrenérgicos y colinérgicos de la amígdala.

Por otro lado otros mecanismos estudiados en este campo, y que en muchas ocasiones se han hipotetizado como mecanismos similares a los de memoria, son la potenciación a corto y a largo plazo. Se ha observado una gran similitud entre los procesos bioquímicos que subyacen a la memoria a corto plazo y los fenómenos de potenciación a corto plazo. Al igual que ocurre con los mecanismos bioquímicos que subyacen a la memoria a largo plazo y lo que se conoce como potenciación a largo plazo (posible mecanismo subyacente a la consolidación de la memoria) Estos hallazgos condujeron a que varios autores hipotetizaran que la consolidación del aprendizaje de la evitación inhibitoria se podría estar produciendo por una potenciación a largo plazo en las diferentes estructuras antes mencionadas (Quevedo y cols., 1997; Izquierdo y cols., 2000a).

3. 4. Sistemas de neurotransmisión en la evitación inhibitoria

Como se ha explicado anteriormente en esta tesis, las pruebas de evitación inhibitoria se han utilizado en muchas ocasiones para estudiar el efecto que diferentes tipos de fármacos tienen sobre la memoria (Boccia y cols., 2005; Everss y cols., 2005; Souza y cols., 2004; Walz y cols., 2005).

En la revisión de Myhrer, 2003 a la que hemos hecho referencia anteriormente en este capítulo, se hace un repaso de los diferentes sistemas de neurotransmisión implicados en procesos de aprendizaje y memoria en roedores incluyendo como medidas de este aprendizaje y memoria diferentes tareas conductuales entre las que incluye la evitación inhibitoria. Los fármacos seleccionados para realizar el metaanálisis fueron de agonistas, antagonistas y neurotoxinas que afectaban un solo sistema de neurotransmisión tan selectivamente como fuera posible. En este artículo, el autor concluye que los sistemas más estudiados para esta tarea, son el glutamatérgico y el colinérgico. Con los datos recogidos, apunta a que el neurotransmisor con más influencia sería la dopamina y el segundo, el glutamato. Fármacos con influencia en el sistema serotoninérgico serían efectivos en la mitad de los casos y los que actúan en el noradrenérgico serían los que menos influencia tendrían para la tarea de evitación pasiva.

Los estudios realizados con pruebas de evitación inhibitoria han puesto de manifiesto que el sistema colinérgico está implicado en este tipo de tarea (Eidi y cols., 2003; Ferreira

y cols., 2003; Hozumi y cols., 2003). Los estudios que han utilizado fármacos antagonistas colinérgicos han mostrado que éstos parecen tener un efecto deteriorante sobre los procesos cognitivos implicados en la evitación inhibitoria (Ambrogio-Lorenzini y cols., 1999; Azizbeigi y cols., 2013; Barros y cols., 2001; Hozumi y cols., 2003; Piri y cols., 2013; Roldán y cols., 2001). Los agonistas colinérgicos en su caso, han mostrado una mejora en el aprendizaje de la conducta de evitación (Barros y cols., 2001; Ciamei y cols., 2001; Eidi y cols., 2003; Hozumi y cols., 2003; Power y cols., 2003; Zarrindast y cols., 1996).

El sistema catecolaminérgico también se ha relacionado y estudiado en cuanto a su implicación en el aprendizaje de la evitación pasiva, aunque de forma menos clara que otros sistemas. El sistema noradrenérgico ha demostrado estar implicado en este tipo de memoria, sobre todo el sistema β -adrenérgico (Lalumiere y cols., 2005), ya que los inhibidores de este sistema, al ser administrados antes de la adquisición crónicamente, o antes de la recuperación de la tarea, producen un deterioro en el aprendizaje de la conducta (Barros y cols., 2001; Nelson y cols., 1999). Con el sistema α -adrenérgico se han obtenido resultados contradictorios y poco claros, aunque la administración de agonistas de este sistema después de la adquisición de la tarea de evitación pasiva o antes de la sesión de recuperación, producen una mejora en la conducta de evitación (Barros y cols., 2001; Zarrindast y cols., 2001).

Los experimentos realizados con el sistema dopaminérgico resultan también contradictorios, dependiendo del momento de administración de los fármacos y del tiempo que se deja transcurrir entre la adquisición y la administración del fármaco, así como de la vía de administración que se utiliza (Barros y cols., 2001; Umegaki y cols., 2001; Vianna y cols., 2001). En general, podemos afirmar que los agonistas dopaminérgicos parecen producir una mejora en la evitación inhibitoria (Barros y cols., 2001; Sansone y cols., 1999), mientras que los antagonistas empeoran la ejecución de la conducta (Lalumiere y cols., 2004; Vianna y cols., 2001).

En cuanto al sistema serotoninérgico, los fármacos que actúan sobre este sistema influyen en la conducta de evitación inhibitoria (Both y cols., 2005; Schneider y cols., 2003). Al igual que con otros sistemas de neurotransmisión, sus efectos varían en función del momento de administración, si se produce antes o después de la prueba de adquisición (Ögren y cols., 2008). La administración post-entrenamiento o posterior a la adquisición, de agonistas serotoninérgicos produce deterioro de la conducta de evitación inhibitoria (Pavone y cols., 1993), mientras que la administración de antagonistas la mejoran (Altman y Normille, 1987). Sin embargo, cuando la administración de antagonistas se produce con anterioridad a la adquisición de la conducta de evitación inhibitoria, se observa un deterioro de la misma (Altman y Normille, 1987). Por el contrario, Barros y cols. (2001) observaron que la administración de agonistas serotoninérgicos antes de la

recuperación de la conducta de evitación producía un deterioro, mientras que si se administraban antagonistas se observaba una mejora. Se ha hipotetizado que este efecto se deba a que una recuperación de esta conducta puede funcionar de la misma manera que una readquisición.

Los fármacos que actúan potenciando el sistema GABAérgico, producen un deterioro en la tarea de evitación inhibitoria (Assi, 2001; Both y cols., 2005; Ogasawara y cols., 1999; Zarrindast y cols., 2001); mientras que los que inhiben la transmisión de este sistema mejoran la conducta de evitación (Farkas y Crowe, 2000).

En relación con el sistema glutamatérgico, actuando a través de los receptores NMDA, también modula los procesos memorísticos implicados en evitación inhibitoria (Barros y cols., 2005; Cammarota y cols., 2005). La potenciación de estos receptores produce una mejora en la conducta de evitación (Rubin y cols., 2000, 2001); mientras que la administración de antagonistas provoca un deterioro en el aprendizaje de la tarea (Borowicz y cols., 2001; Rubin y cols., 2000, 2001; Vianna y cols., 2001). Además otros receptores glutamatérgicos han sido probados con gran influencia en la memoria de evitación inhibitoria, como son los receptores AMPA y metabotrópicos. La administración de antagonistas a estos receptores en la amígdala produjo un daño en el recuerdo si se realizaba antes de la prueba de recuperación.

Por último, un sistema que ha recibido menor interés pero también se ha incluido como influyente en el aprendizaje y

memoria de la tarea de evitación pasiva, ha sido el sistema histaminérgico a través de la demostración de un efecto facilitador sobre la conducta (Eidi y cols., 2003), ya sea bloqueando la recaptación de histamina (Meguro y cols., 1995) o activando receptores postsinápticos de histamina (Malmberg-Aiello y cols., 2000).

Aunque a groso modo los estudios realizados en el campo marcan algunas directrices sobre cómo podría funcionar el aprendizaje y la memoria de la evitación pasiva; en muchos casos siguen apareciendo contradicciones o resultados incompatibles ya que las diferencias pueden ser debidas a diferentes factores tenidos o no en cuenta en los experimentos como: la cepa de animales, la raza (ratón o rata), el momento de administración de los fármacos (antes del entrenamiento, después o antes de la prueba de recuerdo), la vía de administración de los fármacos, el tiempo transcurrido entre la administración y la prueba o los parámetros elegidos para el procedimiento (e.g. la intensidad de descarga eléctrica o la duración). Lo que quedaría constatado es que en mayor o menor medida, en una dirección u otra, los sistemas de neurotransmisión estarían influyendo en los procesos que rigen el aprendizaje y la memoria de la prueba de evitación inhibitoria. Junto con ello, su facilidad de administración y su simplicidad la han convertido en una de las pruebas más utilizadas para el estudio de la memoria y por ello se ha utilizado en la actualidad (Barros y cols., 2005; Bevilaqua y cols., 2005; Boccia y cols., 2005; Bonini y cols., 2005; Chen,

2005; Lalumiere y cols., 2005) en la realización de esta tesis y probablemente en el futuro.

Existen además diferentes opiniones acerca de qué tipo de memoria se evalúa en la prueba de evitación inhibitoria, aunque la mayoría de autores en lo que concuerdan es que se está midiendo una memoria explícita que es un tipo de memoria a largo plazo (Izquierdo y cols., 1997, 2000a, 2000b; Vianna y cols., 2000). Además, estos mismos autores defienden la idea de que la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo se rigen por mecanismos diferentes, como hemos comentado en este mismo apartado en esta tesis, dicha idea, fuertemente apoyada por la experimentación psicofarmacológica y conductual (Barros y cols., 2005; Cammarota y cols., 2005; Walz y cols., 2005). Otros autores por el contrario, consideran esta tarea de evitación un tipo de aprendizaje instrumental, en el cual la aplicación de la descarga eléctrica es contingente a la respuesta del animal (Wilensky y cols., 2000). Por otra parte, en un metaanálisis realizado por Myhrer en 2003, este explica que la prueba de evitación inhibitoria es una prueba que implica un sistema de memoria emocional amigdalino, además de la memoria de trabajo y la memoria asociativa.

Sobre los procesos de memoria entendidos como momentos parciales se ha investigado sobretodo en el proceso de consolidación y aunque hasta el momento se sabe bien

poco de la evolución temporal de estos procesos moleculares y neuronales, es conocido que esta consolidación de la memoria persiste en el tiempo en diferentes áreas cerebrales (Albernini, 2005; Milekic y Alberine, 2002).

CAPÍTULO 4:
EVITACIÓN
INHIBITORIA Y
ANTIDEPRESIVOS

4.1. Introducción

Según la OMS (2012), la depresión es una enfermedad que afecta a 350 millones de personas en el mundo, es considerada una enfermedad grave que causa gran sufrimiento y en el peor de los casos puede llevar al suicidio causando un millón de muertes anuales. En lo que a España se refiere, la prevalencia a los 12 meses en población adulta oscila entre 1.300.000 y 1.500.000 personas, conformando aproximadamente un 4% de los mayores de 18 años de nuestro país (Gabilondo y cols., 2010; Vázquez y cols., 2014). El tratamiento farmacológico de primera elección lo conforman una serie de fármacos de distinta procedencia y con distintas acciones sobre el Sistema Nervioso Central, que reciben el nombre de antidepresivos. Los antidepresivos son un gran grupo de fármacos destinados a la mejoría del estado de ánimo de los pacientes diagnosticados de depresión mayor. Sin embargo, como veremos, se vienen utilizando para otros desórdenes mentales no directamente relacionados con los episodios depresivos.

En un informe publicado por la Agencia Española del Medicamento y de Productos Sanitarios (AEMPS) a principios de 2015 se resume el aumento en el consumo de estos fármacos desde el año 2000 al 2013, concluyendo que su uso se ha incrementado en un 200%. En la Comunidad Valenciana, se ha registrado un incremento del 81,2 % en su consumo en el periodo comprendido entre 2000 y 2010 sin

romper la tendencia en el entorno europeo (Sempere y cols., 2014).

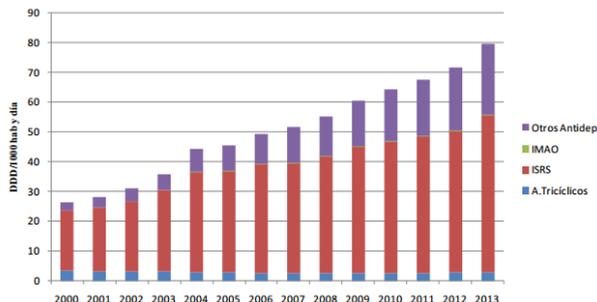


Fig. 4.1. Consumo medido DDD (Dosis Diaria Definida) por 1000 habitantes y día para cada grupo de antidepresivos. A. Tricíclicos = Antidepresivos Tricíclicos, IMAO = Inhibidores de la enzima Monoamino Oxidasa, ISRS = inhibidores recaptación serotonina, Otros Antidep = Otros Antidepresivos. (Tomado de AEMPS, Ministerio de sanidad, 2015).

Aunque entre los objetivos principales de esta tesis no figure la referencia directa a estos psicofármacos llamados antidepresivos, vamos a detenernos aquí para explicar el origen de la línea de investigación que nos ha llevado a la proposición de este trabajo. Los antidepresivos, son un tipo de sustancias clasificadas como psicotropos, es decir, agentes químicos que afectan al sistema nervioso central produciendo cambios temporales en diferentes funciones cognitivas o funcionamiento general del cerebro.

Muchos trastornos mentales como son los de ansiedad, de entre ellos el de ansiedad generalizada, la agorafobia, y el trastorno por estrés post-traumático, son tratados con este tipo de fármacos, siendo desórdenes de distinta índole (Baldessarini, 2001). Éstos, además, son recetados en la adicción a sustancias (e.g. Schatzberg, 2000), la enuresis (e.g.

Humphreys y Reinberg, 2005) o el dolor crónico (e.g. Sindrup y cols., 2005). La heterogeneidad de su efectividad ante trastornos de tan diferente naturaleza, ha llevado a pensar a muchos autores dedicados al tema en un mecanismo terapéutico de acción común entre estos desórdenes para los que se prescriben este grupo de fármacos. Aunque este mecanismo de acción común todavía no es bien conocido, es objeto de estudio que suscita gran interés, y en el que podría darse cabida al estudio de sustancias que actúen de la misma manera que ciertos antidepresivos pero de una manera más específica sobre algunos sistemas de neurotransmisión.

Esta línea de investigación surge al encontrar diferentes resultados de estudios donde se aprecia un mal funcionamiento considerado como “atrofia” en el hipocampo que produce unos deterioros cognitivos por el papel de esta estructura en procesos de aprendizaje y memoria, asociados a la sintomatología observada en episodios depresivos (Campbell y cols., 2004; Paizanis y cols., 2007); además, los efectos sumatorios de estos déficits relacionados con la depresión (Castaneda y cols., 2008) más los efectos cognitivos producidos por el tratamiento con antidepresivos (Amado-Boccaro y cols., 1995) se contextualizan mejor bajo la hipótesis emergente de que la depresión y su tratamiento están directamente influenciadas por los mecanismos de plasticidad sináptica de algunas vías neurales (Pittenger y Duman, 2008). Esta plasticidad modificaría la intensidad o fuerza de las sinapsis en la vía neural implicada en el

trastorno depresivo y dada la importancia de estas sinapsis para los mecanismos de memoria (Hebb, 1949; Morris y cols., 2003), surgió la hipótesis hace algunos años de que el deterioro de la memoria (como fenómeno genético y epigenético, además de como huella de nuestras experiencias personales) es central en la acción terapéutica de los antidepresivos y otros tratamientos con psicotropos además de que en la depresión algunos circuitos aprenden a funcionar de manera disfuncional y quedan funcionando en la memoria de ese sistema de manera disfuncional (Parra, 2003). Con esta idea también Stahl (2008), explica que en la depresión, los circuitos neurales aprenden a funcionar de manera ineficiente y los antidepresivos modificarían la huella de la memoria en un proceso de plasticidad neural. Este proceso presentaría muchas similitudes en cuanto a cambios moleculares con otras causas de plasticidad incluyendo el tratamiento con antidepresivos (Duman y cols., 1999) o antipsicóticos (Konradi y Heckers, 2001), sensibilización del reflejo de retirada de la aplysia (Kandel, 2001) y el retraso en la muerte neural después de accidente isquémico (Tsukahara y cols., 1998). Para una revisión más detallada de este tema, ver Parra, 2003.

Hay diferentes sistemas neurotransmisores implicados en funciones mentales superiores como el aprendizaje y la memoria (Myhrer, 2003), como ya hemos comentado en otro capítulo. Algunos de ellos están implicados en el mecanismo de acción de las sustancias antidepresivas y podían ser responsables de los déficits observados en memoria y

aprendizaje cuando se administran: el sistema colinérgico (Everitt y Robbins, 1997), el sistema serotoninérgico (Bert y cols., 2008), el sistema noradrenérgico (Hertz y cols., 2004) y el sistema histaminérgico (Pasani y cols., 2000). El efecto de los antidepresivos en la memoria de animales se podría atribuir a una combinación de sus propiedades farmacológicas, incluyendo actividad anticolinérgica, antihistaminérgica, serotoninérgica y noradrenérgica (Monleón y cols., 2008).

En la revisión de Monleón y cols., (2008), se hace una recapitulación del tema de los antidepresivos y la memoria, ofreciendo una visión global mediante estas conclusiones:

- El deterioro de la memoria producido por diferentes antidepresivos no está confinado a los efectos anticolinérgicos que algunos presentan.
 - Hay relativamente pocos estudios que evalúen tratamiento crónico con antidepresivos, aunque los pocos que hay revelan una ausencia de tolerancia a sus efectos a pesar de sus efectos terapéuticos. Esta falta de tolerancia, sugiere que el efecto terapéutico de las drogas en este caso está relacionado con su influencia en los procesos de memoria.
 - Cuando los efectos de estas sustancias en el estado de ánimo y la ansiedad son evaluados, deberían tomarse en consideración los efectos cognitivos como por ejemplo en el aprendizaje y la memoria.
 - Es comprensible la abundancia de estudios de aprendizaje con estímulos aversivos por la similitud de su naturaleza con la depresión. Por lo contrario, se echan de menos estudios con
-

sujetos hembras, ya que la incidencia de los trastornos de ánimo y sobretodo el trastorno depresivo es mucho más alta entre las mujeres.

4.2. Antidepresivos

Hoy en día, existen muchos antidepresivos disponibles, mostrando eficacia en el tratamiento de la depresión. Los primeros en utilizarse con este fin, llamados IMAO (inhibidores de la enzima monoamino oxidasa) fueron descubiertos por azar en investigaciones de fármacos antituberculosos y su uso como agentes antidepresivos revolucionó el campo de los trastornos mentales aportando las primeras bases etiopatogénicas para conocer el origen de estas enfermedades y desarrollar nuevos fármacos para tratarlas. A partir de los primeros, en los años 70 y 80 se observó un incremento en su prescripción en la práctica psiquiátrica debido al desarrollo de nuevas sustancias con acción antidepresiva (Olfson y Klerman, 1993).

Dentro de este heterogéneo grupo de agentes químicos, Stahl (2002) realiza una clasificación en función de la especificidad en la recaptación de neurotransmisores cerebrales, dando lugar a los siguientes grupos:

1. Antidepresivos clásicos, que incluyen los inhibidores de la enzima monoaminoxidasa, (IMAOs), responsables de la degradación de dopamina, noradrenalina y serotonina, lo que resulta en un aumento de la concentración de los tres neurotransmisores; y los
-

antidepresivos tricíclicos (ATCs), que inhiben la recaptación de noradrenalina, serotonina y dopamina en menor medida.

2. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs).
 3. Los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (IRNs).
 4. Los inhibidores de la recaptación de noradrenalina y de dopamina (IRNDs).
 5. Los inhibidores duales de la recaptación de serotonina y de noradrenalina (IRSNs) que combinan las acciones de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs) y de los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (IRNs).
 6. Acciones duales serotoninérgicas y noradrenérgicas a través del antagonismo α_2 que hacen que la neurotransmisión tanto noradrenérgica como serotoninérgica se vean incrementadas por los antagonistas α_2 .
 7. Acción dual de los antagonistas de la serotonina α_2 e inhibidores de la recaptación de serotonina (ASIRs) que comparten la capacidad de bloquear tanto los receptores de 5-HT_{2A} como la recaptación de serotonina.
 8. Fármacos estabilizadores del estado de ánimo, que también tienen efectos antidepresivos.
-

Este cuadro-resumen muestra algunos de los antidepresivos más utilizados en la actualidad y su mecanismo de acción farmacológica. Podemos observar que muchos de ellos actúan de forma primaria sobre un sistema neurotransmisor y tienen otras acciones secundarias.

Grupo farmacológico	Nombre genérico	Mecanismo de acción primario	Acciones secundarias	Efectos Adicionales
ISRS	Citalopram	IRS		
ISRS	Escitalopram	IRS		
ISRS	Fluoxetina	IRS		
ISRS	Fluvoxamina	IRS		
ISRS	Paroxetina	IRS		(M ₁)
ISRS	Sertralina	IRS		IRD
IRSN	Venlafaxina	IRS/IRN		
IRSN	Duloxetina	IRS/IRN		
IRSN	Milnacipran	IRS/IRN		
IRND	Reboxetina	IRN/IRD		
NaASE	Mirtazapina	α_2	CAR,5-HT _{2,3} ; +5-HT ₁	H ₁ , α_1
APA	Quetiapina	α_2 ,IRN	5-HT ₂ ,+ 5-HT _{1A}	H ₁ , α_1
MT	Agomelatina	MT1/MT2	5-HT _{2C}	5-HT _{2B}
IMAOR	Moclobemida	IMA		(M ₁)
IMAO	Selegnina	IMB	PAD	
IMAO	Fenilzina	IMA		
IMAO	Isocarboxacida	IMA/IMB		
IMAO	Tranilcipromina	IMA/IMB	PAD	
IMAO	Pirásidol	IMA/IMB		
AMS	Nefazodona	AMS	5-HT _{2A} ,IRS	
AMS	Vilazodona	IRS,AMS	+ 5-HT _{1A}	
ASIR	Trazodona	IRS,AMS	5-HT ₂ , 5-HT _{1A}	α_1
CAR	Bupropion	CAR		
AD	Trimipramina	AD	5-HT ₂	H ₁ ,M ₁ , α_1 , α_2
MG	Tianeptina	MG		
ATC-S	Clomipramina	IRS	IRN, D ₂	M ₁ , α_1

Grupo farmacológico	Nombre genérico	Mecanismo de acción primario	Acciones secundarias	Efectos Adicionales
ATC-S/N	Amitriptilina	IRS/IRN		H ₁ ,M ₁ ,α ₁ ,α ₂
ATC-S/N	Amitriptilinoxida	IRS/IRN		H ₁ ,(M ₁),α ₁ ,α ₂
ATC-S/N	Dibenzepina	IRS/IRN		
ATC-S/N	Doxepina	IRS/IRN		H ₁ ,M ₁ ,α ₁
ATC-S/N	Imipramina	IRS/IRN		M ₁ ,α ₁
ATC-S/N	Metiltracen	IRS/IRN		M ₁
ATC-S/N	Protilipina	IRS/IRN		
ATC-N	Desipramina	IRN		(M ₁)
ATC-N	Lofepamina	IRN		M ₁ ,α ₁
ATC-N	Nortriptilina	IRN	IRS	M ₁ ,α ₁
ATetraC-S	Mianserina	α ₂	NaR	H ₁ ,α ₁
ATetraC-S	Setiptilina	α ₂	AMS	
ATetraC-N	Amoxapina	IRN		
ATetraC-N	Maprotilina	IRN		H ₁ ,(M ₁),α ₁

Fig. 4.2. Cuadro resumen antidepresivos más utilizados y mecanismo de acción. +5HT₁=estimulador receptor serotonina 1; 5-HT₂=antagonista receptor 2 de serotonina; 5-HT_{2c}=antagonista receptor 2c serotonina; 5-HT₃=antagonista receptor 3 serotonina; α₁=antagonista receptor α₁; α₂=antagonista receptor α₂; AD=antagonista receptor D₂ dopamina; AMS=antidepresivo modulador serotonina; APA=antipsicótico atípico; ASIR=inhibidor recaptación antagonista serotonina; ATC-N=antidepresivo tricíclico con efectos noradrenérgicos primarios; ATC-S=antidepresivo tricíclico con efectos serotoninérgicos primarios; ATC-S/N=antidepresivo tricíclico con efectos serotoninérgicos y noradrenérgicos; ATetraC-N=antidepresivo tetracíclico con efectos noradrenérgicos primarios; ATetraC-S=antidepresivo tetracíclico con efectos serotoninérgicos primarios; CAR=liberador catecolaminas; H₁=bloqueo de receptores de histamina 1; IMA=inhibidor monoamino oxidasa A; IMB=inhibidor monoamino oxidasa B; IMAO= inhibidor irreversible monoamino oxidasa A y B; IMAOR=inhibidor reversible monoamino oxidasa; IRD=inhibidor recaptación dopamina; IRN=inhibidor recaptación noradrenalina; IRDN=inhibidor recaptación dopamina y noradrenalina; IRS=inhibidor recaptación serotonina; IRSN=inhibidor recaptación serotonina y noradrenalina; ISRS=inhibidor selectivo recaptación serotonina; M₁ bloqueo de los receptores colinérgico muscarínicos 1; MG=modulador glutamatérgico; MT=antidepresivo melatoninérgico; MT1/MT2=agonista de los receptores de melatonina 1 y 2; NaASE=antidepresivo selectivo serotoninérgico y noradrenérgico; NaR= liberador noradrenalina. (Modificado de Baghai y cols., 2011).

La gran variedad de fármacos y efectos asociados a éstos de forma principal y secundaria es obvia solamente con los fármacos seleccionados para la tabla aunque tradicionalmente los efectos sobre la memoria se vienen estudiando en algunos de los más utilizados a partir de su desarrollo y salida al mercado farmacéutico que se verán en profundidad en el apartado siguiente.

4.3. Antidepresivos y memoria

Podemos encontrar una gran variedad de estudios y análisis de los efectos de los antidepresivos en el aprendizaje animal e incluso humano. En especial, en aprendizaje animal como hemos comentado hay una gran tradición en el estudio de este tipo de fármacos. Recurriendo a la literatura, podemos encontrar una amplia gama de diseños experimentales con diferentes parámetros y resultados de éstos, ya sea con los primeros IMAO (Carageorgiou y cols., 2003), con ATC (Takahashi y cols., 1995), con ISRS (Degroot y Nomikos, 2005) y otros antidepresivos (Ulak y cols., 2006).

La línea de investigación de la que surge esta tesis ha tenido como objetivo principal el observar los efectos de la administración aguda y crónica de antidepresivos como la amitriptilina, la maprotilina y la fluoxetina en el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria, separándolos de los posibles efectos debidos a la ansiedad, la actividad y la analgesia ya que éstos pueden influir en la conducta evaluada. Por otra parte, además se ha intentado dilucidar el posible efecto de

estas drogas en cuanto al aprendizaje dependiente de estado en la tarea de evitación inhibitoria, ya que este tipo de aprendizaje es un modelo conductual muy útil para explicar la influencia de sustancias en la memoria, y específicamente para el estudio de mecanismos de recuperación de la memoria (Arkhipov, 1999). Consecuentemente, estos efectos serían debidos a las influencias que tienen sobre diferentes sistemas de neurotransmisión, lo que a grosso modo y en conjunto podría explicar la influencia de los sistemas serotoninérgico, colinérgico y histaminérgico en los procesos mnésicos ya que se ha observado en la literatura que modulan de alguna manera el aprendizaje de esta tarea. Además se pretende observar cómo esta modulación se ve afectada por el sexo de los sujetos evaluados para obtener información dada la mayor prevalencia de episodios depresivos en el sexo femenino.

- Amitriptilina:

Uno de los antidepresivos con más tradición en cuanto a los experimentos realizados por el grupo de investigación. La amitriptilina es un antidepresivo tricíclico inhibidor mixto de la recaptación de noradrenalina y serotonina con efectos anticolinérgicos y antihistaminérgicos muy fuertes (Richelson, 2003). Produce efectos notorios sobre las funciones cognitivas y los nuevos compuestos son comparados con él (Thompson, 1991), además es el más eficiente en el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos (Richelson, 2001; Stahl, 1998) y las dosis más utilizadas en su administración aguda

en evitación inhibitoria son 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 y 30 mg/kg. También se ha evaluado su administración crónica en la dosis más alta.

En los primeros experimentos, se evaluaron los efectos de la administración aguda de amitriptilina en la adquisición/consolidación de memoria en ratones machos OF1 (Everss y cols., 1999) y en ratones CD1 de ambos sexos (Parra y cols., 2002). Tres dosis de este antidepresivo tricíclico fueron administradas inmediatamente después del entrenamiento en evitación inhibitoria. Los sujetos hicieron la prueba de memoria 24 horas después y se observó deterioro de la consolidación en las dosis 7,5, 15 y 30 mg/kg en los ratones OF1 y machos CD1, y las dosis 7.5 y 30 mg/kg en ratones hembras CD1. Las diferencias sexuales encontradas se limitaron a un efecto de la amitriptilina en la evitación inhibitoria mayor en los machos que en las hembras. Estos resultados indican que la administración aguda de amitriptilina produce amnesia retrógrada en la tarea de evitación inhibitoria, que no parece estar mediada por el efecto ansiolítico: cuando se testó la ansiedad en los ratones CD1 en el laberinto en cruz elevado durante un periodo de 5 minutos, 45 minutos después de haber recibido la dosis de amitriptilina, no se observaron efectos diferenciadores respecto a los controles además de haber inyectado el fármaco después del pase por la prueba de evitación lo que no afectaría a la ejecución de ésta.

Resultados posteriores, con la administración aguda del fármaco pre-entrenamiento (dosis 5, 7.5, 10, 15 y 30 mg/kg) y post-entrenamiento (dosis 30 mg/kg) mostraron únicamente efectos de deterioro en el aprendizaje de evitación inhibitoria en el caso de la administración aguda pre-entrenamiento (Urquiza, 2007). La relación dosis-respuesta del efecto de la amitriptilina en evitación pasiva (Parra y cols., 2009) fue también evaluada en las dosis 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg, que fueron administradas antes de la sesión de entrenamiento. Los resultados mostraron un claro efecto dosis-dependiente en el deterioro producido por la amitriptilina en machos y hembras; sin embargo, la dosis de 2.5 mg/kg no tuvo efecto en ningún sexo, la dosis de 5 mg/kg tuvo un efecto significativo solo en hembras y las dosis de 10 y 20 mg/kg produjeron efectos significativos similares en ambos sexos. Por otra parte, un estudio que evaluó los cambios en el metabolismo cerebral inducidos por el entrenamiento en evitación inhibitoria y la administración de amitriptilina también mostró un efecto deteriorante de la dosis de 20 mg/kg de esta sustancia en ratones machos (González-Pardo y cols., 2008).

En cuanto a su administración crónica, en un experimento de 21 días de administración de una dosis de 30 mg/kg en la adquisición y la consolidación de la evitación inhibitoria en machos y hembras de ratones CD1, se analizó como la amitriptilina, cuando se administraba después de la consolidación de la tarea, bloqueaba la recuperación de la memoria (Parra y cols., 2006). Cuando la amitriptilina era

administrada antes de la fase de entrenamiento, bloqueaba el aprendizaje de evitación inhibitoria en machos, y se observó una tendencia en hembras. Por el contrario, cuando el fármaco era administrado entre el entrenamiento y el test no afectaba el condicionamiento. La ansiedad y la actividad motora espontánea en el laberinto en cruz elevado fueron también evaluadas en los mismos sujetos pero no se observaron efectos del fármaco en estos casos, lo que podría indicar que los efectos de la amitriptilina sobre estas conductas serían independientes de los observados en la evitación pasiva.

Otros experimentos fueron realizados buscando las relaciones de modulación de otras sustancias sobre el efecto de la amitriptilina, por ejemplo, el caso de la modulación ejercida por el piracetam (fármaco nootrópico derivado cíclico de aminoácido y neurotransmisor GABAérgico que mejora el funcionamiento de la acetilcolina y se utiliza para deterioro cognitivo) en la administración crónica y aguda de la amitriptilina en evitación inhibitoria en ratones CD1 machos y hembras (Everss y cols., 2005). El propósito en este caso fue estudiar los efectos de la amitriptilina en la cognición animal en relación con las características de sus efectos terapéuticos. Se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, se administró 60 minutos antes del entrenamiento una dosis de 100 mg/kg de piracetam o el mismo volumen de suero salino; después los animales realizaban la prueba de entrenamiento y tras ella se administraron 30mg/kg de amitriptilina o suero fisiológico. Un día después los animales se sometían a la

prueba de recuerdo o test. En el experimento 2, las mismas dosis de piracetam y amitriptilina fueron administradas crónicamente; los ratones se sometían al entrenamiento de la tarea de evitación en el día 22 tras empezar con el tratamiento y la prueba de recuerdo se realizó 24 horas después del entrenamiento. Tras el test o prueba de recuerdo, los sujetos fueron evaluados en el laberinto en cruz elevado y se observaron los siguientes cambios conductuales: la amitriptilina aguda y crónica produjo efectos deteriorantes sobre la evitación inhibitoria tanto en machos como en hembras; el piracetam amortiguaba los efectos de la administración aguda de amitriptilina en la tarea; el piracetam amortiguaba el efecto de la amitriptilina en su administración crónica en los machos pero no en las hembras en la misma tarea (los efectos no parecían mediados por acciones colaterales no debidas a la acción del fármaco sobre el aprendizaje de la tarea).

Además se realizaron otra serie de experimentos para analizar los efectos de modulación de la administración aguda de amitriptilina en el sistema colinérgico en la evitación inhibitoria en ratones machos y hembras CD1 (Monleón y cols., 2009; Urquiza, 2007). Los efectos amnésicos producidos por la amitriptilina (5, 10 o 15 mg/kg) no fueron completamente anulados por la administración del agonista colinérgico oxotremorina (0.05, 0.1 mg/kg), pero se observó una tendencia en esa dirección. A pesar del efecto deteriorante producido por 5 mg/kg de amitriptilina que fué compensado

con diferentes dosis del agonista colinérgico fisostigmina (0.15, 0.3 y 0.6 mg/kg); es decir, que la fisostigmina mejoró la memoria de la evitación inhibitoria mejor que la oxotremorina de los efectos deteriorantes producidos por la amitriptilina. Estas diferencias en los efectos de estas sustancias agonistas colinérgicas podrían ser debidas a los diferentes mecanismos de acción que poseen. Por su parte, la oxotremorina, es un ligando presente en los cinco subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (Choi y cols., 1973), por otra parte, la fisostigmina, es un potente inhibidor de la colinesterasa (Taylor, 2001) que aumenta los niveles de acetilcolina y que eventualmente interacciona con los receptores muscarínicos y nicotínicos. Estos resultados demuestran que el deterioro producido por la amitriptilina en la evitación inhibitoria tanto en ratones machos como en hembras está mediado al menos en algún grado por el sistema colinérgico.

En cuanto a la modulación de los efectos de la administración aguda de amitriptilina en la evitación inhibitoria por el sistema serotoninérgico en ratones machos y hembras CD1 (Parra y cols., 2010). Una combinación de 2.5 mg/kg de amitriptilina con fluoxetina (10, 15 o 20 mg/kg), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, reveló que la administración conjunta de amitriptilina 2.5 mg/kg y de fluoxetina 15 mg/kg tenía un claro efecto deteriorante en evitación inhibitoria. Estos resultados remarcan la influencia del sistema serotoninérgico en los efectos de la amitriptilina.

En cuanto al papel del sistema histaminérgico en la modulación de la administración aguda de amitriptilina en ratones machos y hembras CD1, la amitriptilina (10 mg/kg) produjo efectos amnésicos que no fueron modificados por la administración de un precursor histaminérgico, la L-histidina (1000 mg/kg) o el antagonista de los receptores H1, pirilamina (20 mg/kg). La L-histidina (250, 500, o 1000 mg/kg) fue también administrada sola y no producción ningún efecto en la evitación inhibitoria. La pirilamina (5, 10, o 20 mg/kg) tampoco produjo ningún efecto cuando se administró sola. Ninguno de los dos tipos de manipulación del sistema histaminérgico tuvo efecto en la evitación inhibitoria además de no producir efecto alguno de mejoría en la memoria de la tarea cuando se administró en combinación con amitriptilina.

Por último, se diseñaron una serie de experimentos para averiguar la implicación que diferentes antidepresivos podían tener en el aprendizaje dependiente de estado en evitación inhibitoria en ratones machos y hembras CD1 (Arenas y cols., 2006). Los antidepresivos utilizados fueron amitriptilina (30 mg/kg), maprotilina (25 mg/kg) y fluoxetina (15 mg/kg). El aprendizaje dependiente de estado es un fenómeno cognitivo en el cual el recuerdo de una información recientemente adquirida solo es posible si el sujeto se encuentra en el mismo estado fisiológico que cuando ha codificado esa información. Para estudiar este fenómeno, se diseñaron experimentos con grupos independientes para cada tratamiento y cada sexo con lo que los grupos resultantes fueron: sujetos que recibieron

suero fisiológico antes de la fase de entrenamiento; suero fisiológico antes del entrenamiento y amitriptilina antes de la fase de test y amitriptilina antes de cada fase, tanto entrenamiento como test. El intervalo entre las fases fue de 24 horas. Los resultados no mostraron aprendizaje dependiente de estado con amitriptilina, solamente se podían interpretar como un deterioro en el aprendizaje de la tarea ya que los grupos que recibieron cualquier dosis de cualquier fármaco antes de la tarea de entrenamiento no presentaron latencias más altas, con independencia del tratamiento recibido antes de la fase de test (Overton, 1974). Dicho deterioro era más acusado en los grupos de machos que en los de hembras.

- Maprotilina:

Es un antidepresivo tetracíclico que se prescribe sobretudo en personas de edad avanzada (Gareri y cols., 2000). Inhibe selectivamente la recaptación de noradrenalina y tiene un gran efecto antihistaminérgico además de un bajo efecto inhibidor de la recaptación de serotonina (Gareri y cols., 2000; Harvey y cols., 2000).

Este compuesto tiene menos efectos colaterales que los antidepresivos tricíclicos clásicos (Grüter y Pöldinger, 1982), pero lo que tiene en común con estos es un efecto deteriorante sobre la memoria (Gareri y cols., 2000). Los efectos de la administración aguda de maprotilina en la evitación inhibitoria se evaluaron en las dosis 2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/kg. Las dosis 5, 10, 20 y 25 mg/kg fueron evaluadas también después

de la administración crónica y los de las dosis 15, 20 y 25 mg/kg también en administración subcrónica en aprendizaje espacial.

Los efectos de este fármaco antidepresivo se evaluaron en administración crónica (5, 10 o 20 mg/kg) en evitación inhibitoria en ratones machos OF1 (Parra y cols., 2000). La administración aguda antes del entrenamiento no produjo efectos en la conducta de los sujetos en el entrenamiento pero si en el test en las dosis de 5 y 20 mg/kg. Cuando se administraron después del entrenamiento, no se observaron efectos en el test en ninguna de las dosis. Con el tratamiento crónico después de 21 días y suspendido 24h. antes de la prueba de entrenamiento también se observaron efectos en el test. Además en un experimento realizado con sujetos no tratados para evaluar los efectos agudos de las dosis de maprotilina usadas anteriormente en la analgesia, no se observó ningún efecto analgésico y se pudo concluir que la maprotilina aguda produjo deterioro mnésico anterógrado y no hubo tolerancia en los tratamientos crónicos con esta sustancia.

Se evaluaron también efectos de un amplio rango de dosis de maprotilina (2.5, 5, 10, 20 y 25 mg/kg) en la actividad motora, analgesia, ansiedad y aprendizaje en machos y hembras de la cepa CD1 de ratones. Los resultados mostraron que las dosis más altas (15, 20 y 25 mg/kg) en administración aguda produjeron deterioro en el aprendizaje de evitación inhibitoria; la dosis más alta produjo un efecto ansiolítico en

las hembras y la dosis más alta y la segunda tras ella (25 y 20 mg/kg) redujeron la actividad locomotora. Un estudio de analgesia con las tres dosis más altas de maprotilina (15, 20 y 25 mg/kg) concluyó que la dosis más alta sí producía analgesia, algo que pudo influir en algunos casos en los deterioros del aprendizaje encontrados aunque ninguna influencia fue observada en la actividad motora por lo que se podría atribuir a conductas totalmente independientes. Éstos resultados podrían llevar a hipotetizar que la maprotilina afecta solamente la adquisición de la conducta, más específicamente el procesamiento del estímulo. En relación con todas las diferencias sexuales observadas este estudio fueron en la misma línea que los resultados previamente observados en tanto en cuanto los fármacos afectan en mayor medida el aprendizaje de los machos que de las hembras.

- Fluoxetina:

Es un antidepresivo selectivo de la recaptación de serotonina con una pequeña afinidad por los receptores muscarínicos, histamínicos H1, serotoninérgicos 5-HT1 o 5-HT2, o noradrenérgicos alpha 1 o alfa 2 (Beasley y cols., 1992; Stark y cols., 1985). Sus efectos cuando se administra de forma aguda fueron evaluados en dosis de 5, 10, 15 y 20 mg/kg, al igual que se estudió su efecto con administración crónica de la más alta dosis (20 mg/kg) en el aprendizaje de la evitación inhibitoria.

En los experimentos dirigidos a evaluar sus efectos en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria con administración aguda, se administraron 3 dosis (5, 10 y 20 mg/kg) en ratones machos y hembras de la cepa OF1 (Monleón y cols., 2001). La fluoxetina se administró inmediatamente después de la sesión de entrenamiento y 4 días después se evaluaba mediante el test o la prueba de recuerdo. Los resultados mostraron aprendizaje de la tarea en todos los grupos de tratamiento, sin embargo, los que recibieron dosis más altas mostraron latencias significativamente más largas en evitación inhibitoria que los que recibieron tratamiento con dosis más bajas o con suero fisiológico. Estos efectos encontrados no pueden atribuirse a efectos inespecíficos de los fármacos como ocurre cuando se administra antes del pase por la prueba de entrenamiento (McGaugh, 1989). Las diferencias sexuales encontradas coinciden con todas las anteriores con otros fármacos siendo menos afectadas por los tratamientos las hembras, lo que apunta a un mejor recuerdo de la tarea, hecho que ocurre también cuando los sujetos no han recibido tratamiento alguno (sujetos controles), con un mejor aprendizaje por parte del sexo femenino. Se evaluó también complementariamente la actividad locomotora, no observando ningún tipo de diferencia entre los grupos de tratamiento ni respecto al control.

En otro experimento, el efecto agudo de la fluoxetina (10, 15 y 20 mg/kg) fue analizado en ratones machos y hembras de la cepa CD1 con una administración del fármaco 30 minutos

antes del entrenamiento y con un intervalo respecto al test de 24 horas (Parra y cols., 2010). La fluoxetina no deterioró la memoria de los sujetos en ningún caso mostrando un mejor aprendizaje de la tarea las hembras independientemente del grupo de tratamiento, de acuerdo con resultados previos y a la literatura encontrada, hecho que sugiere que las diferencias sexuales en el efecto de fármacos psicotrópicos en la memoria de ratones es generalmente más fuerte en machos mientras la evitación inhibitoria se muestra más consistentemente en hembras.

En cuanto al efecto del tratamiento crónico con fluoxetina (20 mg/kg) en evitación inhibitoria en ratones machos y hembras CD1 (Monleón y cols., 2002). En el primer de los experimentos, la sustancia fue administrada por 21 días antes de la sesión entrenamiento, en el segundo, el tratamiento fue el mismo pero empezó 24 horas después de la sesión de entrenamiento. Los resultados del primer experimento revelaron un deterioro del aprendizaje para los machos y no para las hembras, diferencias en la conducta que ya se observaban en animales controles, no presentando diferencias en la actividad locomotora. Los efectos encontrados en la administración post-entrenamiento de fluoxetina (Experimento 2) apuntan a la idea de que los efectos del fármaco sobre la evitación inhibitoria están relacionados únicamente con el aprendizaje y la memoria, concluyendo con estos datos que la administración crónica de fluoxetina deteriora la memoria de

evitación inhibitoria cuando se administra pre-entrenamiento y no post-entrenamiento.

El último estudio realizado con este fármaco, trató de analizar como contribuía la administración de fluoxetina (15 mg/kg) en la formación de la memoria dependiente de estado (procedimiento seguido de la misma manera con la amitriptilina y maprotilina) (Arenas y cols., 2006). Los efectos encontrados demostraron que la fluoxetina no deterioró este tipo de condicionamiento.

Para concluir este capítulo que condujo a la realización de esta tesis, vamos a señalar las ideas principales que se pueden extraer de todos los estudios aquí enumerados.

En general, la administración pre-entrenamiento aguda de amitriptilina y maprotilina deteriora la adquisición de evitación inhibitoria en un gran rango de dosis, mientras la fluoxetina no produce este efecto.

La administración post-entrenamiento produce resultados ambiguos. La administración de amitriptilina podría tener efectos mínimos o ninguno. La maprotilina no produce efectos y la fluoxetina en dosis altas produce una mejora de la consolidación de la memoria.

En cuanto al tratamiento crónico, la administración pre-entrenamiento produce deterioro en el aprendizaje de evitación inhibitoria con amitriptilina y fluoxetina. Los machos son más afectados que las hembras por estos antidepresivos con un deterioro en la adquisición de evitación inhibitoria observado

en dosis altas. La maprotilina, que fue testada en administración crónica solamente pre-entrenamiento, mostró un efecto bifásico: las dosis más altas y más bajas deterioraban la adquisición de la conducta de evitación pero no la dosis intermedia utilizada.

La maprotilina y la amitriptilina en altas dosis reducen la actividad locomotora aunque este efecto no parece impedir o contrarrestar el deterioro en el aprendizaje de la evitación inhibitoria, porque los animales cruzaban de un compartimento a otro más rápidamente que los controles (mientras que la disminución de la actividad locomotora contribuiría a que los animales tardaran más en cruzar). Por otra parte, habría una explicación para este hecho ya que la farmacocinética descartaría la opción de la influencia de los efectos motores sobre la prueba de evitación porque habría un intervalo temporal suficiente para que el fármaco se hubiera eliminado del organismo. Los antidepresivos que afectarían esta actividad según nuestros datos serían amitriptilina y maprotilina, pero no fluoxetina.

También se evaluaron los efectos de estos fármacos sobre los niveles de ansiedad de los ratones y solamente se observaron efectos ansiogénicos en las hembras al ser tratadas con la dosis más alta de maprotilina; la amitriptilina no produjo efectos en ninguna de sus dosis y la fluoxetina no se testó en este aspecto. La misma dosis efectiva de maprotilina sobre la ansiedad produjo asimismo efectos sobre la analgesia en sujetos machos y hembras, pudiendo enmascarar los

resultados sobre el aprendizaje de evitación inhibitoria por lo que se concluyó que esta dosis no era adecuada para ser testada mediante esta prueba conductual.

El aprendizaje dependiente de estado (SDL por su acrónimo en inglés) es un fenómeno conductual que puede explicar ciertos efectos de las drogas sobre la memoria, o más específicamente en los mecanismos de recuperación de la memoria (Arkhipov, 1999) y se utiliza para observar las respuestas aprendidas cuando los animales están bajo la influencia de diferentes drogas, para poder concluir que las drogas administradas producen efectos facilitadores sobre el estado del animal para producir la misma conducta aprendida (Overton, 1974, 1984). Arenas y cols. (2006) evaluaron el posible SDL de estos tres antidepresivos no encontrando SDL con ninguno de ellos. En el caso de la amitriptilina, los resultados fueron interpretados como un déficit de memorización, mientras que con la maprotilina se atribuyeron simultáneamente a un déficit de memorización y una facilitación de la ejecución debido a deterioro motor. Finalmente, la fluoxetine no produjo ningún efecto deteriorante sobre el condicionamiento de evitación inhibitoria.

Los resultados en general llevan a especular que las diferencias observadas en los efectos de estas sustancias pueden ser explicadas por sus distintos mecanismos de acción sobre el sistema colinérgico; i.e. a más efecto anticolinérgico, más déficit memorístico. Los resultados obtenidos bajo tratamientos agudos no deben ser considerados como un

modelo clínico de tratamiento ya que los antidepresivos se prescriben en tratamiento crónico con gran margen temporal en sus efectos clínicos. No obstante, estos resultados al igual que otros parecidos, intentan comprender mejor el efecto que estos fármacos producen en los procesos mnésicos, que es algo muy importante para mejorar en su prescripción en humanos.

Los neurotransmisores histamina, acetilcolina y serotonina han sido relacionados con la adquisición y consolidación de la memoria en tareas de evitación inhibitoria (Babar y cols., 2002; Eidi y cols., 2003). El efecto amnésico producido por la amitriptilina en nuestro laboratorio no está confinado al sistema colinérgico (Monleón y cols., 2009; Urquiza, 2007). De hecho, el sistema serotoninérgico también parece estar implicado (Parra y cols., 2010): la administración combinada de amitriptilina y fluoxetina, a dosis inefectivas por sí solas, tuvo efectos deteriorantes en la evitación inhibitoria. Creemos que esto representa un efecto sinérgico de ambas drogas que confirma la implicación del sistema serotoninérgico en el deterioro producido por la amitriptilina en evitación inhibitoria en ratones. Por otra parte, el sistema histaminérgico no parece estar implicado en este efecto deteriorante de la amitriptilina (Ferrer-Añó, 2008).

El uso de ambos sexos, machos y hembras es especialmente relevante en estudios con animales acerca de desórdenes donde las diferencias han sido descritas en

humanos. De hecho, los estudios epidemiológicos han mostrado que la prevalencia en la vida de las personas de los episodios de trastorno depresivo mayor es mucho más alta en mujeres (21,3%) siendo casi el doble que en hombres (12,7%). Este ratio ha sido documentado en diferentes países y grupos étnicos (Noble, 2005). Estas diferencias sexuales han sido observadas en otros tipos de trastornos mentales al igual que en la respuesta al tratamiento (Franckiewicz y cols., 2000). Las diferencias sexuales en sujetos controles fueron observadas en algunos experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, con hembras exhibiendo latencias más largas que los machos en la fase test, aprendiendo mejor las hembras la conducta de evitación inhibitoria. Se han observado efectos sexodimórficos de la administración tanto de amitriptilina, maprotilina y fluoxetina en el aprendizaje de evitación inhibitoria. Por otro lado, teniendo este dimorfismo en cuenta, los efectos de las sustancias administradas han sido más fuertes en los sujetos machos que en las hembras.

Muchos ensayos preclínicos se realizan solamente con machos debido a una mayor variabilidad presupuesta, no confirmada en nuestro laboratorio (Parra y cols., 1999). Esta política es por una parte inapropiada dado que las mujeres consumen más medicaciones psicotrópicas que los hombres (Cafferata y cols., 1983). Además hay importantes razones para evaluar el impacto de los antidepresivos en ambos sexos:

- a. Las diferencias sexuales en la epidemiología de la depresión que es mucho más común en mujeres que en
-

hombres (American Psychiatric Association, 2013; Korstein, 1997).

- b. Las diferencias sexuales en la eficacia de algunos antidepresivos, como de la maprotilina y la fluoxetina (Martényi y cols., 2001).
- c. Las diferencias en la farmacocinética y farmacodinamia entre hombres y mujeres han sido confirmadas en diferentes sustancias, incluyendo los antidepresivos (Frackiewicz y cols., 2000; Gandhi y cols., 2004).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por nuestro grupo sobre los efectos de los antidepresivos sobre la memoria (comentados anteriormente), nos planteamos profundizar más sobre dichos efectos indagando sobre los sistemas de neurotransmisión implicados en dichos efectos. Con tal fin se diseñó el proyecto que dio lugar a la presente tesis doctoral. Para ello, se escogieron fármacos más selectivos incidentes en dos de los sistemas de neurotransmisión evaluados en estudios previos: el colinérgico y el serotoninérgico. Concretamente, los fármacos seleccionados fueron: el antagonista colinérgico escopolamina, al agonista colinérgico fisostigmina y el serotoninérgico R(+)-8-OH-DPAT.

CAPÍTULO 5:
OBJETIVOS E
HIPÓTESIS

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido investigar la intervención del sistema colinérgico y serotoninérgico (por sí solos o en combinación) en el efecto producido por la administración aguda de escopolamina, fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT post-entrenamiento en el aprendizaje de la evitación inhibitoria en ratones machos y hembras a lo largo de tres etapas de su ciclo vital (prepuberales, postpuberales y adultos).

Numerosos estudios con roedores concluyen que la manipulación farmacológica de los sistemas de neurotransmisión colinérgico y serotoninérgico y sus interacciones tienen gran importancia en la consolidación y la recuperación de memoria en tareas como la evitación inhibitoria (e.g. Myhrer, 2003; Monleón y cols., 2008; Stancampiano y cols., 1999).

Está ampliamente constatado que los fármacos anticolinérgicos, como algunos antidepresivos y otros fármacos más selectivos sobre este sistema de neurotransmisión, producen deterioro en el aprendizaje y la memoria de evitación inhibitoria en roedores. La escopolamina, fármaco anticolinérgico no selectivo de los receptores muscarínicos, provoca déficits de memoria y específicamente en la memoria de aprendizaje de evitación inhibitoria (Gutierrez y cols., 2012; Huang y cols., 2011; Lana y cols., 2013; Liu y Liang, 2009; Marisco y cols., 2013; Ohno y Watanabe, 1996; Roldán y cols., 1997,2001).

Igualmente, existe una amplia bibliografía que concluye que la administración de agonistas colinérgicos produce efectos beneficiosos en el aprendizaje y la memoria de diferentes tareas (e.g. Gold, 2003; Pavone y cols., 1993). Entre estos agonistas aparece la fisostigmina como fármaco facilitador de la memoria para la tarea de evitación inhibitoria (Baratti y cols., 1979; Degroot y Parent, 2001; Jafari-Sabet, 2006; Monleón y cols., 2009; Zarrindast y cols., 2002).

Algunos estudios revelan que existen efectos deteriorantes sobre el aprendizaje de evitación inhibitoria al administrar R-(+)-8-OH-DPAT, fármaco antagonista selectivo dual de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ de serotonina (Eriksson y cols., 2012; Jackson y cols., 1994; Misane y Ögren, 2000). Estos resultados revelan una influencia importante de este sistema de neurotransmisión sobre el aprendizaje emocional evaluado mediante esta prueba.

Partiendo de estos datos, las principales hipótesis de esta tesis serán:

1. La administración aguda post-entrenamiento de escopolamina y de R-(+)-8-OH-DPAT deteriorarán la de fisostigmina facilitará la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria.
 2. Los efectos serán mayores en los machos que en las hembras, según los resultados previos recogidos en la literatura.
-

3. Los efectos serán visibles en todas las etapas vitales de los ratones (prepuberal, postpuberal y adulta), aunque el efecto será más acusado en edades o etapas más tempranas por la menor madurez del sistema nervioso central.
4. Los efectos sobre la consolidación de la memoria serán debidos únicamente a la acción directa de estos fármacos sobre mecanismos mnésicos y no a efectos secundarios sobre movilidad o ansiedad de los animales a la hora de realizar la prueba puesto que la administración se realiza inmediatamente después de la misma.
5. Los efectos de los fármacos serán más notables a medida que aumenta la dosis del fármaco y en los grupos de combinación de fármacos se verán efectos sumatorios. Esto resultará en deterioro todavía más notable en los grupos de combinación de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT y de anulación de efectos en los grupos de combinación de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT.

Para contrastar estas hipótesis de trabajo, llevamos a cabo los siguientes experimentos:

Experimento 1:

En el primer experimento se evaluaron los efectos agudos de escopolamina y de R-(+)-8-OH-DPAT sobre la evitación

inhibitoria en ratones machos y hembras prepuberales (3 semanas de edad) de la cepa CD-1 de Harlan. Se utilizaron tres dosis de cada fármaco: 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg y 3.0 mg/kg de escopolamina y 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg y 0.3 mg/kg de R-(+)-8-OH-DPAT, así como la combinación de las correspondientes dosis bajas, medias y altas. Los fármacos fueron administrados inmediatamente post-entrenamiento con el fin de estudiar si afectaban en el proceso de adquisición de aprendizaje y evitar así posibles efectos no debidos a ello. Se utilizaron ratones machos y hembras con el fin de evaluar las posibles diferencias sexuales, de forma similar a las ya observadas con otros fármacos colinérgicos y serotoninérgicos (e.g. Monleón y Parra, 1997; Parra y cols., 1999).

Experimento 2:

En el segundo experimento se estudiaron los efectos agudos de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en ratones machos y hembras postpuberales (5 semanas de edad) siguiendo el mismo procedimiento y diseño que en el experimento anterior.

Experimento 3:

En el tercer experimento se evaluaron los efectos de los mismos fármacos escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT sobre la evitación inhibitoria en ratones en etapa adulta (7 semanas de edad) en ambos sexos. El procedimiento y el diseño utilizados fueron los mismos que en los experimentos 1 y 2.

Experimento 4:

Este experimento no estaba planeado inicialmente en esta tesis. A raíz de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores (Experimento 1, 2 y 3) y por la gran experiencia del grupo de investigación en la tarea de evitación inhibitoria se planteó un experimento extra con el objetivo de evaluar las diferencias en la conducta de evitación inhibitoria en ratones de la misma cepa CD-1 con distinta procedencia. Este grupo de investigación, en anteriores experimentos similares había utilizado como sujetos experimentales ratones CD-1 del proveedor Charles River y como veremos en el apartado de “Resultados” correspondiente, anomalías en las conductas de los ratones utilizados en los 3 primeros experimentos de esta tesis (ratones CD-1 del proveedor Harlan), cobró fuerza la hipótesis de que la conducta de evitación inhibitoria no era la misma para los ratones de la misma cepa pero de proveedor distinto.

El objetivo finalmente de este experimento fue el observar las diferencias en el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria para ratones machos y hembras CD-1 en edad adulta (70 días) de tres proveedores distintos: Charles River, Harlan y Janvier.

Experimento 5:

En este experimento, dados los resultados obtenidos en los experimentos anteriores y especialmente con las conclusiones

obtenidas en el “Experimento 4”, el objetivo fundamental fue analizar los efectos de la administración aguda post-entrenamiento de escopolamina (dosis: 0.3mg/kg, 1mg/kg y 3 mg/kg), R-(+)-8-OH-DPAT (dosis: 0.1mg/kg, 0.2mg/kg y 0.3mg/kg) y su combinación correspondiente de dosis bajas, medias y altas en la adquisición del aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras CD-1 de Charles River en edad prepuberal (3 semanas de edad).

Experimento 6:

El objetivo principal en este caso fue evaluar los efectos de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en la adquisición del aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras CD-1 de Charles River en edad postpuberal (5 semanas de edad).

Experimento 7

El objetivo fundamental de este experimento fue el mismo que el anterior y que el “Experimento 3” pero los ratones utilizados fueron ratones machos y hembras CD-1 de Charles River en edad adulta (70 días).

Experimento 8

Este experimento tuvo como finalidad fundamental estudiar los efectos de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT en la adquisición del aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones prepuberales (3 semanas de edad) machos y hembras. Para

ello se utilizaron 3 dosis de fisostigmina de 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg y 0.3 mg/kg y 3 dosis de R-(+)-8-OH-DPAT de 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg y 0.3 mg/kg así como su combinación de dosis bajas, medias y altas y se administraron post-entrenamiento a ratones CD-1 Charles River de ambos sexos . El diseño y el procedimiento fue igual que en los anteriores experimentos con la salvedad de que la escopolamina fue substituida por fisostigmina.

Experimento 9

El penúltimo experimento tuvo como objetivo el mismo que el anterior y se realizó mediante el mismo procedimiento, los mismos fármacos y dosis utilizadas en el Experimento 8 pero los sujetos de estudio se encontraban en edad postpuberal (5 semanas de edad).

Experimento 10

Siguiendo con la línea de los dos experimentos anteriores (Experimento 8 y 9), el último experimento de esta tesis trató de observar los efectos de los mismos fármacos con las mismas dosis y procedimiento sobre la misma conducta de evitación inhibitoria en sujetos en edad adulta (7 semanas de edad).

CAPÍTULO 6

EXPERIMENTO 1: Efectos

de la administración de

escopolamina y R-8-OH-

DPAT en evitación

inhibitoria de ratones

prepuberales Harlan

6.1. Introducción

En los últimos 20 años, numerosos descubrimientos del campo de la neurobiología de la memoria han apoyado la hipótesis de que el mal funcionamiento colinérgico está ligado a déficits de memoria (e.g. Gold, 2003; Stahl, 2008). Esto es evidente en pacientes de Alzheimer con disfunciones cognitivas severas, en especial de memoria.

Uno de los fármacos con probada eficacia tanto en animales como en humanos en deteriorar diferentes sistemas de memoria es la escopolamina. Su nombre deriva de *Scopola carniolica*, la planta solanácea de la que proviene y que debe su nombre probablemente a su descubridor, J.A. Scopoli. Es un alcaloide natural que se obtiene del procesamiento químico de la semilla del popularmente llamado “borrachero” o como se conoce su fruto, cacao sabanero: *Datura stramonium* (Camelo y Ardila, 2013). Históricamente nuestros antepasados hicieron uso de ella por su propiedades amnésicas, alucinatorias o en general tóxicas y por su rápido mecanismo de acción en brebajes y pociones “mágicas” y actualmente su uso popular ha derivado en delictivo (Klinkenberg y Blokland, 2010). En la clínica, ha sido utilizada para inhibir los efectos de la activación parasimpática, como pre-medicación en anestesia para reducir la salivación excesiva y secreciones del tracto respiratorio, como antinauseoso e incluso como “droga de la verdad” en aplicaciones al ámbito judicial.

En contextos de investigación se ha estudiado como antidepresivo en pacientes que no responden al tratamiento

convencional con antidepresivos comercializados (Witkin y cols., 2014) y en el campo de la neuropsicofarmacología es una referencia como modelo de demencia animal y humana (Azami y cols., 2010; Klinkenberg y Blokland, 2010; Quartermein y Leo, 1988). Sus efectos son debidos a su gran potencia anticolinérgica, siendo un agonista competitivo no selectivo de los receptores muscarínicos de acetilcolina.

Múltiples trabajos en roedores han mostrado un gran efecto de deterioro en el aprendizaje y memoria de evitación inhibitoria con la administración pre-entrenamiento de escopolamina en un rango muy amplio de dosis. Entre ellas, Huang y cols. (2010), hacen uso de tres dosis de 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg y 0.3 mg/kg; Lo y cols. (2014), utilizan una dosis de 0.5 mg/kg; Costa y cols. (2010), administran 1.0 mg/kg de escopolamina y Botton y cols. (2010), utilizan una dosis de 2 mg/kg.

En cuanto a la administración post-entrenamiento los resultados en la literatura no son tan coincidentes. Gutierrez y cols. (2012) administran 1 mg/kg post-entrenamiento encontrando deterioro en evitación inhibitoria en ratas adultas machos; Quirarte y cols. (1994) administran una dosis post-entrenamiento de 8 mg/kg no encontrando diferencias en el aprendizaje, y Rush (1988), administrando varias dosis en ratones solo encuentra deterioro con las dosis más altas (10 y 30 mg/kg). La administración post-entrenamiento debería mostrar resultados más específicos sobre el proceso de

memoria evitando un efecto anticolinérgico general sobre otros procesos no evaluados.

Por otra parte, el R-(+)-8-OH-DPAT, es uno de los enantiómeros de 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2(di-n-propyl-amino tetralin), un agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A} de serotonina. Es conocido que los agonistas de estos receptores, producen diferentes alteraciones conductuales como son cambios en la actividad locomotora general, (Curzon, 1990; Dourish y cols., 1985; Evenden y Angeby-Moller, 1990), en los umbrales nociceptivos (Hamon y cols., 1990) y conllevan un síndrome conductual característico (síndrome serotoninérgico) (Tricklebank y cols., 1984; Berendsen y cols., 1989; Blanchard y cols., 1993). Una variedad de estudios han demostrado la importancia de estos receptores en la memoria de evitación pasiva, administrando varias dosis de R-(+)-8-OH-DPAT pre-entrenamiento y causando deterioro en la memoria de esta tarea en roedores (e.g. Carli y cols., 1992; Misane y cols., 1998a; Misane y Ogren, 2000). Contrariamente, en dosis bajas de este mismo compuesto se han encontrado resultados de mejora en la retención de esta tarea como los reportados por Cole y cols. (1994). En algunos estudios, el deterioro ha sido atribuido a la estimulación de los receptores post-sinápticos de 5-HT_{1A} y la mejoría a la estimulación de los mismos receptores pre-sinápticos (Lüttgen y cols., 2005; Misane y cols., 1998a).

Algunos autores, como Stancampiano y cols. (1999), abogan por la posible modulación de los sistemas colinérgico y serotoninérgico sobre el funcionamiento del hipocampo y otras

estructuras límbicas, algo que justificaría en esta área de estudio administrar fármacos selectivos para estos dos sistemas y la evaluación de estos efectos en tareas de aprendizaje y memoria.

En los experimentos de este campo donde los fármacos son administrados inmediatamente después del entrenamiento de la evitación inhibitoria, los efectos de los fármacos se atribuyen a su influencia en la consolidación de la memoria, algo que ocurre inmediatamente después del entrenamiento (McGaugh, 1989).

Siguiendo este razonamiento y enlazando con nuestra línea de investigación, en este y en próximos experimentos se intentó clarificar cómo estos dos fármacos selectivos, escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT, modulan la consolidación de este aprendizaje, administrando varias dosis de estas sustancias después del entrenamiento, solas o en combinación. En este primer experimento se evaluaron estos efectos sobre la evitación inhibitoria en sujetos prepuberales de ambos sexos.

6.2. Material y método

- *Sujetos:*

Se utilizaron 100 ratones machos y 100 ratones hembras de la cepa CD-1 de laboratorios Harlan (Holanda) de 3 semanas de edad con pesos comprendidos entre 22-32 g para los machos y 15-23 g para las hembras a su llegada al

laboratorio. Los sujetos fueron alojados en grupos de 4 en jaulas de plástico traslúcido (25x25x14 cm³) permaneciendo en condiciones estándar de laboratorio, con agua y comida *ad libitum*, con una temperatura ambiental controlada de 21 ± 2 °C y bajo un ciclo de luz-oscuridad invertido (oscuridad 08:00-20:00 h). El experimento se realizó durante el periodo de oscuridad y los animales tuvieron un periodo de adaptación al animalario de 7 días.

- *Fármacos*

Se utilizaron bromhidrato de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) que fueron disueltos en suero salino e inyectados intraperitonealmente (*i.p.*) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. El grupo control recibió el mismo volumen de suero salino.

Las tres dosis de escopolamina fueron 0.3; 1.0 y 3.0 mg/kg y las de R-(+)-8-OH-DPAT 0.1; 0.2 y 0.3 mg/kg, seleccionadas a partir del rango de dosis frecuentes recogidas en la literatura.

- *Aparatos*

Se empleó una caja de evitación inhibitoria (Ugo Basile, Comerio-Varesse, Italia). La cual consta fundamentalmente de una caja rectangular y un controlador. La caja está dividida en dos compartimentos de iguales dimensiones separados por una puerta deslizante controlada automáticamente. El compartimento de salida es blanco y está constantemente

iluminado por una luz blanca dispuesta en el techo (24v-10w). El otro compartimento es negro y permanece constantemente a oscuras. El techo de la caja, que incluye los dos compartimentos, es el único acceso que tenemos a su interior y funciona con un sistema de bisagras. El suelo está compuesto por varillas paralelas de acero inoxidable y funciona como un balancín regulable por peso, con un punto de apoyo central que al inclinarse al pasar el animal resulta en el cierre de la puerta deslizante. Al colocar al animal en la caja, tras un periodo de adaptación, la puerta que separa los compartimentos se abre y cuando el animal cruza al compartimento negro la puerta se cierra automáticamente y se le administra una descarga eléctrica en las patas a través del suelo de rejilla. La caja de evitación se introdujo en una caja de aislamiento cerrada para evitar los posibles distractores.

El aparato va conectado al controlador en el cual se contabilizan las latencias y se pueden regular los parámetros que se van a utilizar (periodo de adaptación, intensidad de la descarga eléctrica y duración de la misma, así como la máxima duración del ensayo). Además, al controlador va conectado un pedal mediante el cual se da comienzo a cada ensayo accionándolo.

- Procedimiento

Los ratones fueron divididos en 10 grupos en cada sexo (n = 10) en función del tratamiento a recibir. Cada condición recibió post-entrenamiento un tratamiento distinto

combinando las tres dosis de cada fármaco con suero salino y además contando con un grupo control para cada sexo. Los grupos resultantes fueron: SS: suero salino, SE1: suero salino y escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: suero salino y escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: suero salino y escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: suero salino y R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: suero salino y R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: suero salino y R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg y R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg y R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg y E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg y R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

El experimento constó de dos fases: fase de entrenamiento y fase de test. En la *fase de entrenamiento o adquisición*, los ratones pasaron por la caja de evitación con aleatorización de sexo y condición experimental y permanecieron en el compartimento blanco e iluminado 90 segundos, que es el tiempo utilizado de habituación. Después de esto, la puerta que separa los dos compartimentos se abría y el ratón cruzaba al compartimento oscuro de la caja donde con el contacto podal recibía un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 segundos de duración. Se registró la latencia para cada sujeto en décimas de segundo y seguidamente cada animal recibía dos inyecciones intraperitoneales de salino y salino, salino y fármaco o fármaco y fármaco según el grupo al que perteneciera el animal.

La segunda fase o *fase de test* (prueba de recuerdo) se realizó siete días después siguiendo el mismo procedimiento pero sin choque eléctrico. Los animales con latencias de cruce superiores a 300 segundos en la fase de entrenamiento eran descartados. En la fase de test la prueba terminaba y la latencia registrada era de 300 segundos (tiempo máximo).

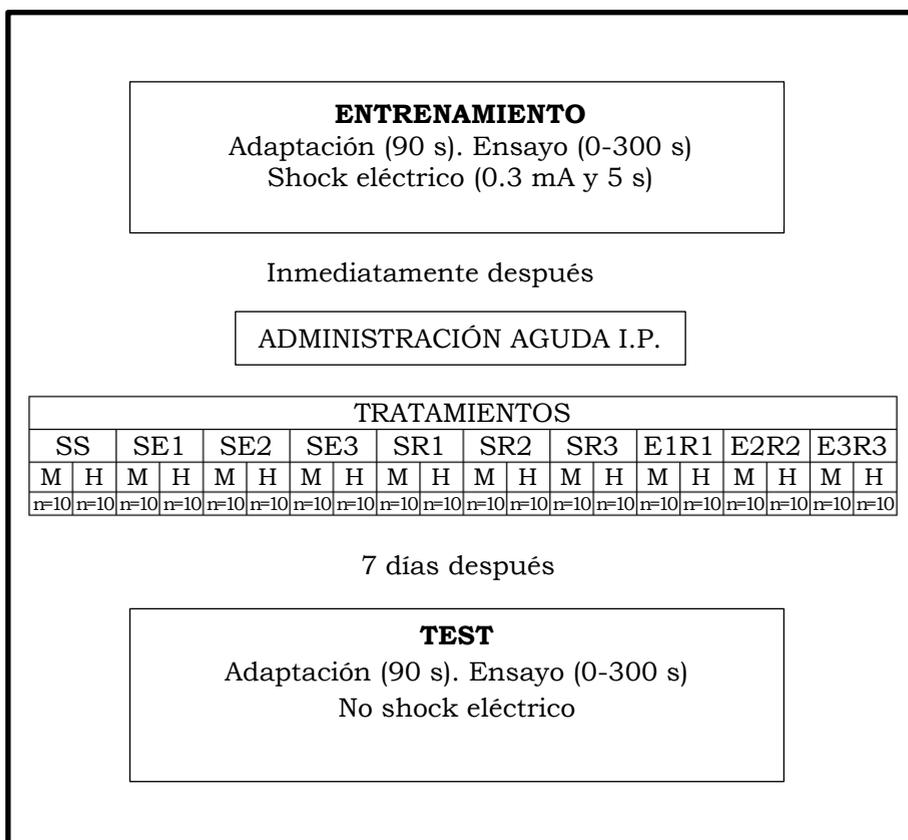


Fig. 6. 1. Esquema de diseño del Experimento 1. s = segundos; mA = miliamperios; I.P. = intraperitoneal; M = macho; H = hembra; n = n° sujetos.

- Análisis estadísticos

Los datos de las latencias recogidas para cada una de las fases de la evitación inhibitoria fueron transformados en valores de proporción ($p = x/300$) y después a arcoseno de la raíz cuadrada ($\arcsen \sqrt{p}$) de acuerdo con Snedecor y Cochran, (1980). Esta transformación es adecuada cuando se aplica un tiempo máximo y las latencias que exceden este tiempo son interpretadas como si fuesen ese valor máximo.

Los análisis de varianza de las dos fases de los experimentos se realizaron por separado mediante un ANOVA para las variables independientes Sexo y Tratamiento. El ANOVA de la primera fase se realizó como control de la distribución al azar de los sujetos. En este análisis no se esperaban diferencias entre los grupos experimentales, ya que el tratamiento farmacológico es posterior a esta fase y todos los sujetos han sido sometidos a las mismas condiciones. Después de realizar el ANOVA de la fase test se procedió al análisis de las diferencias sexuales si la significación en este caso lo requería. Se compararon mediante pruebas t para muestras independientes las medias de las latencias en el test de cada grupo de tratamiento con su pareja de cada sexo. Por último, se realizaron pruebas t para muestras relacionadas con el fin de comparar las latencias entre las dos fases, lo que refleja la existencia o no de aprendizaje de evitación.

Todos los análisis, se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 17.0 para Windows (2008).

6.3. Resultados

El análisis de varianza realizado para las latencias del entrenamiento mostró que había diferencias entre los grupos en las latencias antes de realizar cualquier tratamiento [$F_{(9,180)} = 2.41, p < 0.05$] aunque no mostró diferencias sexuales [$F_{(1,180)} = 0.585, p > 0.05$].

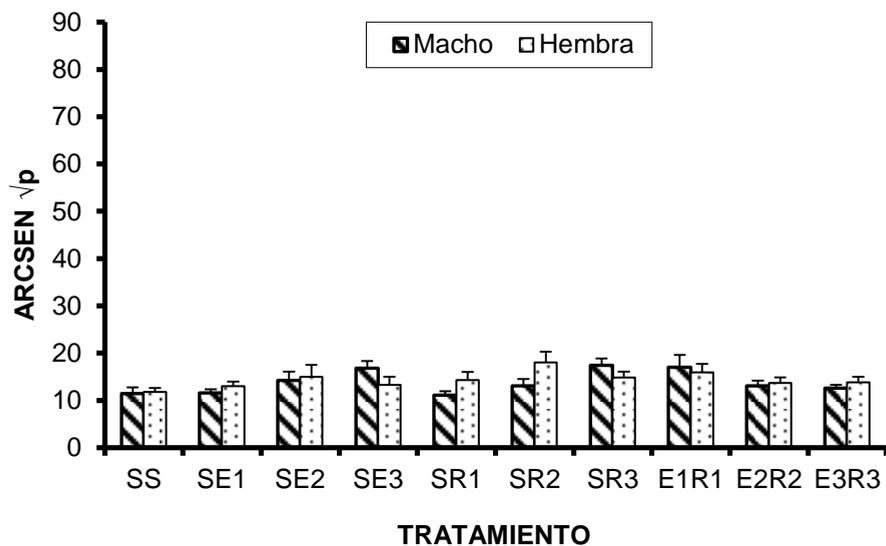


Fig. 6.2. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones prepuberales en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En la fase de test se observó que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo [$F_{(9,180)} = 0.439, p > 0.05$];

sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,180)} = 9.126, p > 0.05$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción [$F_{(9,180)} = 1.002, p > 0.05$] (Ver figura 6.3). Es decir, que había diferencias entre grupos antes de aplicar el tratamiento y estas diferencias desaparecieron. En las pruebas t para muestras independientes realizadas para el test comparando los grupos homónimos de cada sexo, se observaron diferencias significativas en el grupo SR2 [$t_{(18)} = 2.78, p < 0.05$], mostrando las hembras latencias significativamente mayores y una tendencia a la significación en el grupo SE2, con la misma superioridad en las hembras.

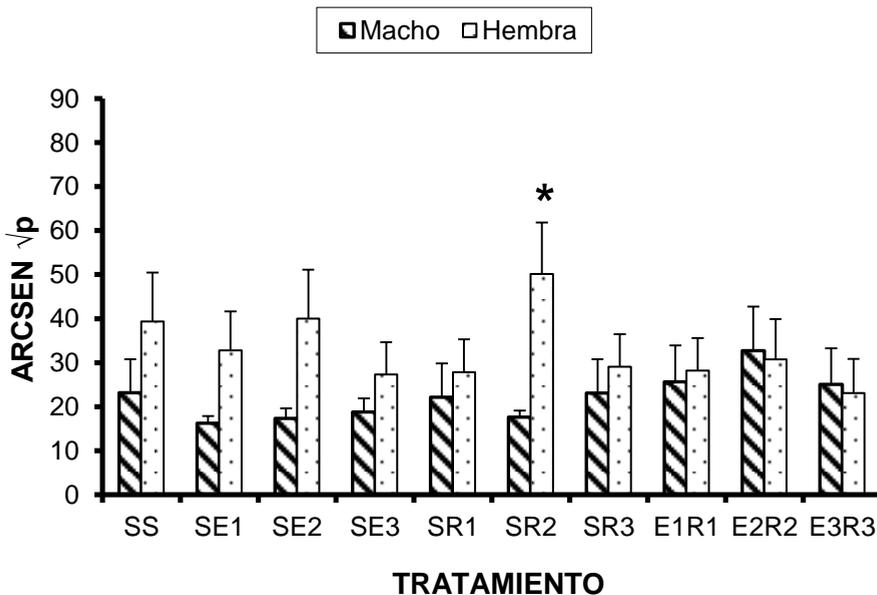


Fig. 6.3. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones prepuberales en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3

mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Macho.

En la siguiente gráfica están representadas a modo de resumen las latencias de cruce de cada grupo en entrenamiento y test. En ésta, no está realizada la separación por sexos, únicamente por tratamiento farmacológico. Podemos observar que en las pruebas t para muestras relacionadas sin tener en cuenta la variable sexo algunos de los grupos no presentan la conducta de evitación.

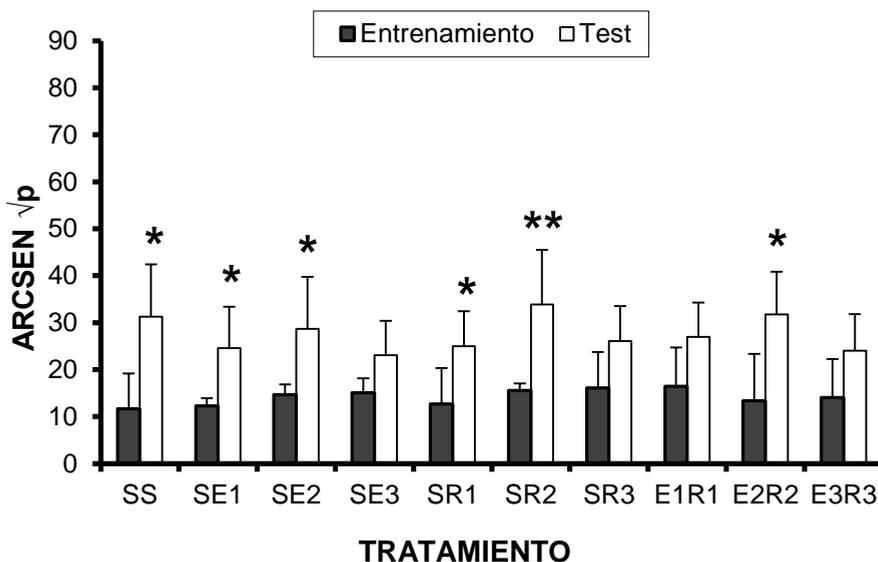


Fig. 6.4. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones prepuberales en función del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Para comprobar si hubo aprendizaje de evitación inhibitoria en cada uno de los grupos de tratamiento, se realizaron pruebas t para muestras relacionadas para cada sexo ya que el sexo había presentado diferencias significativas en las latencias de la fase test. Dichas pruebas revelaron que los machos del grupo SS (control) no mostraban aprendizaje de la conducta de evitación inhibitoria [$t_{(9)} = 1.441$, $p > 0.05$]. Solamente se observaron diferencias significativas en el grupo SE1 [$t_{(9)} = 2.446$, $p < 0.05$] y el SR2 [$t_{(9)} = 2.423$, $p < 0.05$].

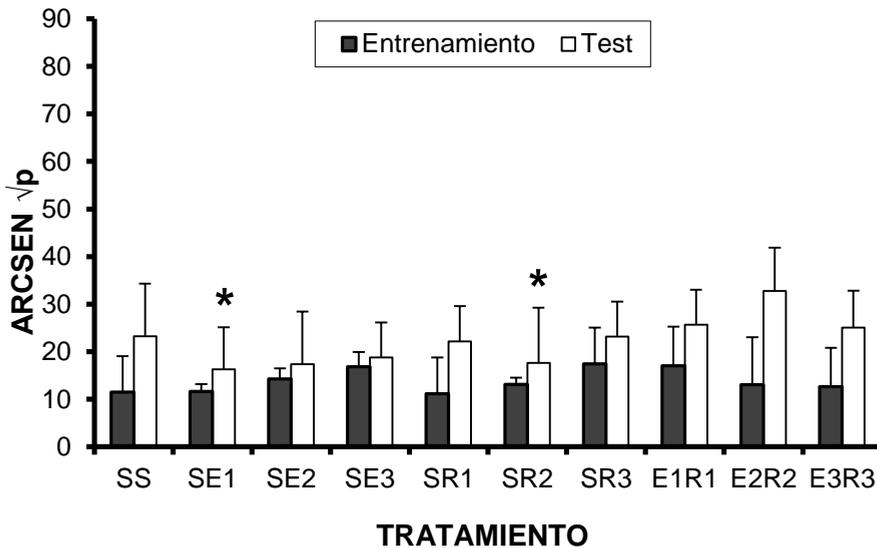


Fig. 6.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en MACHOS prepuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Entrenamiento.

En las pruebas t para muestras relacionadas de las hembras, el grupo SS (control) sí que presentó aprendizaje de la tarea [$t_{(9)} = 2.505$, $p < 0.05$]. También se observaron diferencias significativas en cuanto a las latencias de test respecto al entrenamiento en el grupo SR2, [$t_{(9)} = 3.070$, $p < 0.05$] (Ver Fig. 6.6.).

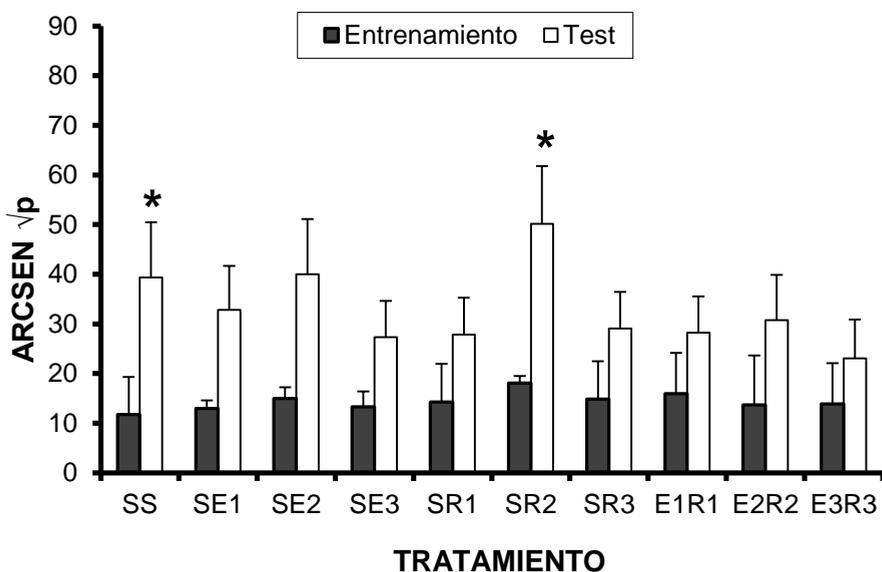


Fig. 6.6. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Entrenamiento.

6. 4. Discusión

Los resultados obtenidos en este Experimento 1 fueron poco habituales en decenas de experimentos realizados por el grupo de investigación. Se pretendía estudiar los efectos de la escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en ratones machos y hembras en etapa prepuberal en la adquisición del aprendizaje de evitación inhibitoria. Ya en ANOVA previo de control en el que se analizaban las diferencias entre las latencias en entrenamiento, antes de recibir el tratamiento o intervención, los sujetos mostraban diferencias en cuanto a grupo que no se deberían haber mostrado puesto que todos los sujetos fueron asignados al azar a los tratamientos que iban a recibir. Por el contrario, la conducta sexo-dimórfica que puede observarse en otros experimentos no se observó. Estos datos pusieron en evidencia unas diferencias que podían confundir o enmascarar los efectos de los fármacos utilizados en la consolidación del aprendizaje de evitación inhibitoria. En un primer momento se pensó que podía ser debido a la corta edad de los animales.

Por otro lado, la mayor parte de animales exceptuando dos grupos de machos y dos de hembras, mostraron deterioro en el aprendizaje de evitación inhibitoria. Es decir, que la mayoría de grupos de animales no consolidaron este aprendizaje. Esto sería lo esperable en base a nuestras hipótesis por mayor efecto de los fármacos en edades más tempranas. Por el contrario, no pudimos afirmar esto con rotundidad por la ausencia de un buen grupo control en los machos, ya que

éstos no habiendo sido tratados mediante ningún fármaco con efectos deteriorantes, no presentaron el aprendizaje esperado. En un primer momento, la ausencia de aprendizaje de la tarea por el grupo control de machos, se atribuyó a que -como sugieren algunos autores- los cambios en las condiciones ambientales de los animales (separación de las madres, transporte desde el criadero comercial y alojamiento en nuevos grupos de animales y otro animalario) pueden producir una respuesta de ansiedad y podrían tener efectos muy relevantes en la capacidad de aprendizaje y memoria en etapas muy tempranas (Iso y cols., 2007). Esta afectación de los mecanismos de aprendizaje en los machos por un estrés temprano o incluso por la separación materna se ha discutido en Grissom y cols., (2012) que apuntan a que en ocasiones se ha encontrado que este estrés en las primeras semanas de vida de los roedores puede afectar en mayor manera a los roedores machos siendo a veces inapreciable en las hembras. La explicación a estos hechos se encuentra en la mayor vulnerabilidad de los machos prepuberales a los efectos del estrés ante tareas sobretodo espaciales (e.g. Conrad y cols., 2003), mientras las hembras se definen como más resilientes. Además se ha observado que en ratas hembras hay una maduración más rápida en la que éstas alcanzan la pubertad 7 días antes que los machos (Engelbregt y cols., 2000; Grissom y cols., 2012). Esto podría extrapolarse al caso del ratón, por lo que cabría la posibilidad de que los ratones machos maduraran más lentamente que las hembras.

Por la ausencia de resultados contundentes, en los que los animales controles aprendan la tarea frente a animales tratados nuestras hipótesis quedaron en el aire tras la realización de este experimento pudiendo atribuir estos resultados en los que los animales no manipulados farmacológicamente no aprendieran la tarea a su corta edad y su falta de maduración en sus mecanismos de aprendizaje, más notables en los machos que en las hembras que según algunos autores podrían superar en madurez y resistencia al estrés a los grupos de machos. Tras estos resultados, el grupo de investigación quedó a la espera de más información en ratones en etapa más avanzada de desarrollo.

CAPÍTULO 7

EXPERIMENTO 2: Efectos

de la administración de

escopolamina y R-8-OH-

DPAT en evitación

inhibitoria de ratones

postpuberales Harlan

7.1. Introducción

En este segundo experimento se pretendía evaluar los efectos de la escopolamina y del R-(+)-8-OH-DPAT, en el mismo rango de dosis que en el experimento anterior, sobre la consolidación de la memoria en sujetos postpuberales de ambos sexos.

Estudiar la influencia de la variable edad en los efectos de dichos fármacos sobre la memoria está justificado por los cambios observados en la actividad de los receptores colinérgicos centrales desde un valor óptimo deterioran la adquisición de una habilidad o conducta (Abe y cols., 2003; Wilson y Cook, 1994). Estos cambios se observan tanto en los deterioros normales debidos a la edad como en enfermos de Alzheimer (Wilson y Cook, 1994). En estos sujetos, se han observado diferencias debidas al mal funcionamiento del sistema colinérgico pero también una hipo-función de los sistemas de neurotransmisión en general: glutamatérgicos, GABAérgicos y de monoaminas (e.g. serotoninérgico). Esto se traduce en un efecto negativo sobre el SNC que afecta tanto a mecanismos de memoria espacial como de la conducta de evitación (Luttgen y cols., 2005).

Además, estudios experimentales y clínicos han mostrado la relación entre los sistemas colinérgicos/serotoninérgicos y el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal en la función cognitiva (Bethea y cols., 2002; Gibbs, 1997; Simpkins y cols., 1997). Por ejemplo, la disfunción colinérgica y serotoninérgica bajo

condiciones de deficiencia de estrógenos contribuye al desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer (Henderson y cols., 1994).

Algunos autores, e.g. Sapronov y cols. (2006) estudiaron los efectos de la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria comparando ratas hembras de mediana edad en condiciones normales con ratas ovariectomizadas para observar los deterioros en la tarea de evitación inhibitoria debidos al déficit hormonal. Estos autores encontraron que el tratamiento de sustitución con estradiol en ratas ovariectomizadas era insuficiente para compensar el deterioro producido por estos fármacos en la memoria de ratas ovariectomizadas de mediana edad.

Sabiendo que las diferencias hormonales entre machos y hembras dan lugar a diferencias en la conducta de evitación, es importante conocer cómo los cambios hormonales influyen en las diferentes etapas vitales. La mayoría de estudios que evalúan la memoria de evitación inhibitoria están realizados en sujetos machos y de edad adulta. El conocer las diferencias sexuales y entre animales en distintas etapas de desarrollo (prepuberal, postpuberal y adulta) es interesante para conocer cómo se ven modulados los sistemas de neurotransmisión y los efectos de algunos fármacos por las hormonas en distintas edades.

Nuestro grupo de investigación ya evaluó estas diferencias sexuales en la conducta de evitación inhibitoria con los efectos

de otras sustancias psicotropas, encontrando diferencias en cuanto a los efectos de los fármacos y en cuanto al aprendizaje de la conducta en sí misma, presentando las hembras latencias superiores en la fase test respecto a los machos (Arenas y cols., 2006; Parra y cols., 1999, 2002).

Teniendo en cuenta lo comentado, en este segundo experimento se pretendió evaluar el aprendizaje de evitación inhibitoria y los efectos que los fármacos escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT tienen en esta conducta en ratones machos y hembras en edad post-puberal.

7.2. Material y método

- Sujetos

Se utilizaron 100 ratones machos y 100 ratones hembras de la cepa CD-1 de laboratorios Harlan (Holanda) de 5 semanas de edad con pesos comprendidos entre 29-38 g para los machos y 21-30 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en el experimento anterior.

- Fármacos

Los fármacos utilizados fueron bromhidrato de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) al igual que en el Experimento 1. Fueron preparados bajo las mismas condiciones que en dicho caso e inyectados

(i.p.) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. Las dosis también fueron las mismas que en el Experimento 1: 0.3; 1.0 y 3.0 mg/kg de escopolamina y 0.1; 0.2 y 0.3 mg/kg de R-(+)-8-OH-DPAT.

- *Aparatos*

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el experimento anterior (ver Apartado 6.2).

- *Procedimiento*

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos de tratamiento que en el primer experimento, con un total de 10 grupos por sexo.

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en el Experimento 1. A modo de resumen el experimento constó de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 segundos de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (i.p.) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibía choque eléctrico ni tratamiento tras el pase.

- Análisis estadísticos

Como en el experimento anterior, se analizaron los datos mediante Análisis de Varianza separados para la fase de entrenamiento y la fase test. Se realizaron pruebas t para muestras independientes para observar las diferencias sexuales entre los grupos con el mismo tratamiento farmacológico. Además se realizaron pruebas t para muestras relacionadas para comprobar la presencia o no de aprendizaje en cada grupo, primero sin separar los sujetos por sexo y después teniendo en cuenta esta variable.

7.3. Resultados

El análisis de varianza de las latencias en entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos [$F_{(9,180)} = 0.98, p > 0.05$] y tampoco mostró diferencias sexuales significativas [$F_{(1,180)} = 0.94, p > 0.05$].

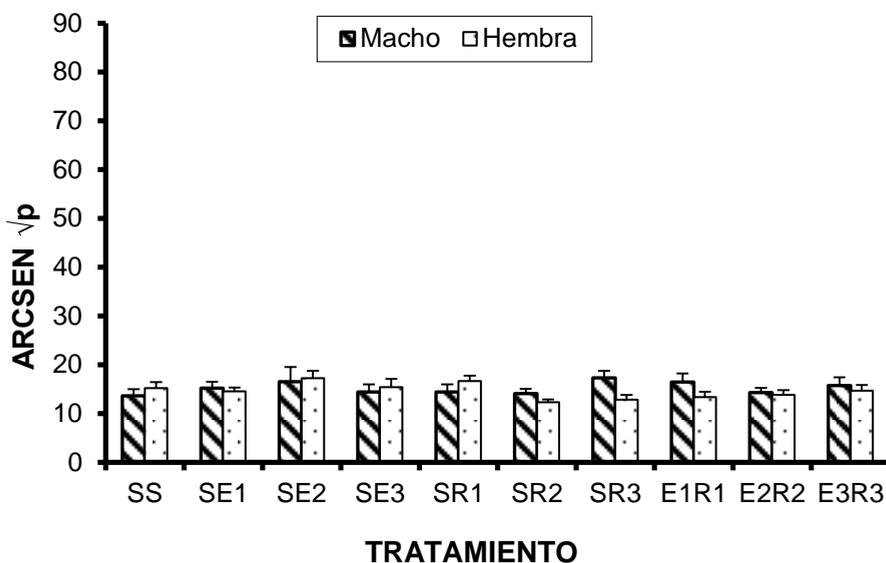


Fig. 7.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones postpuberales en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En el análisis de varianza de la fase de test se observó que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo [$F_{(9,180)} = 0.37, p > 0.05$]; sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,180)} = 8.74, p < 0.05$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción [$F_{(9,180)} = 0.61, p > 0.05$] (ver figura 7.2).

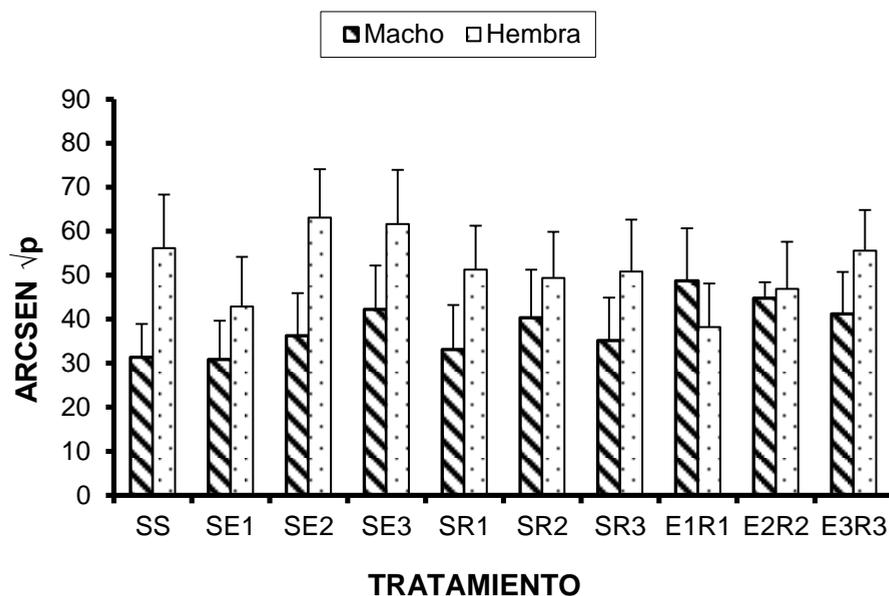


Fig. 7.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones postpuberales en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

Se realizaron pruebas t para muestras independientes para analizar en que grupos de tratamiento existían estas diferencias y éstas no resultaron estadísticamente significativas.

La gráfica siguiente resume las latencias de cruce de todos los grupos de tratamiento en entrenamiento y test. En ella constan todos los grupos sin separación del sexo. Las pruebas t para muestras relacionadas mostraron aprendizaje de la

tarea para todos los grupos de tratamiento sin tener en cuenta la variable sexo (ver Fig. 7.3).

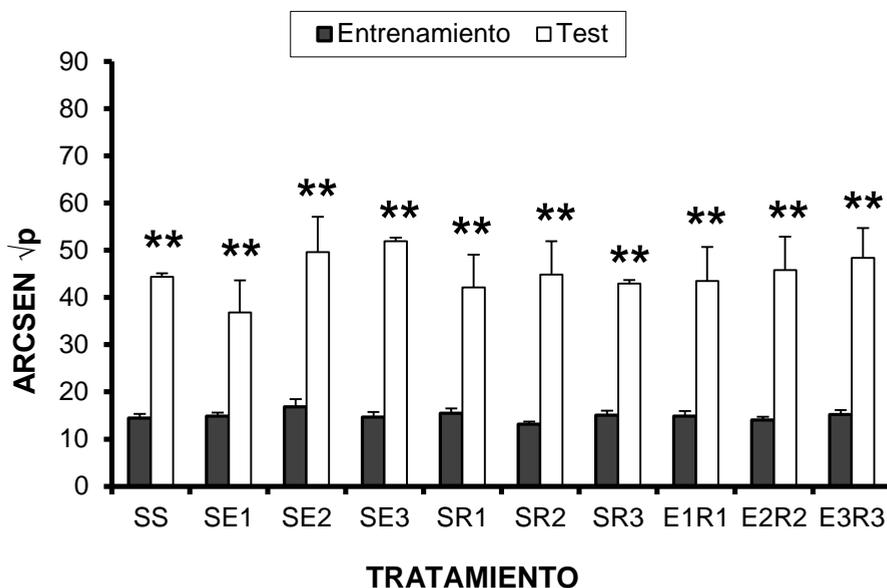


Fig. 7.3. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones postpuberales en función del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Las pruebas t para muestras relacionadas separando por sexos mostraron que en el caso de los machos hubo aprendizaje de la tarea para los grupos SS (grupo control) [$t_{(9)} = 2.81$, $p < 0.05$], SE3 [$t_{(9)} = 3.23$, $p < 0.05$], SR2 [$t_{(9)} = 2.40$, $p < 0.05$] y los tres grupos de combinación (ver figura 7.4).

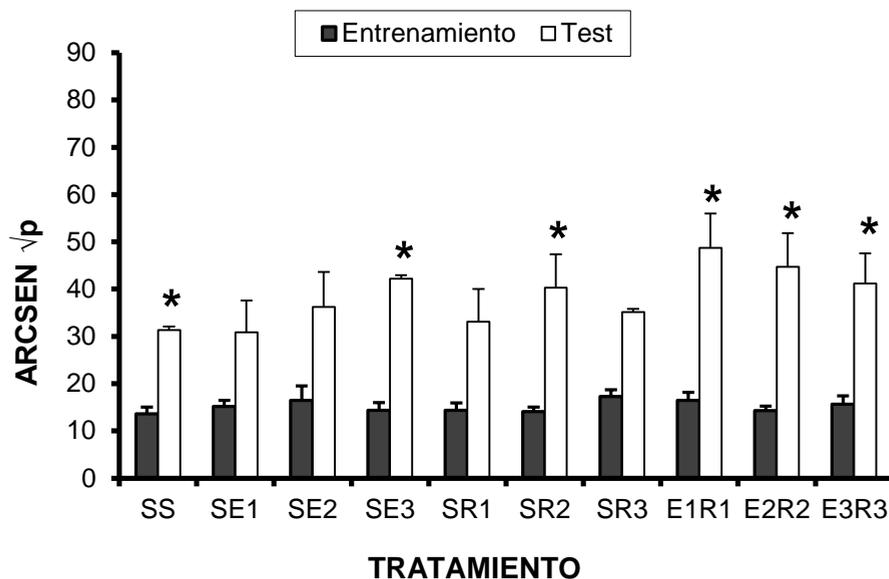


Fig. 7.4. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en MACHOS postpuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Entrenamiento.

En el caso de las hembras, hubo aprendizaje de evitación inhibitoria para todos los grupos, tanto para el grupo control [$t_{(9)} = 3.70$, $p > 0.05$], como todos los grupos de tratamiento (ver figura 7.5).

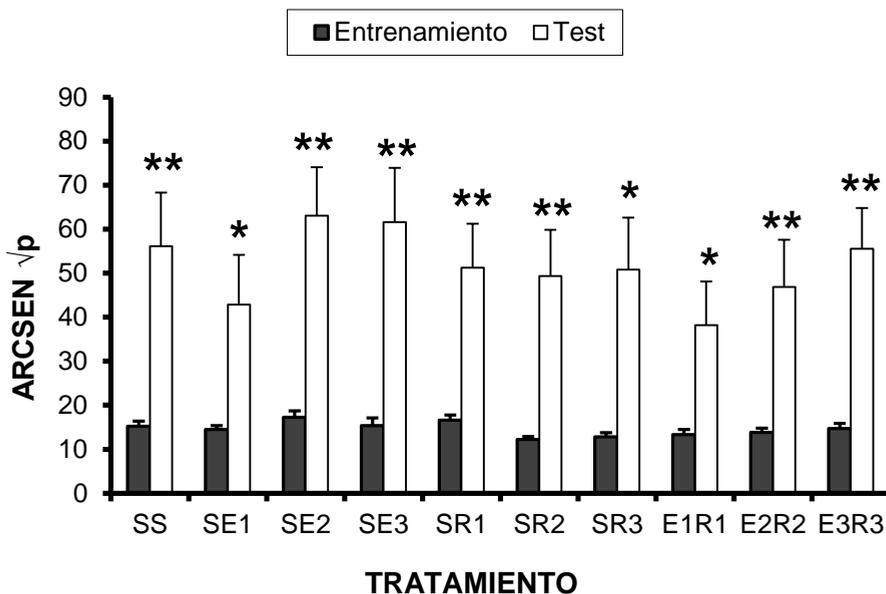


Fig. 7.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS postpuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

7.4. Discusión

En este experimento se evaluaron los efectos de la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT en su administración post-entrenamiento en el aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones postpuberales machos y hembras. A diferencia del experimento anterior, los resultados obtenidos fueron más coincidentes con los de la literatura: No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los

grupos y tampoco entre los sexos, confirmando que los grupos eran homogéneos antes de recibir el tratamiento farmacológico. La comparación entre las medias de los grupos en la fase test no mostró diferencias significativas debidas al tratamiento, algo que puede deberse en parte al gran número de condiciones de tratamiento existentes. En cuanto al sexo, las latencias en la fase test mostraron diferencias significativas como en otros estudios realizados por el grupo de investigación (Everss, 2005; Parra y cols., 1999, 2002), alcanzando las hembras latencias significativamente más altas que los machos. Al intentar observar estas diferencias grupo a grupo, mediante pruebas t para muestras relacionadas, ninguno de los grupos de tratamiento en sí mismo mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a su homónimo en el mismo sexo, algo que podría deberse a una diferencia general y no específica de ningún tratamiento, sino de la condición sexual. Esto, se ha interpretado como un mejor aprendizaje de la tarea por parte de las hembras (Monleón y cols., 2001) y su menor sensibilidad a las manipulaciones farmacológicas. Las posibles causas fueron discutidas en Arenas y cols., 2006, haciendo referencia a una mayor metabolización de los fármacos por parte de las hembras (Shapiro y cols., 1995) o por las acciones diferenciadas de las hormonas sexuales en los sistemas de neurotransmisión (Bossé y cols., 1996; Maswood y cols., 1995).

Con respecto al aprendizaje de la tarea, todos los grupos sin tener en cuenta el sexo, mostraron diferencias

estadísticamente muy significativas ($p < 0.01$) en las latencias del test respecto al entrenamiento; al contrario que en el experimento anterior, se observó aprendizaje de evitación inhibitoria en los grupos controles de ambos sexos, al presentar latencias significativamente mayores en la fase de test respecto al entrenamiento, algo que en el primer experimento no ocurrió. Hubo grupos en los que las latencias en la fase de test no presentaron diferencias significativas respecto al entrenamiento, pero únicamente en el caso de los machos. En este tipo de estudios, cuando se presenta esta circunstancia de no aprendizaje, se interpreta como un deterioro debido a la acción del tratamiento farmacológico y hemos argumentado más arriba en este mismo apartado que la causa del deterioro mnésico únicamente en machos ha sido reportada en varios estudios previos en los que las hembras se ven menos afectadas por los tratamientos farmacológicos. Este hecho muchas veces juega a favor de encontrar mejores resultados en los estudios en los que únicamente se utilizan sujetos experimentales, pero como en alguna ocasión hemos mencionado, el incluir ambos sexos en nuestros experimentos está más que justificado por la mejor representación de la naturaleza y por la prevalencia de los distintos trastornos mentales en cada uno de los sexos.

Los grupos de machos en los que la administración post-entrenamiento de los fármacos produjeron deterioro fueron los grupos SE1 (0.3 mg/kg), SE2 (1 mg/kg), SR1 (0.1 mg/kg) y SR3 (0.3 mg/kg). En este caso, la escopolamina deterioró en

dosis bajas o intermedias y el R-(+)-8-OH-DPAT lo hizo en dosis bajas o altas, no intermedias. En ninguno de los grupos tratados con la combinación de los dos fármacos se observó deterioro de la conducta, lo que puede interpretarse como un efecto amortiguador al interferir en los dos sistemas de neurotransmisión simultáneamente. Este efecto amortiguador no era esperado pero sería interpretable como un efecto farmacológico que se produce en algunos casos en los que la suma de un gran efecto anula cada uno de los efectos. También podría argumentarse en este caso que la administración sistémica de los fármacos puede afectar en muchos sistemas cognitivos a la vez que produzcan efectos contrarios a los esperables (Klikenberg y Blockland, 2010). Por ejemplo, el 8-OH-DPAT administrado en el hipocampo directamente por microinfusión interfirió en la formación de memoria a corto plazo mientras mejoró la memoria a largo plazo cuando se administró en la corteza entorrinal (Izquierdo y cols., 1998). Esto podría explicar que si un fármaco llega a las neuronas en varias localizaciones al mismo tiempo pueda producir efectos o no de deterioro, aún más si son dos fármacos incidentes en dos sistemas de neurotransmisión.

Por otra parte, en nuestro grupo de investigación, antes de la realización de esta tesis, se evaluaron los efectos de los fármacos amitriptilina y fluoxetina por separado y en combinación, encontrando que la combinación de los fármacos producía efectos deteriorantes sobre la conducta de evitación inhibitoria que no se observaban al inyectar los fármacos por

separado (Parra y cols., 2010). La amitriptilina como hemos comentado en el capítulo 4, es un antidepresivo tricíclico que actúa sobre dos sistemas de neurotransmisión, el colinérgico y el serotoninérgico y la fluoxetina, sobre el serotoninérgico únicamente por ello se planteó el incluir combinaciones de fármacos que incidieran en uno y otro sistema con el fin de mediante varias dosis se pudiese averiguar la implicación de cada uno de los dos sistemas.

Patel y Zhou, (2005) realizaron un estudio en el que se identificaron receptores específicos 5-HT_{1A} en distintas áreas cerebrales y los localizaron en gran número en hipocampo ya en etapa prenatal. Los autores presentaron en dicho estudio una caracterización de la expresión de este receptor en una variedad de zonas hipocampales que van cambiando en diferentes etapas del desarrollo y modulando el crecimiento, la migración y el desarrollo de otros sistemas. Estos descubrimientos apoyarían nuestra hipótesis inicial de que los efectos de nuestros fármacos tienen diferentes efectos en diferentes etapas del desarrollo, siendo más fuertes los efectos e incluso teniendo consecuencias a largo plazo sobre los mecanismos de memoria en etapas más tempranas frente a más tardías como hemos visto en nuestro experimento.

En resumen y comparando estos resultados con los anteriores, se observó aprendizaje de la tarea de evitación al contrario que en la etapa prepuberal, donde los sujetos machos controles no aprendieron la tarea, las hembras sí lo

hicieron pero casi ningún grupo presentó aprendizaje. Como argumentamos en su caso, el hecho de que los sujetos más jóvenes no memorizaran la evitación inhibitoria pudo deberse a la mayor vulnerabilidad al estrés en etapas muy tempranas o a la inmadurez de los sujetos para realizar este aprendizaje. En la etapa postpuberal pudo observarse el aprendizaje de esta tarea tanto en machos como en hembras y se observaron deterioros debidos a la interferencia de los fármacos en la consolidación de este aprendizaje. Estos deterioros se observaron con diferentes dosis de los fármacos. En el caso de la escopolamina la dosis baja e intermedia y en el caso del R-(+)-8-OH-DPAT, la dosis baja y alta tuvieron efectos deteriorantes. Ninguna de las combinaciones de los fármacos tuvo efectos de deterioro en la consolidación de este aprendizaje. Estos resultados podrían apuntar a que la administración sistémica post-entrenamiento de dichos fármacos impidió la consolidación de la tarea, en tratamientos dependientes de la dosis cuando se administran por separado y que incidiendo en los dos sistemas de neurotransmisión al mismo tiempo produzcamos el efecto contrario al esperado, que pudiera ser una consecuencia de una atenuación de los efectos de un fármaco a partir del otro, con lo que nuestros efectos se anularían (Steckler y Sahgal, 1995).

CAPÍTULO 8
EXPERIMENTO 3: Efectos
de la administración de
escopolamina y R-8-OH-
DPAT en evitación
inhibitoria de ratones
adultos Harlan

8.1. Introducción

El objetivo general de la presente tesis -como ya hemos comentado anteriormente- consiste en analizar los efectos de dos fármacos incidentes en los sistemas de neurotransmisión colinérgico y serotoninérgico, administrados posteriormente al entrenamiento de los sujetos en la tarea de evitación inhibitoria. Como hemos comentado, estos efectos serían observados teóricamente en la consolidación de este aprendizaje. Otras de las variables tomadas en consideración para este estudio fueron el sexo y la edad o etapa evolutiva de los sujetos. Y este tercer experimento en concreto versó sobre los efectos de estos fármacos en la consolidación de la memoria en ratones machos y hembras adultos. Feigley (1974) ya comentó la importancia de la edad de los sujetos experimentales puesto que ésta podía ser un factor mediador en determinar la sensibilidad a la disrupción de la escopolamina en la evitación pasiva. También hemos comentado que la sensibilidad a los efectos del R-(+)-8-OH-DPAT por los diferentes patrones de expresión de los receptores 5-HT_{1A} en diferentes zonas cerebrales cambia con la edad de los sujetos y su etapa madurativa lo que sería importante observar en la conducta de evitación pasiva (Patel y Zhou, 2005).

En la introducción del Experimento 1 ya mencionamos algunos estudios realizados con escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en roedores (ratas y ratones) en evitación inhibitoria. La mayoría de estos estudios se han realizado con animales

adultos y únicamente con sujetos machos. Como comentamos, Lo y cols. (2014) y Botton y cols. (2010) administraron diferentes dosis pre-entrenamiento de escopolamina a roedores machos, encontrando deterioros en la adquisición de la conducta de evitación pasiva. Rush, (1988) con administración post-entrenamiento encontró deterioro en la consolidación de la memoria en ratones macho en dosis de 10 y 30 mg/kg frente a dosis mucho más bajas. Por otra parte, la administración de R-(+)-8-OH-DPAT, también ha sido utilizada en la gran mayoría de estudios en administración pre-entrenamiento y en sujetos machos (e.g. Misane y cols., 1998a; Misane y Ogren, 2000), produciendo deterioros en la adquisición de la conducta de evitación pasiva.

Teniendo esto en cuenta junto a la escasez de experimentación en este campo, y con la finalidad de arrojar luz sobre los efectos que estas sustancias producen en el aprendizaje, se planteó el estudiar estos efectos sobre la consolidación de la evitación inhibitoria en ambos sexos -como en experimentos anteriores del grupo de investigación- y en este caso en sujetos adultos, para completar así las tres etapas vitales que se abarcan en esta tesis.

8.2. Material y método

- Sujetos

Se utilizaron 100 ratones machos y 100 ratones hembras de la cepa CD-1 de laboratorios Harlan (Holanda) de 8

semanas de edad con pesos comprendidos entre 30-38 g para los machos y 22-34 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- Fármacos

Los fármacos utilizados fueron bromhidrato de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) al igual que en los dos experimentos anteriores. Fueron preparados bajo las condiciones detalladas en el apartado 6.2 de esta tesis e inyectados (*i.p.*) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. Las dosis también fueron las mismas que en los experimentos anteriores: 0.3; 1.0 y 3.0 mg/kg de escopolamina y 0.1; 0.2 y 0.3 mg/kg de R-(+)-8-OH-DPAT.

- Aparatos

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el Experimento 1 (ver Apartado 6.2).

- Procedimiento

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento que fueron los mismos que en el experimento anterior, con 1 grupo control que no recibió tratamiento y en total 10 grupos resultantes por sexo.

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en los Experimentos 1 y 2. A modo de resumen el experimento constaba de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (i.p.) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico ni tratamiento tras el pase.

- *Análisis estadísticos*

Como en los experimentos anteriores se analizaron los datos recurriendo al Análisis de Varianza para la fase de entrenamiento para el control de la distribución al azar de los sujetos y para la fase test para observar las diferencias entre éstos. Además se realizaron las mismas comparaciones para muestras independientes para observar las diferencias sexuales y finalmente las comparaciones para medias relacionadas que se realizaron en el experimento anterior para observar la presencia o no de aprendizaje para cada grupo, sin tener en cuenta el sexo y teniéndolo.

8.3. Resultados

El análisis de varianza de las latencias en entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos en esta fase [$F_{(9,180)} = 0.46$, $p > 0.05$] (ver figura 8.1), así como diferencias significativas entre las latencias de machos y hembras [$F_{(1,180)} = 4.162$, $p < 0.05$].

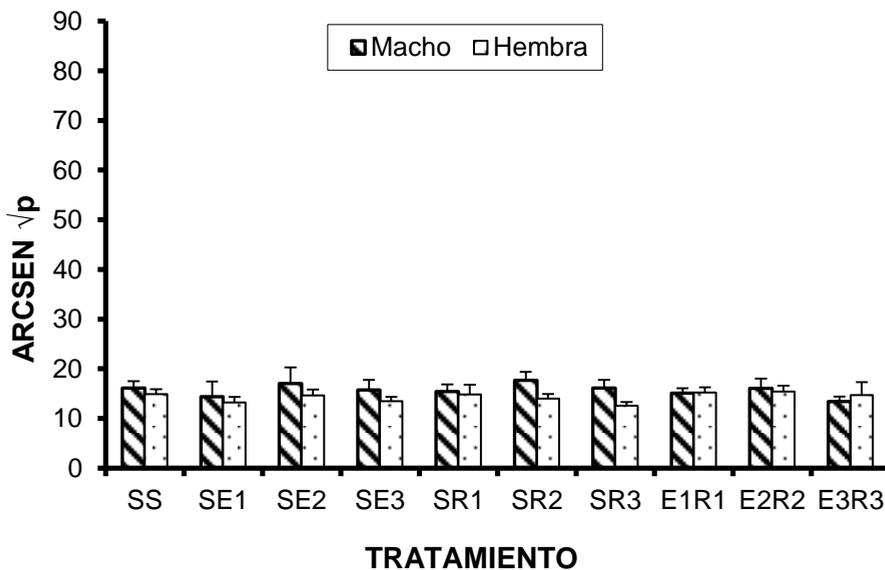


Fig. 8.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones adultos en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En el análisis de varianza de las latencias en la fase test se observó que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente

significativo [$F_{(9,180)} = 0.704, p > 0.05$]; sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,180)} = 11.51, p < 0.05$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción [$F_{(9,180)} = 0.97, p > 0.05$]. Las pruebas t para muestras independientes corroboraron las diferencias sexuales en las latencias del test observadas en el ANOVA general. Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron entre los machos y hembras de los grupos SS [$t_{(18)} = 3.14, p < 0.01$] y SR3 [$t_{(18)} = 2.36, p < 0.05$] (ver figura 8.2).

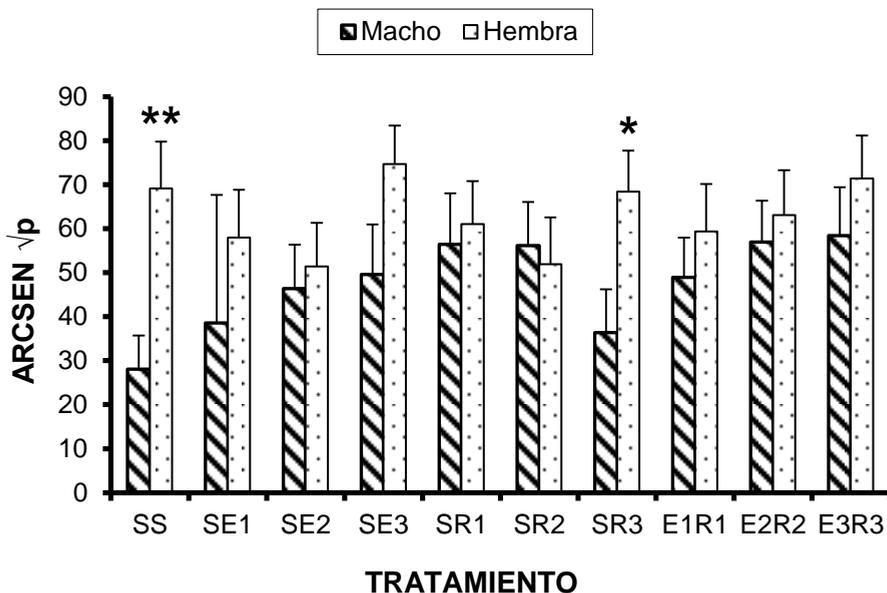


Fig. 8.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones adultos en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Macho.

La gráfica siguiente resume las latencias de cruce de todos los grupos de tratamiento en entrenamiento y test. En ella constan todos los grupos sin separación del sexo. Se observó que todos los grupos mostraban aprendizaje de la tarea tomándolos sin separación de sexo.

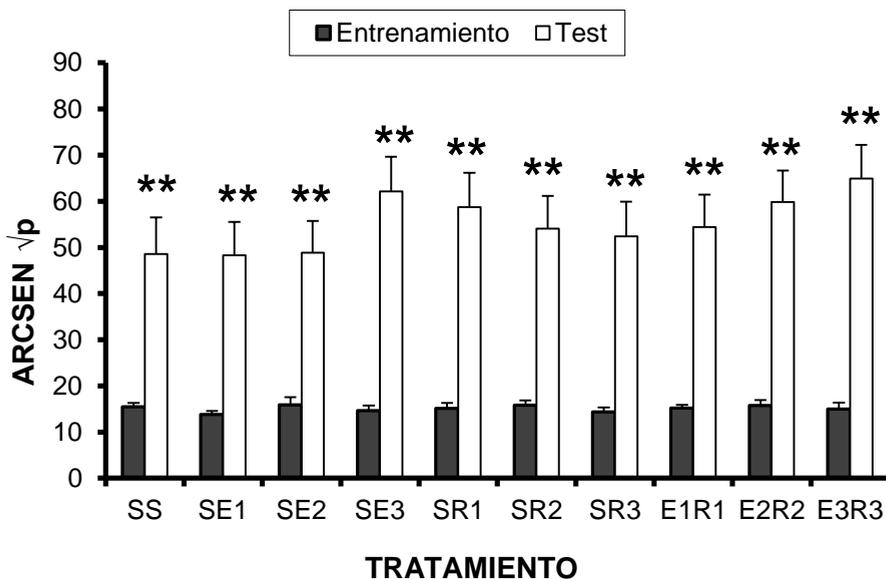


Fig. 8.3. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones adultos en función del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

En las pruebas t para muestras relacionadas para cada grupo de cada sexo se observó que en el caso de los machos no hubo aprendizaje de la tarea para el grupo SS (grupo control)

[$t_{(9)} = 1.53$, $p > 0.05$] aunque sí lo hubo para el mismo grupo de las hembras [$t_{(9)} = 5.06$, $p < 0.05$]. En los machos el único grupo además del control que no presentó aprendizaje de evitación fue el grupo SR3 [$t_{(9)} = 2.08$, $p > 0.05$]. Los demás grupos tanto de machos como de hembras aprendieron la tarea de evitación mostrando estas diferencias significativas en las latencias de las dos fases. En las gráficas 8.4 y 8.5 se pueden observar las medias de las latencias en las dos fases para cada uno de los sexos.

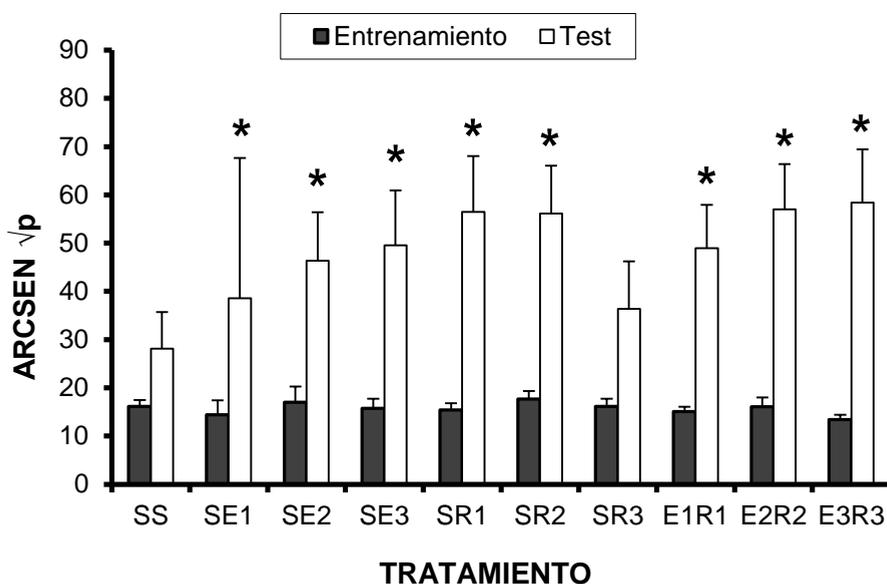


Fig. 8.4. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en MACHOS adultos en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

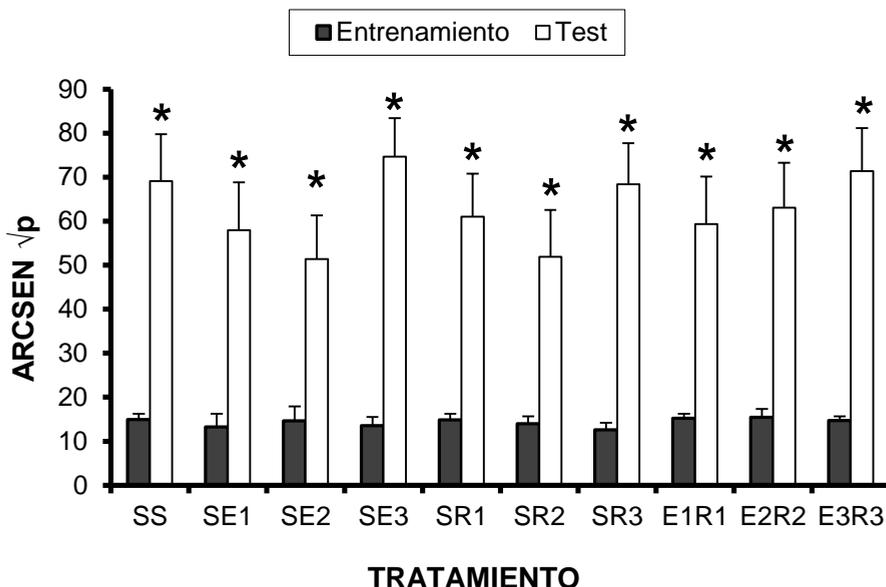


Fig. 8.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS adultas en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

8. 4. Discusión

En este tercer experimento se pretendió estudiar el efecto de varias dosis de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en la consolidación del aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones adultos machos y hembras. Tal efecto fue imposible de clarificar puesto que el grupo control de machos no aprendió la tarea, al igual que había ocurrido en el Experimento 1 con ratones prepuberales. Esta circunstancia no se había

producido anteriormente en la gran experiencia acumulada por este grupo de investigación con el paradigma de evitación inhibitoria. Por tanto, dos de nuestros experimentos no fueron válidos por no contar con un grupo control de machos adecuado para valorar los deterioros en la memoria de los grupos de tratamiento.

En cuanto a las diferencias sexuales que se observaron también en este experimento, como ya comentamos en este capítulo, fueron en consonancia con otros experimentos y estudios realizados con la tarea de evitación inhibitoria y con otros psicofármacos estudiados y comentados previamente (Everss y cols., 2005; Monleón y cols., 2001; Parra y cols., 1999, 2002), siendo siempre las hembras las que aprendían mejor la tarea.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos, como ya hemos comentado, no sirvieron para encontrar la respuesta a las hipótesis planteadas. Por el contrario, los datos recogidos plantearon una nueva hipótesis de trabajo poco investigada en este campo aunque comentada con anterioridad por otros autores. Klinkenberg y Blokland (2010) en un análisis realizado sobre los efectos de la escopolamina y su validez como modelo de deterioro cognitivo afirman que el papel que la escopolamina puede tener en diferentes tareas de aprendizaje puede depender de muchos factores experimentales. Entre ellos, la cepa de animales, la raza, las dosis utilizadas, la edad de los animales, el nivel de intensidad

del shock y el tiempo y la forma de administración del fármaco. Sabiendo esto y con las experiencias en laboratorio en la administración de la prueba de evitación pasiva se planteó la duda de si la procedencia de los animales (proveedor comercial) podría ser un factor determinante a la hora de que éstos aprendieran la tarea o no. Por ello se diseñó un experimento, no contemplado inicialmente, para poder elegir qué animales eran más válidos para estudiar los efectos de los fármacos en el aprendizaje de evitación inhibitoria. Es bien sabido, que para poder afirmar que los sujetos han aprendido la tarea de evitación inhibitoria, en este tipo de estudios, deben presentar diferencias significativas en las latencias de test frente a las del entrenamiento. Observamos que recogiendo los grupos sin separación por sexo, no se presenta esta circunstancia ya que de esta manera todos los grupos presentan diferencias estadísticamente significativas. Este hecho no es del todo inusual puesto que las hembras como hemos comentado aprenden perfectamente la tarea presentando casi siempre latencias significativamente más altas. Los análisis sin separar por sexo son meramente descriptivos en general, de lo que no podemos extraer la conclusión de que los sujetos aprenden en todos los casos ya que el sexo es una factor significativo y la conducta de evitación hemos comentado que es mayoritariamente sexo-dimórfica por lo que debemos separar siempre los sujetos para estudiar su aprendizaje.

Con todo ello, nuestras hipótesis quedaron en el aire por los resultados obtenidos en este experimento y en el Experimento 1 esperando la resolución de un problema que se abordó en el Experimento 4. En este se analizó la conducta de evitación inhibitoria en sujetos adultos CD1 de tres proveedores comerciales distintos.

CAPÍTULO 9 EXPERIMENTO 4:
Evitación inhibitoria en
ratones CD-1 de distintos
proveedores

9.1. Introducción

Este experimento, como hemos comentado, no estaba planeado en el proyecto inicial de esta tesis. Los resultados de los Experimentos 1 y 3, la experiencia previa del grupo de investigación en evitación inhibitoria y algunas observaciones derivadas de la literatura (e.g. Klinkenberg y Blokland, 2010) hicieron pensar en alguna causa que pudiera explicar la ausencia de aprendizaje de los sujetos controles machos prepuberales y adultos en los experimentos citados. Hasta el momento previo a la realización de los experimentos de esta tesis, los animales utilizados por el grupo de investigación procedían del proveedor comercial Charles River (Lyon, Francia), pero debido a diferentes circunstancias se procedió al uso de los animales de la misma cepa CD1 del proveedor Harlan (Holanda).

Nuestro grupo de investigación en numerosos estudios previos ha evaluado el efecto de diferentes fármacos en la memoria de evitación inhibitoria comparando con animales no tratados farmacológicamente y nunca antes se habían encontrado resultados similares a los observados en esta tesis (Experimento 1 y Experimento 3). Los estudios realizados por este grupo de investigación en los que se habían utilizado animales de la misma cepa CD1 (Charles River, Lyon, Francia) mostraban en sus resultados un aprendizaje sólido de la tarea de evitación inhibitoria con todas las combinaciones de parámetros utilizadas (intervalo entrenamiento-test;

intensidad del choque eléctrico; duración del choque eléctrico). Estos experimentos fueron realizados también en sujetos de ambos sexos demostrando el aprendizaje de la tarea en los sujetos no tratados (Arenas y cols., 2006; Monleón y cols., 2009; Parra y cols., 2010; Vinader-Caerols y cols., 2006). Los resultados mostrados en capítulos anteriores y su diferencia respecto a los aquí citados, nos hicieron plantearnos diferentes hipótesis para explicar estos resultados anómalos, entre ellas: el nivel de experiencia del experimentador, diferencias en las condiciones de alojamiento, enfermedad de los animales, la comida y finalmente el proveedor de animales. Éstas hipótesis se intentaron contrastar revisando toda la situación experimental: los experimentadores ya tenían experiencia en este tipo de experimentos, las condiciones de alojamiento eran las mismas que en experimentos anteriores, así como la comida, y los animales fueron inspeccionados y observados en sus condiciones de salud siguiendo las instrucciones veterinarias de Pritchett-Corning y cols. (2011). La revisión de todas estas circunstancias condujo a la hipótesis más plausible de que los resultados anómalos se debiesen a que los animales que se estaban utilizando no eran del mismo proveedor utilizado previamente.

Con el fin de contrastar esta hipótesis, se diseñó un experimento para comparar la ejecución en evitación inhibitoria de ratones de la cepa CD1 de ambos sexos de tres proveedores distintos. Hasta el momento no se habían realizado estudios de este tipo, en los que se comparara el

aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones de una misma cepa aunque si encontramos en la literatura alusiones a diferencias en esta misma conducta dentro de ratas de la cepa Wistar (Hirarte y cols., 1989).

La conveniencia del uso de ratones de ambos sexos la hemos comentado previamente en esta tesis, aludiendo a la mayor representatividad de las muestras de sujetos y a las diferencias plausibles encontradas en el comportamiento de los animales, en este caso en la prueba de evitación inhibitoria. La existencia de diferencias sexuales en la ejecución de ratas en evitación inhibitoria es conocida desde hace décadas, mostrando los machos mejores resultados que las hembras (Heinsbroek y cols., 1988). En el caso de los ratones, las hembras son las que alcanzan mejores puntuaciones, memorizando mejor esta tarea (e.g. Vinader-Caerols y cols., 2012). Estas razones y algunas comentadas previamente en esta tesis son las que abogan por incluir sujetos de ambos sexos en nuestros experimentos de evitación inhibitoria.

Este experimento se realizó con el objetivo de observar las diferencias en la ejecución en evitación inhibitoria de ratones de ambos sexos de la cepa CD1 de tres proveedores distintos: Charles River (Lyon, Francia), Harlan (Holanda) y Janvier (Francia).

9.2. Material y método

- *Sujetos:*

Se utilizaron 48 ratones machos y 48 ratones hembras de la cepa CD1 de 42 días de edad, proveídos por Charles River (Lyon, Francia), Harlan (Holanda) y Janvier (Francia). Éstos fueron pesados y revisados a su llegada al laboratorio y sus pesos estaban comprendidos entre: 38-42 g para los machos Charles River, 29-34 g para las hembras Charles River, 38-40 g para los machos Harlan, 29-35 g para las hembras Harlan, 37-41 g para los machos Janvier y 27-32 g para las hembras Janvier. Los sujetos fueron alojados en grupos de 4 en jaulas de plástico translúcido (25x25x14 cm³) permaneciendo en condiciones estándar de laboratorio, con agua y comida *ad libitum*, con una temperatura ambiental controlada de 21 ± 2 °C y bajo un ciclo de luz-oscuridad invertido (oscuridad 07:30-19:30 h). El experimento se realizó durante el periodo de oscuridad y los animales tuvieron un periodo de adaptación al animalario de 11 días.

- *Aparatos*

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en los experimentos anteriores(ver apartado 6.2).

- *Procedimiento*

Los ratones fueron divididos en 3 grupos en cada sexo (n = 16) en función de su proveedor. Los grupos resultantes fueron: Charles River, Harlan y Janvier.

Este experimento al igual que los anteriores constó de dos fases. La *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaban por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración.

La *fase test* se realizó de la misma manera, 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico.



Fig. 9.1. Esquema de diseño del Experimento 4. s = segundos; mA = miliamperios; M = macho; ; H = hembra; n = n° de sujetos.

- *Análisis estadísticos*

Los datos de las latencias recogidas para cada una de las fases de la evitación inhibitoria fueron transformados en valores de proporción ($p = x/300$) y después a arcoseno de la raíz cuadrada ($\arcsen \sqrt{p}$) de acuerdo con Snedecor y Cochran, (1980). Esta transformación es adecuada cuando se aplica un tiempo máximo y las latencias que exceden este tiempo son interpretadas como si fuesen ese valor máximo.

Se realizó un ANOVA multivariado para las dos fases: *entrenamiento* y *test*. Los factores entre-sujetos fueron las variables Sexo y Proveedor, y como factor intra-sujetos la variable Fase (con dos niveles, Entrenamiento y Test). Además se realizaron pruebas t para muestras relacionadas para observar la presencia o no de aprendizaje para cada grupo.

9.3. Resultados

En la fase de entrenamiento, ninguno de los factores Sexo o Proveedor fueron estadísticamente significativos [$F_{(1,90)} = 2.49$, $p > 0.05$; $F_{(2,90)} = 0.78$, $p > 0.05$, respectivamente]. Igualmente, la interacción entre estos factores tampoco fue significativa durante el entrenamiento [$F_{(2,90)} = 2.75$, $p > 0.05$]. En la fase de test, el factor Proveedor fue estadísticamente significativo [$F_{(2,90)} = 3.56$, $p < 0.05$] y las comparaciones post-hoc (Scheffé) revelaron latencias más cortas en el test en el grupo Harlan respecto al grupo Charles River (ver Fig. 9.2). Hubo una tendencia a la significación para el factor Sexo

$[F_{(1,90)} = 3.53, p = 0.06]$ pero no para la interacción Sexo x Proveedor.

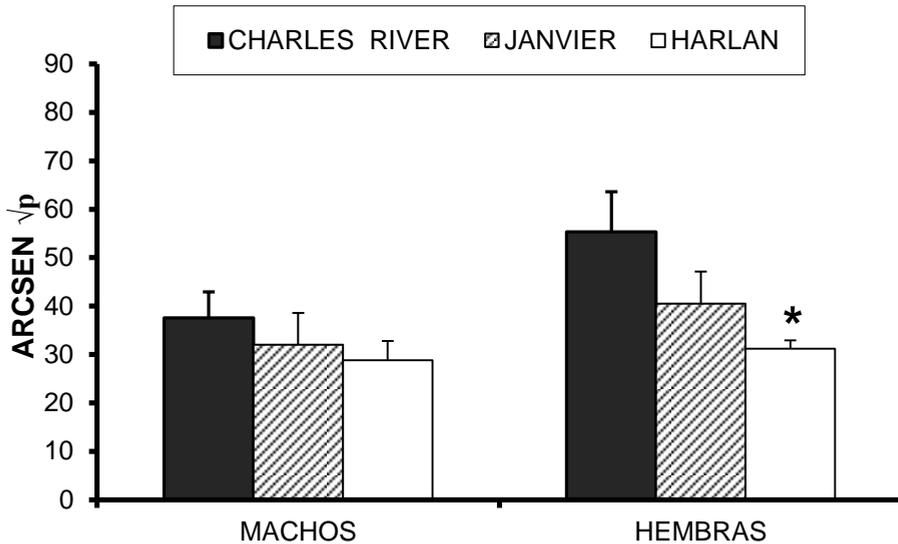


Fig. 9.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones adultos CD1 en función del sexo y del proveedor.* $p < 0.05$ vs Charles River.

Las comparaciones para muestras relacionadas mostraron aprendizaje de evitación inhibitoria, siendo las medias mayores en el test que en el entrenamiento, tanto en los machos [$t_{(15)} = 5.00, p < 0.01$] como en las hembras [$t_{(15)} = 5.08, p < 0.01$] en el grupo Charles River (ver Fig. 9.3).

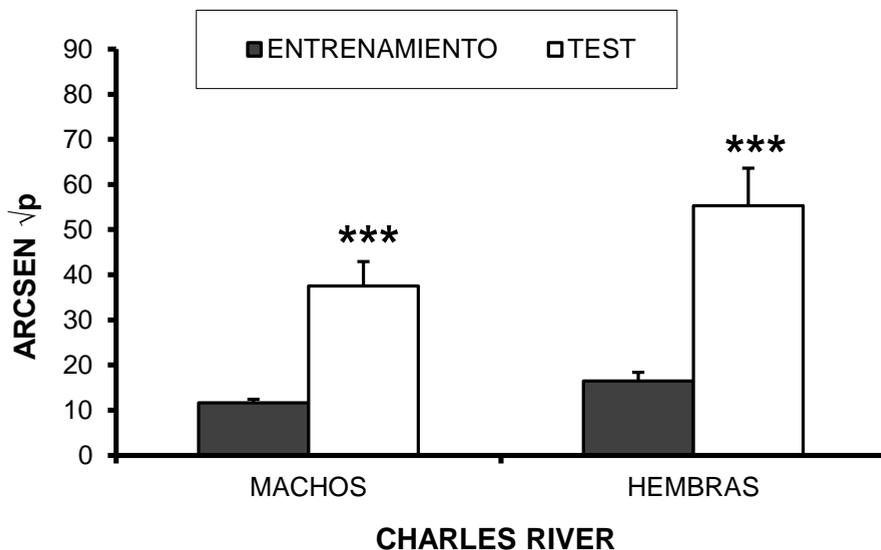


Fig. 9.3. Medias (+ETM) de las latencias en las fases de entrenamiento y test en ratones adultos CD1 de Charles River en función del sexo. *** $p < 0.001$ vs Entrenamiento.

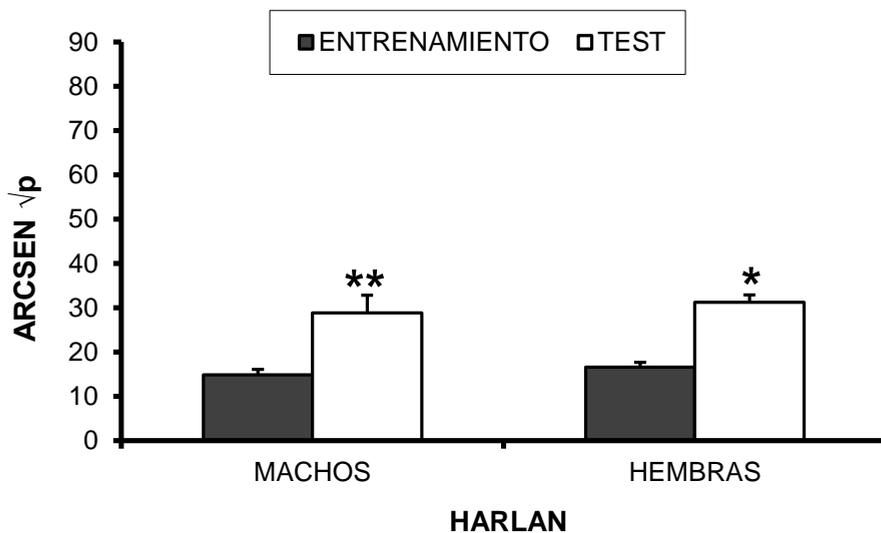


Fig. 9.4. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones adultos CD1 de Harlan en función del sexo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

En el grupo Harlan, el aprendizaje de la evitación inhibitoria fue observado en los machos [$t_{(15)} = 4.3$, $p < 0.01$], y en menor medida en las hembras [$t_{(15)} = 2.68$, $p < 0.05$] (ver Fig. 9.4).

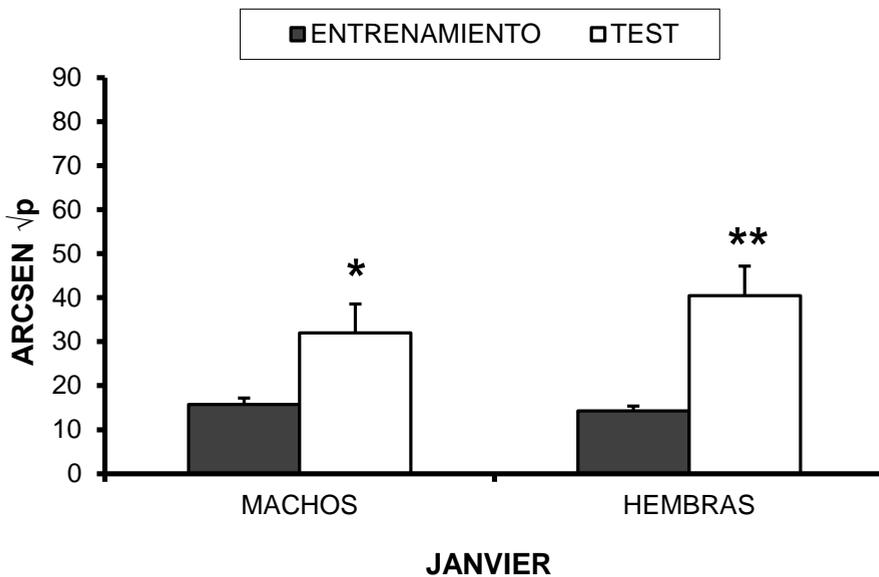


Fig. 9.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test de ratones adultos CD1 de Janvier en función del sexo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

El patrón contrario fue observado en el grupo Janvier, con aprendizaje de evitación inhibitoria en mayor medida en las hembras [$t_{(15)} = 3.84$, $p < 0.01$] que en los machos [$t_{(15)} = 2.47$, $p > 0.05$] (ver Fig. 9.5).

9.4. Discusión

En el presente estudio se investigó el aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras CD1 procedentes de tres proveedores comerciales distintos. El principal resultado de este experimento fue el efecto de la variable Proveedor, mostrando que los ratones Charles River adquirían el aprendizaje de evitación en mayor medida que los ratones Harlan. Los animales Janvier mostraron un nivel intermedio de aprendizaje sin diferencias significativas respecto a los otros dos grupos. Estas variaciones no podían ser debidas a diferentes niveles de actividad motora espontánea ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las latencias de cruce en la fase de entrenamiento. Estos resultados apuntan a que las diferencias podrían deberse a capacidades distintas de aprendizaje. Por otra parte, la variable Sexo mostró una tendencia estadística cercana a la significación. Estudios previos no siempre habían reportado diferencias sexuales en evitación inhibitoria, pero cuando lo hacían los mejores niveles de aprendizaje fueron mostrados por los grupos de hembras (e.g. Vinader-Caerols y cols., 2012). Así, estos resultados concordaron con algunos previamente publicados y ratificaron la importancia de la inclusión de hembras en los estudios de evitación inhibitoria con el fin de reflejar en mayor medida la naturaleza de este aprendizaje.

Como comentamos previamente, en los estudios conductuales de farmacología, es una condición indispensable para cualquier experimento el contar con un grupo control adecuado que muestre aprendizaje de evitación inhibitoria. Este experimento fue motivado por la ausencia de este aprendizaje en los animales de algunos experimentos previos de esta tesis (Experimento 1 y Experimento 3). Las comparaciones realizadas para la comprobación de tal aprendizaje para cada grupo, revelaron la presencia de evitación inhibitoria en los animales de los tres proveedores pero el nivel más bajo de significación fue obtenido por el grupo de animales de Harlan. Si tomamos en cuenta que el tamaño grupal en este experimento fue mayor al de los previos, estos resultados fueron en la misma línea que los que habíamos obtenido previamente. Los resultados obtenidos, mostraron que los ratones Charles River eran los mejores sujetos experimentales para los procedimientos usados en nuestro laboratorio. Las diferencias conductuales mencionadas en este estudio pueden estar relacionadas con las características fisiológicas de los sujetos que se han desarrollado en un largo periodo de tiempo de reproducción en cada colonia determinada, como fue sugerido por Hirarte y cols. (1989), que obtuvieron resultados similares en ratas Wistar provenientes de diferentes proveedores. Por otra parte, las diferencias en las condiciones de alojamiento empleadas por los criaderos podrían tener efectos en la capacidad de los animales para aprender la conducta de evitación inhibitoria.

Nuestros datos sugieren que de manera adicional a la cepa utilizada (Johnson y cols., 2010), el proveedor es un factor a tener en cuenta en experimentos de aprendizaje animal. En nuestro trabajo, el sexo fue importante en la identificación de los animales del criadero Charles River como los ratones que mejor aprenden la tarea. Muchas de las investigaciones conductuales llevadas a cabo con animales se realizan únicamente con sujetos machos, una práctica que podría estar basada más en creencias que en datos científicos. La secreción cíclica de hormonas sexuales en hembras (contra la secreción tónica en machos) es considerada una fuente de variabilidad en datos obtenidos en hembras. Aunque esto es relevante para las variables fisiológicas durante el ciclo estral en el contexto de estudios longitudinales, puede no afectar a las medidas tomadas de forma transversal (e.g., medidas tomadas solo una vez en un experimento). Las oscilaciones fisiológicas alrededor del ciclo estral están relacionadas con la conducta reproductiva de las hembras, y está demostrado que éstas también están altamente asociadas con conductas no reproductivas (Beatty, 1979). Esta evidencia no es suficiente para esperar alta variabilidad en datos conductuales obtenidos en hembras. Observaciones en nuestro laboratorio, y resumidas en Parra y cols. (1999), contradicen esta asunción. En el estudio en cuestión, se comparó el error típico de la media (ETM) de medidas tomadas en machos y hembras durante 5 días de cruces en entrenamiento en evitación activa, con medidas de la latencia de respuesta y número de cruces

durante intervalos entre-ensayos. De un total de 171 pares (un grupo de machos y otro homólogo de hembras) el ETM fue más alto en machos que en hembras en 97 casos, mientras lo contrario ocurrió en 73 casos, y ambos miembros fueron iguales en un caso. Además, si la variabilidad de las hembras fuera dependiente de las variaciones hormonales del ciclo reproductivo, las hembras ovariectomizadas deberían haber mostrado ETMs más bajos que sus homólogas no operadas. Los datos no confirmaron esta hipótesis: el ETM de los controles fue más alto que el de las ovariectomizadas en solamente 16 de 30 casos. Por ello, a pesar de la presunta mayor variabilidad de los datos, las hembras deben ser incluidas como sujetos experimentales para que las condiciones de laboratorio representen en mayor medida la naturaleza, y porque muchas diferencias sexuales en conductas no reproductivas han sido ya observadas (Galea y cols., 2008). Estos resultados necesitarán ser corroborados por estudios electrofisiológicos y análisis genéticos que podrían ayudar a identificar las posibles modulaciones genéticas que subyacen las diferencias observadas entre animales de diferentes procedencias y que ratificarían nuestros resultados comportamentales. Considerados en un contexto más amplio, el presente estudio demostró que la evitación inhibitoria de ratones de la misma cepa puede variar dependiendo del proveedor, siendo el sexo también una variable relevante en este tipo de estudios. Este trabajo fue publicado en *Behavioral Processes* (Parra y cols., 2013).

CAPÍTULO 10
EXPERIMENTO 5: Efectos
de la administración de
escopolamina y R-8-OH-
DPAT en evitación
inhibitoria de ratones
prepuberales Charles River

10.1. Introducción

El objetivo principal de esta tesis, como hemos explicado anteriormente, fue dilucidar los efectos de dos fármacos en administración post-entrenamiento sobre la evitación inhibitoria en ratones machos y hembras de 3 etapas distintas de desarrollo. Estos fármacos fueron la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT en tres dosis y en tres combinaciones de ellas. Teniendo en cuenta los resultados de los tres primeros experimentos de esta tesis, donde los sujetos controles con los que comparábamos los tratados con dichos fármacos no habían aprendido la tarea en dos de los tres casos, éstos perdían validez. Por ello se planteó el Experimento 4 (capítulo 9) en el que se obtuvieron resultados clarificadores (los sujetos adultos que aprendían la tarea en ambos sexos eran sujetos de un proveedor determinado) llegando a la conclusión de que no todos los sujetos son igual de adecuados para los estudios de aprendizaje de evitación inhibitoria, según el proveedor, y que los sujetos que cumplían los criterios para ser animales con los que poder comparar ambos sexos y que mejor aprendían la tarea eran los que provenían de Charles River (Parra y cols., 2013).

A tenor de estos resultados se cambió de proveedor para el resto de experimentos de esta tesis. Como ya hemos explicado, en trabajos anteriores a este, con diferentes fármacos y evitación inhibitoria, se utilizaban sujetos de la casa Charles River (e.g. Everss cols., 2005; Monleón y cols., 2002). A partir

de los experimentos realizados para esta tesis y después de haber utilizado otros animales de la misma cepa CD1 (provenientes de Harlan) se determinó el volver a incluir en nuestros experimentos ratones CD1 de la cepa Charles River ya que para estos experimentos garantizaba el aprendizaje de nuestros sujetos controles en ambos sexos.

Así, el Experimento 5 fue una repetición del primer experimento de esta tesis (ver Capítulo 6). En él se procedió al estudio de los efectos de los fármacos escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en evitación inhibitoria y en administración post-entrenamiento en ratones CD1 machos y hembras en etapa prepuberal. La diferencia respecto al primer experimento, fue que en este caso los animales utilizados fueron del proveedor comercial Charles River. Como hemos explicado en algún caso la edad de los sujetos es un factor importante a tener en cuenta para estudiar los efectos de la escopolamina (Klinkenberg y Blokland, 2010). Además Smith y cols., (1996), en un estudio para evaluar la evitación inhibitoria en ratas encontraron que la edad de los sujetos correlacionaba significativamente con el nivel de aprendizaje de la tarea, evaluando ratas desde el día 16 de edad al día 63. Las ratas más jóvenes mostraban mayor tasa de olvido y menor velocidad de retención. Estos resultados estarían en consonancia con nuestros resultados con animales Harlan, en los que no se encontró aprendizaje de los animales controles prepuberales aunque nuestra hipótesis inicial se centró en la edad de éstos, más tarde comprobamos que el proveedor era

importante a la hora de que los animales aprendieran o no la tarea.

10.2. Material y método

- Sujetos

Se utilizaron 100 ratones machos y 100 ratones hembras de la cepa CD-1 de Charles River (Lyon, Francia) de 8 semanas de edad con pesos comprendidos entre 30-38 g para los machos y 22-34 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- Fármacos

Los fármacos utilizados fueron bromhidrato de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) al igual que en los experimentos 1, 2 y 3. Fueron preparados bajo las condiciones detalladas en el apartado 6.2e inyectados (*i.p.*) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. Las dosis también fueron las mismas que en los 3 primeros experimentos. Para la escopolamina, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg y para el R-(+)-8-OH-DPAT 0.1, 0.2 y 0.3 mg/kg.

- Aparatos

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el experimento 1 (ver Apartado 6.2).

- Procedimiento

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos de tratamiento que en los tres primeros experimentos, con un total de 10 grupos por sexo.

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en los experimentos 1, 2 y 3. A modo de resumen el experimento constó de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (*i.p.*) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico y que no recibía tratamiento tras el pase.

- Análisis estadísticos

Como en los experimentos anteriores se analizaron los datos recurriendo al Análisis de Varianza para la fase de entrenamiento para comprobar si había diferencias antes del entrenamiento en los grupos y para la fase de test para

observar las diferencias entre éstos tras recibir dicho tratamiento. Al igual en los experimentos anteriores, se realizaron también comparaciones mediante pruebas t para muestras relacionadas para comprobar la presencia o no de aprendizaje en cada grupo.

10.3. Resultados

El análisis de varianza de las latencias en la fase de entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos [$F_{(9,180)} = 0.63$, $p > 0.05$] y mostró diferencias de sexo significativas entre las latencias de machos y hembras [$F_{(1,180)} = 14.73$, $p < 0.05$] (ver Fig. 10.1).

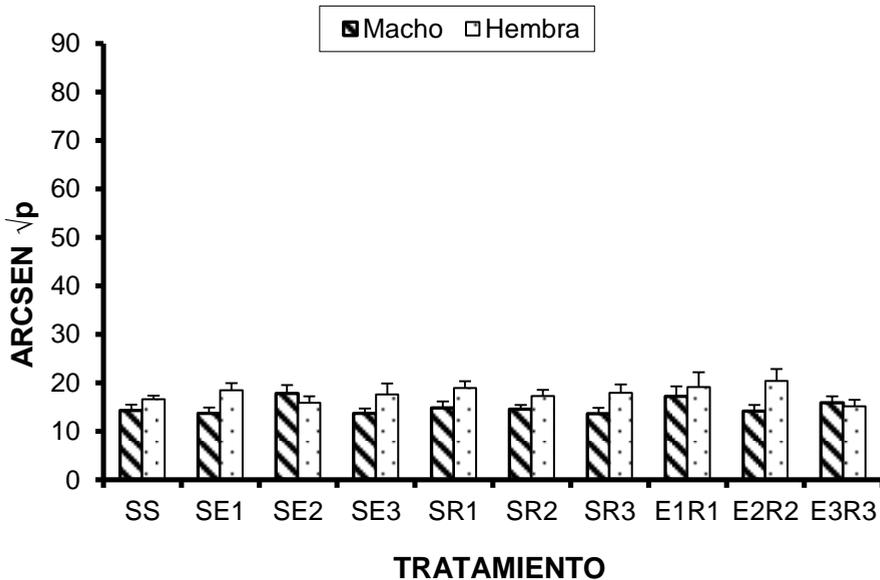


Fig. 10.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones prepuberales en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

El ANOVA realizado para la fase de test mostró que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo, [$F_{(9,180)}=0.704$, $p>0.05$]. La variable Sexo fue estadísticamente significativa, [$F_{(1,180)}=11.51$, $p<0.05$], mostrando las hembras latencias mayores que los machos, y no lo fue la interacción, [$F(9,180)=0.973$, $p>0.05$] (ver Fig. 10.2).

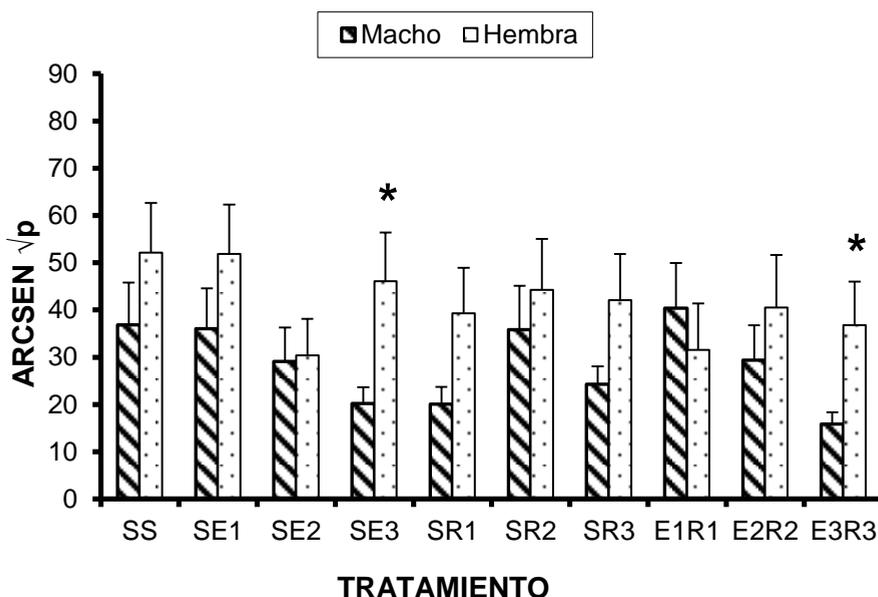


Fig. 10.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones prepuberales en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3

mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Machos.

Las pruebas t para muestras independientes realizadas para las latencias de la fase de test de cada grupo mostraron diferencias significativas entre machos y hembras de los grupos SE3 y E3R3, con mayores latencias de las hembras en ambos casos (ver Fig. 10.2).

La figura 10.3 resume las latencias de cruce de todos los grupos de tratamiento en entrenamiento y test. En ella constan todos los grupos sin separación por sexo, mostrando en todos los casos diferencias significativas entre las latencias en las distintas fases, exceptuando el grupo E3R3.

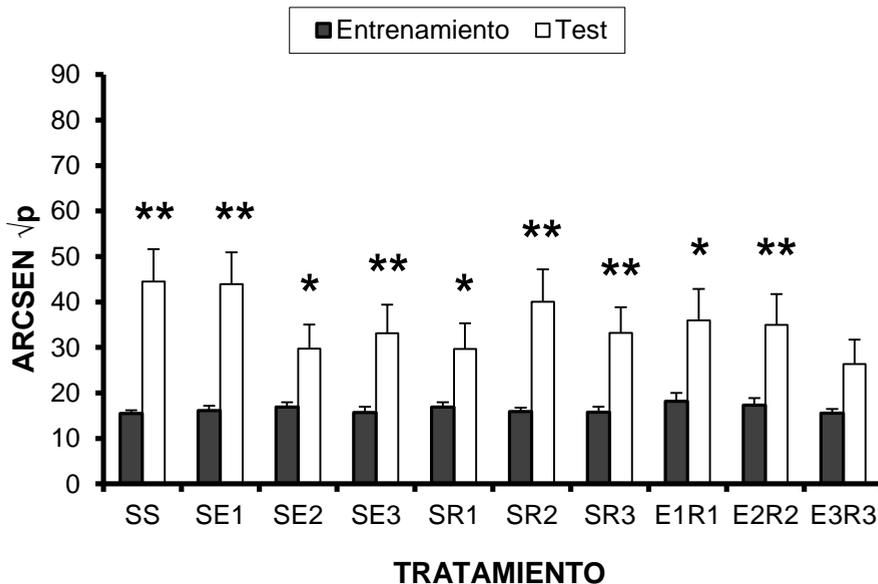


Fig. 10.3. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones prepuberales en función del tratamiento recibido. SS: salino, SE1:

salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Para comprobar si los sujetos habían aprendido la tarea de evitación se realizaron pruebas t para muestras relacionadas. Éstas mostraron que en el caso de los machos hubo aprendizaje de la tarea para el grupo SS (grupo control) [$t_{(9)} = 2.40$, $p < 0.05$]. En cuanto a los grupos de tratamiento se observaron grupos de machos y de hembras en los cuales hubo deterioro en el aprendizaje de la tarea, es decir que no aprendieron. Para los grupos de machos hubo efectos de deterioro en los grupos SE2 [$t_{(9)} = 1.45$, $p > 0.05$], SE3 [$t_{(9)} = 2.08$, $p > 0.05$], SR1, [$t_{(9)} = 1.32$, $p > 0.05$], E2R2 [$t_{(9)} = 1.93$, $p > 0.05$] y E3R3 [$t_{(9)} = 0.02$, $p > 0.05$]. (ver Fig. 10.4).

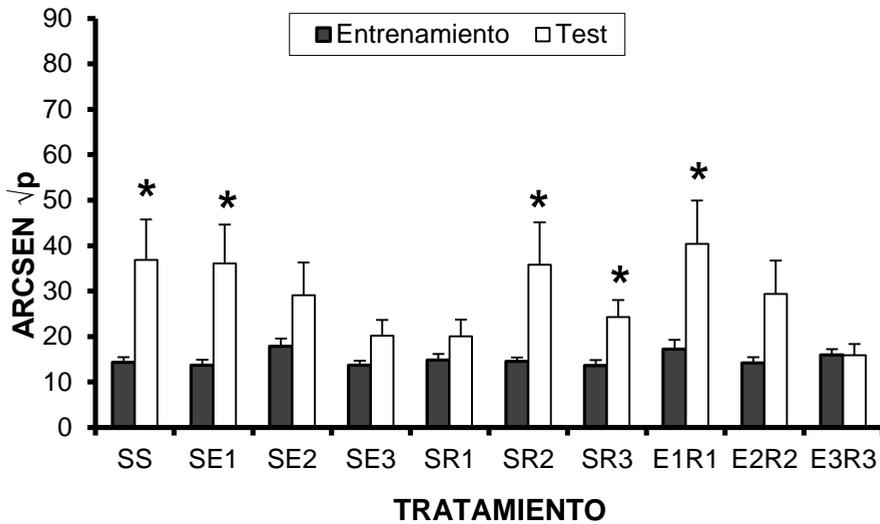


Fig. 10.4. Medias (+ETM) de las latencias en entrenamiento y test en MACHOS prepuperales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Entrenamiento.

En el caso de las hembras al igual que en el mismo grupo de hembras [$t_{(9)} = 3.32, p < 0.05$], se encontraron deterioros en el aprendizaje de la tarea en los grupos SE2 [$t_{(9)} = 1.88, p > 0.05$], SR1 [$t_{(9)} = 2.20, p > 0.05$], E1R1 [$t_{(9)} = 1.32, p > 0.05$], E2R2 [$t_{(9)} = 2.08, p > 0.05$] y E3R3 [$t_{(9)} = 2.11, p > 0.05$] (ver Fig. 10.5).

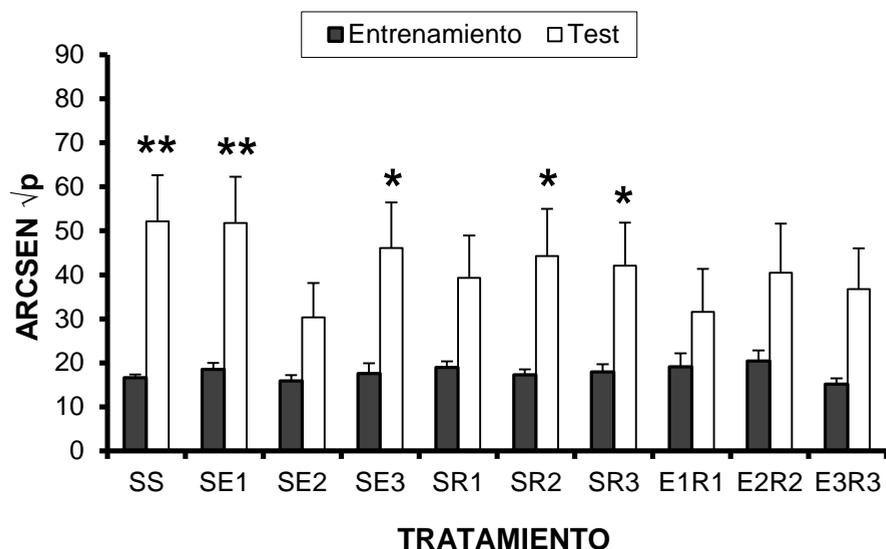


Fig. 10.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS prepuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

10.4. Discusión

Este experimento tuvo como principal objetivo clarificar los efectos que la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT tenían en el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria en ratones prepuberales (3 semanas de edad) machos y hembras.

Los efectos del tratamiento no fueron estadísticamente significativos, sí lo fue el sexo, mostrando mayor aprendizaje

de evitación las hembras y no lo fue la interacción. Las diferencias significativas mostradas para la variable sexo estaban en concordancia con los experimentos realizados previamente por el grupo de investigación, no para esta etapa de desarrollo pero sí en etapas posteriores. El mayor aprendizaje de las hembras ha sido observado en diferentes estudios del grupo de investigación (e.g. Arenas y cols., 2006; Monleón y cols., 2002) aunque siempre en sujetos adultos. Esto apunta a diferencias sexuales en etapas muy tempranas de desarrollo que aunque no se perpetúan en todos los experimentos realizados con ambos sexos, sí lo hacen en la mayoría de ellos.

En relación a los deterioros observados en el aprendizaje de la tarea, éstos se observaron en los grupos de machos que recibieron la dosis media y alta de escopolamina (1.0 y 3.0 mg/kg), mostrando latencias menores a medida que se aumentaba la dosis del fármaco, algo que podría apuntar a una efectividad de estas dosis para animales de tan corta edad. Los animales que recibieron la dosis baja de R-(+)-8-OH-DPAT (0.1 mg/kg) fueron los únicos que mostraron deterioro para dicha sustancia, además en los dos sexos, y observando en la gráfica un efecto en forma de campana, algo habitual en los efectos de algunos fármacos sobre la conducta animal, es decir, que aunque los efectos únicamente fueron significativos en la dosis menor, tanto en machos como en hembras, se ve menor efectividad bloqueante de la memoria de la tarea en la dosis intermedia que en la alta. En cuanto a la combinación de

fármacos, en este caso observamos diferencias entre los efectos en los machos y en las hembras. Mientras la acción para los machos es muy coincidente con la producida por la escopolamina, siendo ineficaz la dosis más baja y creciendo a medida que aumenta la dosis, en los grupos de combinación de fármacos para las hembras se observa el mismo patrón que en el caso del R-(+)-OH-DPAT, mostrando en la combinación una sinergia de los efectos que por sí solo no mostraba el fármaco para todas las dosis pero manteniendo el patrón de forma de campana que se ha observado en otros fármacos donde dosis más altas o intermedias producen un efecto similar sobre las latencias de cruce al efecto producido por el vehículo únicamente (Smith y cols., 1996). Estos datos sugieren en general algo que estos mismos autores habían observado y es que las latencias de cruce en sujetos de esta edad son relativamente más bajas a las observadas en sujetos adultos por lo que las memorias de estos aprendizajes pueden ser más frágiles y fáciles de manipular farmacológicamente. Aunque en este experimento hayamos observado aprendizaje de la tarea para casi todos los grupos analizando los datos sin separar por condición sexual, observamos muchos grupos de deterioro debido a los fármacos que en experimentos con sujetos adultos y fármacos equivalentes no se han observado. Podemos considerar que estos resultados están a favor de una influencia combinada (Jeltsch-David y cols., 2008) entre los sistemas de neurotransmisión colinérgica y serotoninérgica en la memoria de la evitación pasiva que son muy evidentes en la

etapa prepuberal y que se ve influida por el factor sexo. Este factor puede tener un papel facilitador de una sinergia (Steckler y Sahgal, 1995) en el caso de las hembras y de la anulación de uno de los fármacos en el caso de los machos. El desarrollo cerebral sexo-dimórfico se ha podido observar en diferentes estudios en animales y humanos, observando diferencias tanto estructurales como neuroquímicas. Los marcadores colinérgicos del prosencéfalo basal alcanzan niveles similares a los que se observan en animales adultos antes en las hembras que en los machos (Loy y Sheldon, 1987; Riccen y cols., 1997). Además se han observado más receptores 5-HT_{1A} en diferentes regiones cerebrales en las hembras que en los machos (Cosgrove y cols., 2007). Todo esto sugiere junto con datos conductuales de diferentes tareas, que las manipulaciones farmacológicas en un periodo determinado del desarrollo pueden tener consecuencias diferentes en cada uno de los sexos y que las ventanas de más vulnerabilidad a los efectos de los fármacos pueden ser en momentos diferentes para machos y hembras (Berger-Sweeney, 2003).

De estos resultados pudimos deducir que la escopolamina y R-8-OH-DPAT en sujetos prepuberales son efectivos de manera dependiente de la dosis en su administración post-entrenamiento y que los efectos encontrados son sexo-dimórficos por las características morfológicas, de desarrollo y de maduración de los sistemas de neurotransmisión en ambos sexos.

CAPÍTULO 11
EXPERIMENTO 6: Efectos
de la administración de
escopolamina y R-8-OH-
DPAT en evitación
inhibitoria de ratones
postpuberales Charles River

11.1. Introducción

En el Experimento 5 comprobamos que la administración aguda post-entrenamiento de tres dosis de escopolamina y R-(+)-OH-DPAT, solas o en combinación, tuvieron efectos deteriorantes dependientes de la dosis en la consolidación de la memoria de ratones prepuberales de la cepa CD1 de Charles River. Además se observaron diferencias sexuales en general en el aprendizaje de la tarea, es decir que los ratones de esta cepa ya difieren o incluso podrían tener capacidades distintas de aprendizaje en un sexo y en otro. La amnesia producida por los fármacos se observó tanto en machos como en hembras, siendo la combinación de los dos fármacos casi en todas las dosis causantes de deterioro del aprendizaje de la tarea, aunque con un patrón distinto para cada sexo. Esto reveló un efecto sumatorio o de sinergia descrito en la literatura y explicado por la modulación serotoninérgica sobre la función colinérgica y la implicación de esta última en los mecanismos de memoria (Stecker y Sahgal, 1995).

En el Experimento 2, se evaluaron los mismos efectos de estos dos fármacos en sujetos postpuberales, aunque en dicho experimento se aceptaron los resultados por haber contado con grupos controles para los dos sexos que aprendieron la tarea, la serie de experimentos realizada para las tres edades perdió validez por los resultados obtenidos en las etapas prepuberal y adulta, como consecuencia del cambio de proveedor de animales. En dicho caso se encontraron

deterioros en el aprendizaje de la tarea en algunos grupos de machos. Aunque no se encontraron efectos significativos del tratamiento sí se observaron efectos del sexo, algo bastante habitual que luego no se observó en las pruebas para muestras independientes siendo un efecto general y no determinado para ningún grupo.

Este experimento que estamos presentando consistió en la repetición de dicho experimento 2. En él se evaluaron los efectos de escopolamina y R-(+)-OH-DPAT en su administración post-entrenamiento en sujetos postpuberales machos y hembras pero en este caso con sujetos del proveedor Charles River. De esta manera se intentaron clarificar los efectos de deterioro por la administración de un fármaco interviniente en la neurotransmisión colinérgica y otro en la serotoninérgica y su interacción en distintas dosis. Por otra parte, se pretendió evaluar cómo los deterioros encontrados en la memoria de la tarea de evitación inhibitoria van evolucionando con la edad de los sujetos y la implicación de las diferencias sexuales en esta evolución conductual. En el cerebro maduro, se ha identificado el sistema serotoninérgico con una importante función como neurotransmisor, siendo uno de los más tempranos sistemas que aparecen en el desarrollo del cerebral (la serotonina ha sido relacionada con la regulación del desarrollo del sistema nervioso mediando en factores de crecimiento, proliferación y diferenciación celular). Estos procesos se ven afectados por la activación de receptores

específicos de serotonina expresados en las etapas adecuadas en el cerebro en desarrollo. (Patel y Zhou, 2005).

Se ha observado un deterioro en el experimento anterior, incidiendo en los sistemas de neurotransmisión diana de este estudio, con sujetos prepuberales. Por otro lado, y como ya hemos comentado en una ocasión anterior, Smith y cols. (1996) concluyeron en un estudio de la evitación inhibitoria en sujetos de varias edades, que el aprendizaje de esta tarea es una función directa y lineal ligada a la edad de los sujetos, argumentando que la ventana de vulnerabilidad en la cual se puede incidir en los procesos mnésicos farmacológicamente podría ser mayor cuanto más temprano se evalúa el aprendizaje, siendo éste de una calidad menor y mayor labilidad.

11.2. Material y método

- Sujetos

Se utilizaron 103 ratones machos y 103 ratones hembras de la cepa CD-1 del proveedor Charles River (Lyon, Francia) de 5 semanas de edad con pesos comprendidos entre 27-39 g para los machos y 20-27 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- Fármacos

Los fármacos utilizados fueron bromhidrato de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) al igual que en los experimentos anteriores. Fueron preparados bajo las condiciones detalladas en el apartado 6.2, de esta tesis e inyectados (*i.p.*) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. Las dosis fueron las mismas utilizadas anteriormente. Para la escopolamina, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg y para el R-(+)-8-OH-DPAT 0.1, 0.2 y 0.3 mg/kg.

- Aparatos

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el apartado 6.2.

- Procedimiento

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos de tratamiento que en los tres primeros experimentos, con un total de 10 grupos por sexo (a diferencia de otros experimentos se incluyeron 3 ratones más por sexo en los grupos control).

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en el Experimentos 1, 2,3 y 5. A modo de resumen el experimento constó de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras

el pase cada animal recibió dos inyecciones (*i.p.*) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase de test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico y que no recibía tratamiento tras el pase.

- *Análisis estadísticos*

Se analizaron los datos con las mismas pruebas de estadística paramétrica que se emplearon en experimentos anteriores (ver Apartado 6.2).

11.3. Resultados

El análisis de varianza de las latencias en entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos [$F_{(9,186)} = 0.84, p > 0.05$] y tampoco mostró diferencias de sexo significativas [$F_{(1,186)} = 1.54, p > 0.05$](ver Fig. 11.1).

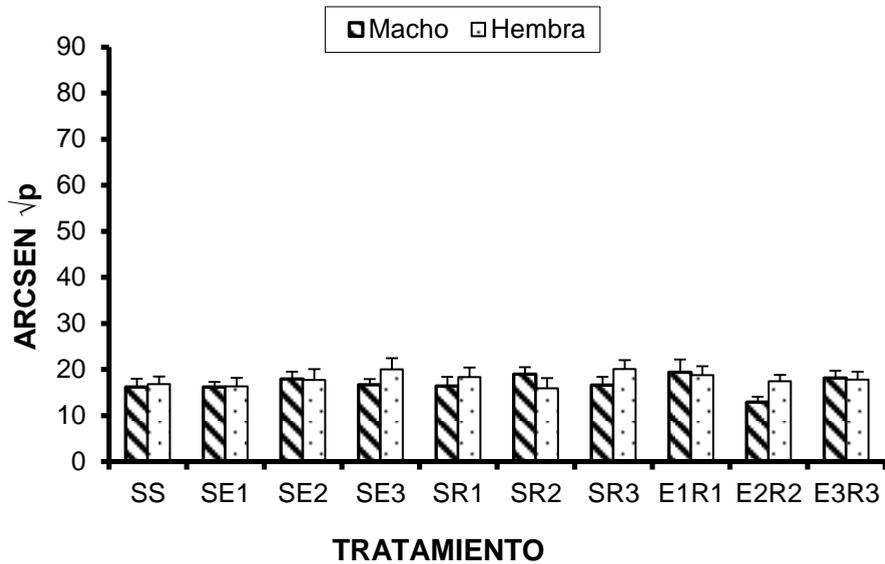


Fig. 11.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones postpuberales en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En el análisis de varianza de la fase de test se observó que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo [$F_{(9,186)} = 1.07, p > 0.05$]; sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,186)} = 11.01, p < 0.01$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción [$F_{(9,186)} = 1.34, p > 0.05$] (ver Fig. 11.2). Las pruebas t para muestras independientes mostraron diferencias de sexo significativas en los grupos SE3 [$t_{18} = 3.31, p < 0.01$] y SR2 [$t_{18} = 2.94, p < 0.01$].

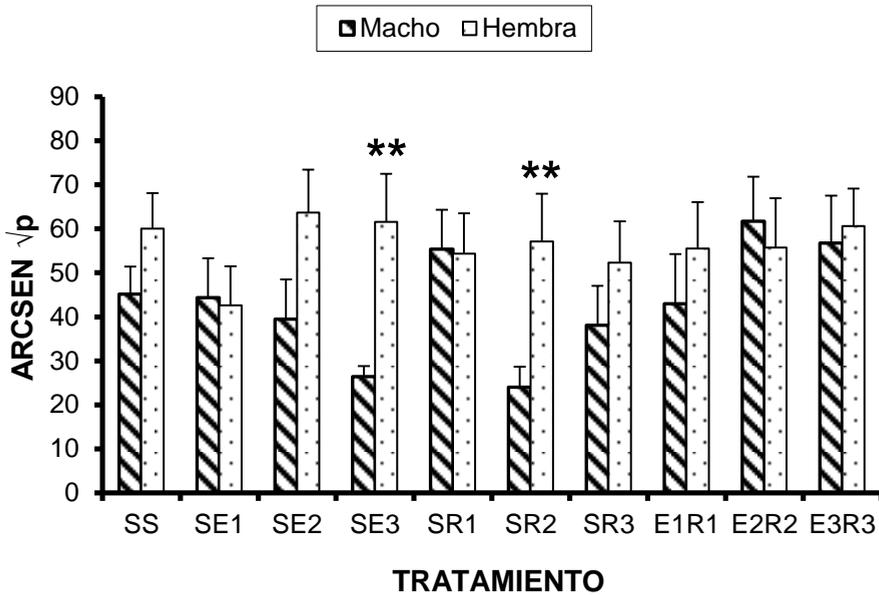


Fig. 11.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones postpuberales en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. $**p < 0.01$ vs Macho.

La gráfica siguiente resume las latencias de cruce de todos los grupos de tratamiento en entrenamiento y test. En ella constan todos los grupos sin separación del sexo. En las pruebas t para muestras relacionadas sin tener en cuenta la variable sexo mostraron aprendizaje para todos los grupos.

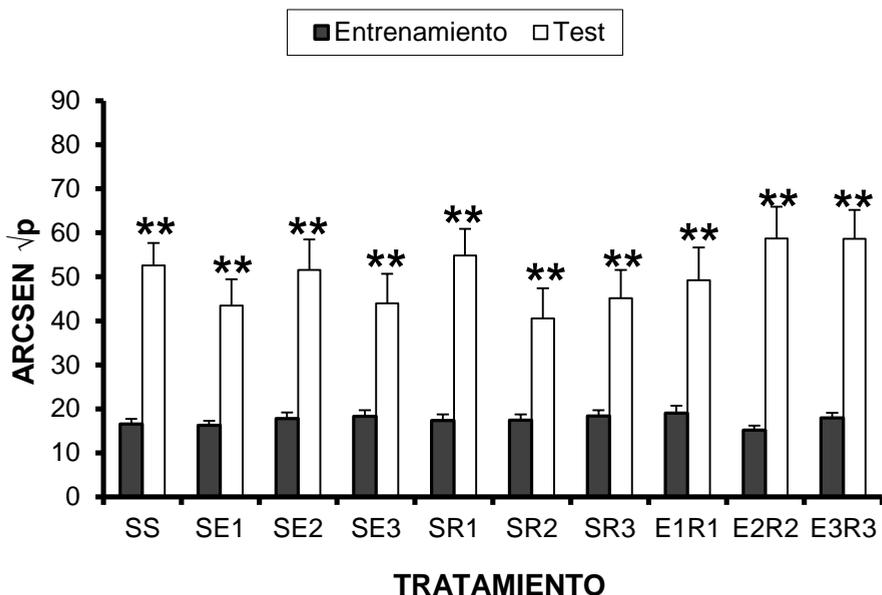


Fig. 11.3. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones postpuberales en función del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Las pruebas *t* para muestras relacionadas realizadas para observar el aprendizaje en cada grupo y en cada sexo revelaron que el grupo control de machos mostró latencias significativamente mayores en el test que en el entrenamiento, mostrando aprendizaje de la tarea [$t_{12} = 4.61$, $p < 0.01$]. Este aprendizaje fue observado en la mayoría de los grupos, exceptuando los grupos SR2 [$t_9 = 1.04$, $p > 0.05$] y E1R1 [$t_9 = 2.17$, $p > 0.05$] (ver Fig. 11.4).

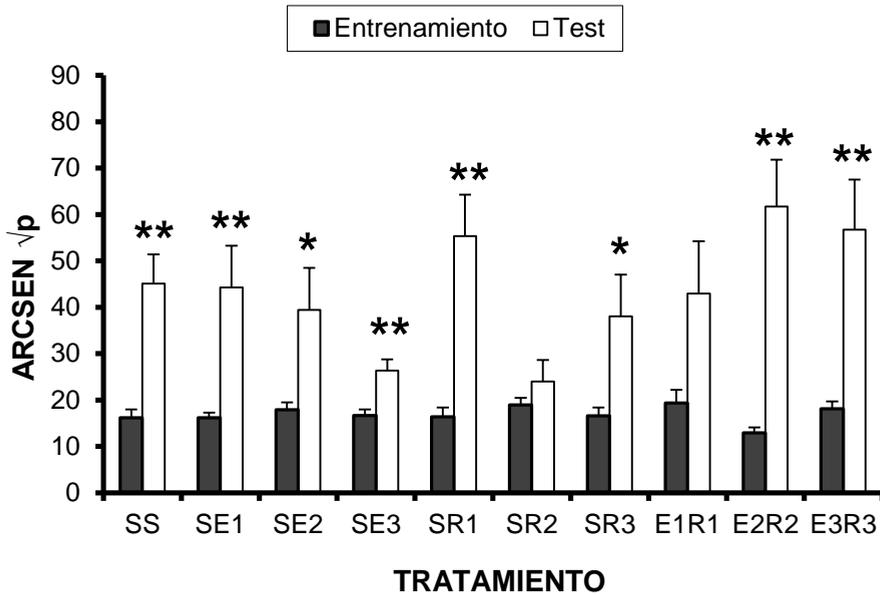


Fig. 11.4. Medias (+ETM) de las latencias en entrenamiento y test de MACHOS postpuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Entrenamiento.

En cuanto a las hembras, las pruebas t para muestras relacionadas revelaron aprendizaje tanto para el grupo control [$t_{12} = 5.98, p < 0.01$] como para todos los grupos de tratamiento, resultando en diferencias estadísticamente significativas en todos los casos.

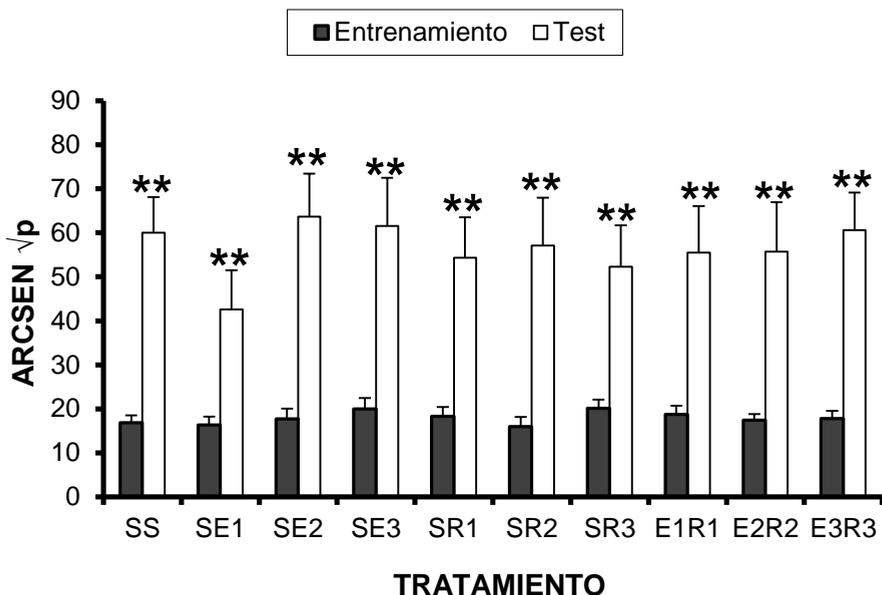


Fig. 11.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS postpuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

11.4. Discusión

En este experimento se estudió el efecto de tres dosis de escopolamina, tres de R-(+)-8-OH-DPAT y sus tres combinaciones en administración post-entrenamiento sobre la memoria de evitación inhibitoria en ratones postpuberales Charles River machos y hembras.

Éste tuvo como resultado el deterioro de la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en algunos de los grupos de tratamiento únicamente perteneciente al sexo masculino, mostrando diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA del test (no en el entrenamiento) y mostrando también diferencias significativas entre machos y hembras en dichas latencias de test. Los grupos de machos en los que se encontró deterioro en la consolidación de la tarea fueron los que recibieron la dosis intermedia de R-(+)-8-OH-DPAT (SR2, que recibieron 0.2 mg/kg del fármaco) y el grupo de combinación que recibió la dosis más baja de cada uno de ellos (E1R1, que recibieron escopolamina 0.3 mg/kg + R-(+)-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg). Ninguno de los grupos que recibió escopolamina solamente mostró deterioro en la memoria de la tarea. Los efectos de la variable sexo, como hemos comentado en varias ocasiones son habituales en nuestros experimentos con adultos, aunque ya se observó en el experimento anterior con animales prepuberales que las diferencias sexuales se muestran de manera evidente desde etapas muy tempranas del desarrollo. Estas diferencias fueron patentes tanto en las latencias en general de la fase test, donde las hembras muestran latencias significativamente mayores que los machos y además se observó una consolidación de la tarea en todos los grupos de tratamiento, quedando los fármacos inefectivos. La acción hormonal descrita en Shapiro y cols., (1995), podría explicar que las hormonas sexuales muy activas en esta etapa del desarrollo impidieran en gran medida, sobretodo en el caso

de las hembras, que el fármaco llegara en cantidad suficiente a los lugares de acción con el fin de producir efectos sobre la memoria. Se podría hipotetizar que la afluencia de hormonas en la edad postpuberal, podría producir un aumento de la metabolización de los fármacos que produjera menores efectos sobre la memoria y consecuentemente la conducta de evitación inhibitoria en este caso.

Por otra parte, los deterioros encontrados, en el caso del R-(+)-OH-DPAT fueron en su dosis intermedia, algo que ocurrió en el experimento anterior, con machos y hembras prepuberales en su dosis más baja. Esta dosis fue efectiva en ambos sexos para impedir la consolidación de la memoria de evitación pasiva. En este caso pudo deberse a la menor vulnerabilidad de los sujetos a medida que aumenta la edad de éstos a ser afectados por los fármacos y a necesitar una dosis mayor para que los fármacos sean efectivos, o -como hemos mencionado- a la menor disponibilidad de los fármacos para llegar a sus sitios de unión por los efectos hormonales sobre la metabolización de éstos. La combinación efectiva en este caso fue la de las dosis más bajas administradas conjuntamente, algo que por separado no resultó deteriorante. En otro capítulo hemos comentado que este fenómeno sinérgico ocurrió también en uno de los experimentos anteriores a esta tesis llevado a cabo por nuestro grupo de investigación con la administración de amitriptilina y fluoxetina a la vez (Parra y cols., 2010). Stecker y Sahgal, (1995), en una revisión de las interacciones de estos dos sistemas de neurotransmisión y sus

efectos conductuales, exponen que las manipulaciones de ambos a la vez pueden afectar de manera distinta en la cognición y la conducta. En algunos casos el efecto de un fármaco amortigua el efecto del otro, es decir, que si uno de los dos bloquea la memoria de una tarea, el otro puede impedir esta acción, con lo que en lugar de observarse efectos sumatorios, éstos quedarían anulados. Además pueden existir efectos sinérgicos, reportados por otros estudios, como los que se observan en experimentos donde se produce una lesión o un bloqueo en ambos sistemas de neurotransmisión que no se produce al bloquear ambos sistemas por separado, que sería lo que nos ocurre en este caso para las dosis bajas combinadas en el grupo de machos. En esta misma revisión (Steckler y Sahgal, 1995) los autores hacen referencia a que en ocasiones algunos fármacos pueden actuar de varias maneras según a qué receptores afecten, como es el caso de un estudio en el que se administró 8-OH-DPAT en hipocampo para sumar sus efectos a los de la administración de escopolamina, produciendo deterioros en la discriminación del laberinto de agua (Carli y cols., 1992). Por otra parte, en otro estudio se activaron los autorreceptores de serotonina 5-HT_{1A}, administrando 8-OH-DPAT para aumentar la segregación de acetilcolina y consiguiendo anular los deterioros producidos por escopolamina (Bianchi y cols., 1990). Esto depende en gran parte de los receptores 5-HT_{1A} pre- o post-sinápticos que se activen y de la tarea específica de memoria que se utilice.

Podríamos concluir con la afirmación de que los efectos de deterioro encontrados fueron mucho menores en sujetos post-puberales frente a prepuberales y que el factor sexo fue muy importante para que los sujetos presentaran o no deterioros en la conducta. Se encontraron efectos deteriorantes en el caso de R-(+)-8-OH-DPAT en la dosis intermedia y en la combinación de dosis bajas mostrando un efecto sinérgico que en el caso de las demás combinaciones no se produjo y que estos deterioros solo se pudieron observar en sujetos machos, frente a las hembras que mostraron latencias mucho más altas en general y aprendieron mejor la tarea de evitación inhibitoria.

CAPÍTULO 12

EXPERIMENTO 7: Efectos

de la administración de

escopolamina y R-8-OH-

DPAT en evitación

inhibitoria de ratones

adultos Charles River

12.1. Introducción

En el capítulo 3, se intentó averiguar la influencia de la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria, evaluada sobre ratones machos y hembras adultos. La hipótesis de tal experimento no pudo ser confirmada ya que en dicho estudio los sujetos controles que no recibieron tratamiento farmacológico no aprendieron la tarea con lo que dicho experimento perdió validez.

El estudio que presentamos en este capítulo es una réplica de tal experimento, en el que los sujetos experimentales fueron machos y hembras en edad adulta pero su procedencia comercial fue Charles River.

Los efectos deteriorantes de escopolamina, como ya hemos comentado en capítulos anteriores, son muy claros en su administración pre-entrenamiento (Berón de Astrada y Maldonado, 1999; Blake y cols., 2011; Onho y Watanabe, 1996; Rush, 1988). Y ya hemos comentado que dicha efectividad amnésica es debida al bloqueo de la liberación de acetilcolina, la cual es necesaria para consolidar dichas memorias. Como explican algunos autores, la regulación de los procesos de memoria está mediada en sus fases tempranas por las sinapsis locales de neuronas GABAérgicas, colinérgicas y noradrenérgicas. Estas sinapsis se ven moduladas por niveles hormonales y la influencia directa de otros sistemas de

neurotransmisión como por ejemplo el serotoninérgico entre otros (Izquierdo y Medina, 1997).

En los dos experimentos anteriores, con la administración de estas drogas en etapa prepuberal y post-puberal, encontramos diferentes efectos de los mismos fármacos. Concluimos que dichos efectos pudieran ser dosis-dependientes y además mediados por otros procesos y sustancias como los hormonales. Feigley (1974), en un estudio acerca de los efectos de la escopolamina en la evitación pasiva administrada pre-entrenamiento (i.p.), encontró un efecto dependiente de la edad comparando ratas de 28 días de edad (4 semanas) y de 70-84 días de edad (10-12 semanas), obteniendo que las primeras eran sensibles a las acciones deteriorantes sobre la memoria de evitación pasiva en dosis de 0.5 mg/kg y que las últimas lo fueron únicamente en dosis de 4 mg/kg. La administración de R-(+)-8-OH-DPAT también mostró efectos dependientes de dosis, sobretudo en ratones prepúberes, ya que -como se ha comentado anteriormente- la neurotransmisión serotoninérgica, en especial de los receptores 5-HT_{1A}, tiene un gran efecto modulador sobre la función hipocampal colinérgica. Por otra parte, como ya hemos comentado, estudios previos de nuestro grupo de investigación encontraron efectos de la amitriptilina, un antidepresivo inhibidor mixto de la recaptación de serotonina y noradrenalina con grandes efectos anticolinérgicos, sobre la memoria de evitación inhibitoria al ser administrada de forma aguda a ratones adultos pre-entrenamiento (Arenas y cols.,

2006; Parra y cols., 2002) aunque no demostró efectos deteriorantes en su administración 24 h post-entrenamiento en la recuperación de la memoria (Parra y cols., 2006).

Con todo ello, este experimento se diseñó con el fin de averiguar los efectos de estas dos sustancias en la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria en su administración post-entrenamiento, utilizando en este caso ratones adultos machos y hembras de Charles River para estudiar las influencias de los dos fármacos en la esta etapa de desarrollo y ver qué dosis son efectivas en este caso.

12.2. Material y método

- Sujetos

Se utilizaron 96 ratones machos y 100 ratones hembras de la cepa CD-1 del proveedor Charles River (Lyon, Francia) de 8 semanas de edad con pesos comprendidos entre 36-45 g para los machos y 26-34 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- Fármacos

Los fármacos utilizados fueron bromhidrato de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid), al igual que en los experimentos anteriores. Fueron preparados bajo las condiciones detalladas en el apartado 6.2

de esta tesis e inyectados (*i.p.*) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. Las dosis fueron las mismas utilizadas anteriormente. Para la escopolamina 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg y para el R-(+)-8-OH-DPAT 0.1, 0.2 y 0.3 mg/kg.

- *Aparatos*

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el apartado 6.2.

- *Procedimiento*

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos de tratamiento que en los tres primeros experimentos, con un total de 10 grupos por sexo.

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en los Experimentos 1, 2, 3, 5 y 6. A modo de resumen el experimento constó de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (*i.p.*) con las dosis correspondientes de suero salino, fármaco, o suero salino y fármaco. La *fase de test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico y que no recibía tratamiento tras el pase.

- *Análisis estadísticos*

Se analizaron los datos con las mismas pruebas de estadística paramétrica que se emplearon en experimentos anteriores (ver Apartado 6.2).

12.3. Resultados

El análisis de varianza de las latencias en entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos [$F_{(9,176)} = 1.59, p > 0.05$] y no mostró diferencias de sexo significativas [$F_{(1,180)} = 0.38, p > 0.05$](ver Fig. 12.1).

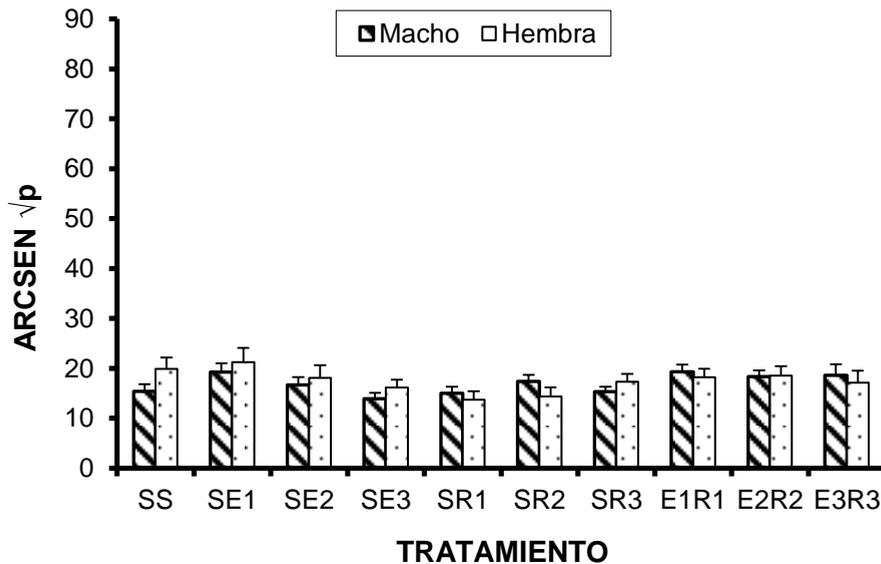


Fig. 12.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones adultos en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1

mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En el análisis de varianza de la fase de test se observó que el factor Tratamiento no fue estadísticamente significativo [$F_{(9,196)} = 1.39, p > 0.05$]; sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,176)} = 4.00, p < 0.05$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción [$F_{(9,176)} = 0.59, p > 0.05$] (ver figura 12.2). Las pruebas t para muestras independientes para analizar en qué grupos se observaban más notablemente las diferencias de sexo para cada grupo de tratamiento en las latencias de test no mostraron diferencias significativas para ningún grupo de tratamiento.

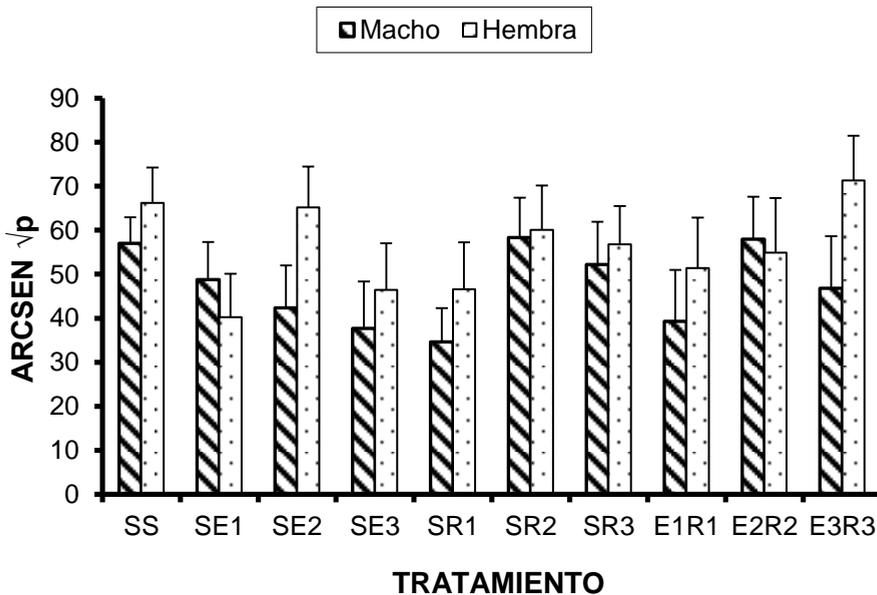


Fig. 12.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones adultos en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

La gráfica 12.3 resume las latencias de cruce de todos los grupos de tratamiento en entrenamiento y test. En ella constan todos los grupos sin separación por sexo. En las pruebas t para muestras relacionadas sin tener en cuenta la variable sexo se observó aprendizaje en todos los grupos.

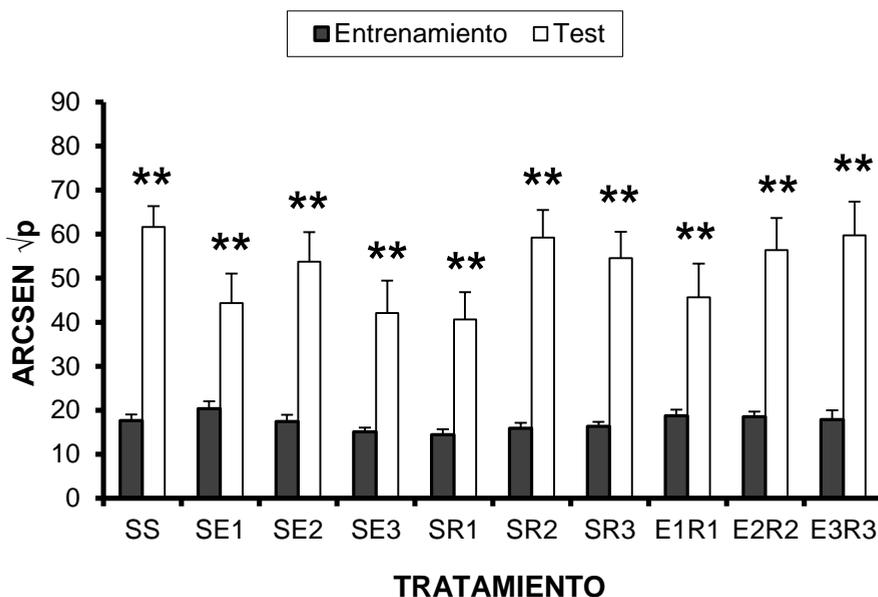


Fig. 12.3. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones adultos en función del tratamiento recibido. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2:

escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. $**p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Las pruebas t para muestras relacionadas realizadas para observar el aprendizaje en cada grupo y para cada sexo revelaron que el grupo control de machos mostró latencias significativamente mayores en el test que en el entrenamiento, mostrando aprendizaje de la tarea [$t_9 = 7.93$, $p < 0.01$]. Este aprendizaje fue observado en la mayoría de los grupos, exceptuando los grupos SE3 [$t_9 = 2.27$, $p > 0.05$] y E1R1 [$t_9 = 1.89$, $p > 0.05$] (ver Fig.12.4).

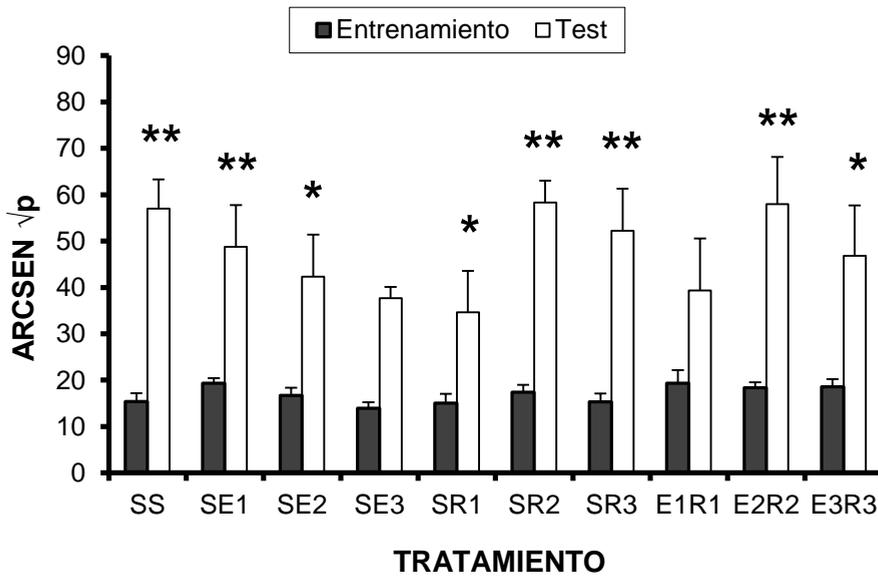


Fig. 12.4. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en MACHOS adultos en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2

mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

En cuanto a las hembras, las pruebas t para muestras relacionadas revelaron aprendizaje tanto para el grupo control [$t_9 = 5.58$, $p < 0.01$] como para todos los grupos de tratamiento exceptuando el grupo SE1 [$t_9 = 2.16$, $p < 0.05$] (ver Fig.12.5).

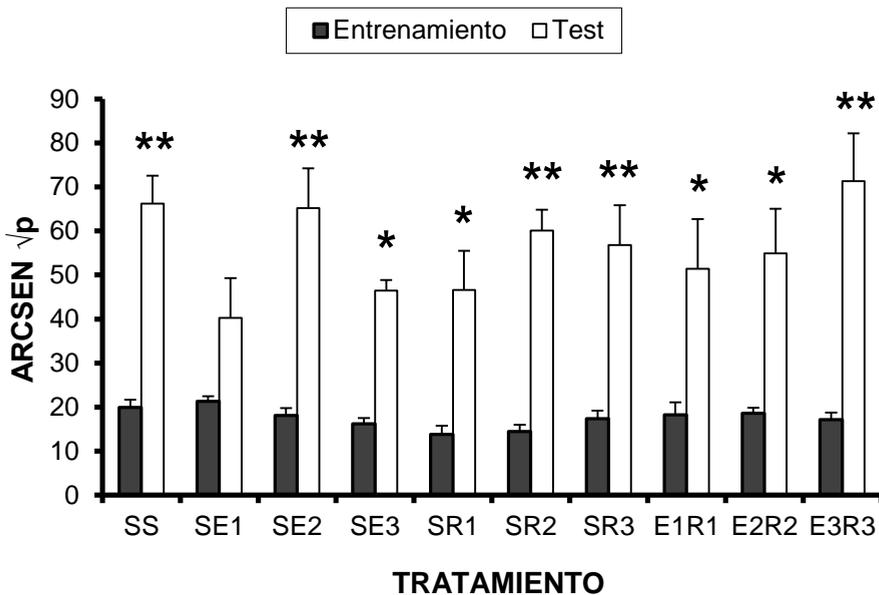


Fig. 12.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS adultas en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SE1: salino + escopolamina 0.3 mg/kg, SE2: salino + escopolamina 1.0 mg/kg, SE3: salino + escopolamina 3.0 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, E1R1: escopolamina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, E2R2: escopolamina 1.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, E3R3: escopolamina 3.0 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

12.4. Discusión

En este experimento se pretendía analizar los efectos de la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT en su administración post-entrenamiento sobre la memoria de la tarea de evitación inhibitoria. En este caso los sujetos utilizados fueron machos y hembras en edad adulta de la cepa CD1 de Charles River. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ni diferencias de sexo antes de pasar por la prueba de evitación inhibitoria, pero estas diferencias en cuanto a la condición sexual sí fueron observadas en las latencias de test, al igual que en experimentos previos de esta tesis y en otros de nuestro grupo de investigación. Como hemos comentado en varias ocasiones, las hembras muestran mayor aprendizaje de la tarea lo que se traduce en latencias generalmente más altas en el test respecto a los machos. La interpretación de estas diferencias, se ha atribuido a una mayor actividad enzimática por parte del hígado de las hembras, que disminuye la cantidad de fármaco para actuar sobre los receptores diana correspondientes así como la actividad hormonal diferenciada (Shapiro y cols., 1995) o a diferencias cerebrales en el sistema colinérgico (Berger-Sweeney y cols., 1998). Las pruebas t para muestras independientes realizadas para analizar las diferencias sexuales en el test, no mostraron ningún grupo en concreto en el que se observaran estas diferencias, lo que quiere decir que éstas son una diferencia general y no específica de ningún grupo de tratamiento.

En cuanto a los efectos del tratamiento, en el ANOVA general no se observaron diferencias significativas en latencias de test en función del tratamiento y al recoger las latencias sin separar por sexos, todos los grupos presentaron aprendizaje de la tarea. Al separar por sexos, observamos que los grupos controles tanto de machos como de hembras aprendieron perfectamente la tarea de evitación, al contrario que ocurrió en el experimento 3 con ratones adultos procedentes de Harlan. Además, algunos grupos de tratamiento presentaron deterioro en la memoria para la tarea. Para los grupos de machos, se observó un deterioro en el aprendizaje en el grupo que recibió la dosis más alta de escopolamina (SE3). Este resultado estaría de acuerdo con la literatura mostrando más efectos a medida que aumenta la dosis, necesiéndose dosis más altas de escopolamina para hallar deterioro en evitación inhibitoria cuando la administración es post-entrenamiento (Rush, 1988). En cuanto al R-(+)-8-OH-DPAT, las latencias de los grupos de machos, mostraron una curva dosis-respuesta en forma de U, siendo más efectivo en dosis bajas y altas que en intermedias, algo que también se ha observado en los efectos de algunos fármacos sobre la memoria. Las combinaciones de fármacos mostraron en los machos un deterioro con las dosis bajas, lo que apunta a una sinergia de los efectos únicamente en esta dosis. Este efecto sinérgico fue descrito en el Capítulo 5, donde se observaron efectos de los fármacos combinados frente a ausencia de ellos cuando la administración se hacía por separado. Es decir, que la administración conjunta produjo un

efecto potenciador de los fármacos sobre la memoria (Jeltsch-David y cols., 2008). En la gráfica 12.4 se puede observar también latencias mayores con la combinación intermedia de fármacos que con la combinación más alta de dosis. Esto puede apuntar nuevamente a una curva dosis-respuesta en forma de U.

Por otra parte, en los grupos de hembras únicamente se han encontrado efectos de deterioro en el grupo que recibió la dosis más baja de escopolamina (SE1). Las otras dos dosis empleadas no resultaron efectivas y la dosis intermedia mostró una media de latencias de cruce en el test similar a la que presentaron los sujetos controles. La escopolamina tanto en su administración pre-entrenamiento como post-entrenamiento ha mostrado una efectividad dependiente de dosis en las tareas de memoria, algo muy discutido en cuanto a su idoneidad para deteriorar la memoria y en especial la de evitación inhibitoria (Klinkenberg y Blokland, 2010). En cuanto al R-(+)-8-OH-DPAT, no se encontraron deterioros de memoria aunque en la gráfica (Fig. 12.5) se observan latencias más altas a medida que aumentó la dosis del agonista, algo que también ocurrió en el caso de la combinación de los fármacos. Además la combinación de dosis más altas (E3R3) mostró en las hembras un efecto que hemos comentado con anterioridad, produciendo un efecto contrario al esperado por la acción sobre los autorreceptores 5-HT_{1A} en lugar de activar los receptores postsinápticos (Steckler y Sahgal, 1995).

Comparando estos resultados con los deterioros en sujetos más jóvenes, éstos están en consonancia con la literatura, e.g. un estudio de Feigley (1974) comentado en la introducción, incluyó efectos de la escopolamina en ratas de 20-28 días de edad en una dosis de 0.5 mg/kg frente al deterioro observado en animales adultos de 70-84 días de edad con la dosis de 4 mg/kg. Estos resultados, muestran que los animales a más edad (excluyendo los de edad avanzada), presentan más aprendizaje de la tarea y menor labilidad del recuerdo de evitación inhibitoria (Smith y cols., 1996). Por otra parte, en relación a las diferencias sexuales, se mostraron patrones distintos de deterioro y de aprendizaje de la tarea (algo que puede deberse a diferencias tanto estructurales cerebrales como a estado hormonal).

CAPÍTULO 13
EXPERIMENTO 8: Efectos
de la administración de
fisostigmina y R-8-OH-DPAT
en evitación inhibitoria de
ratones prepuberales
Charles River

13.1. Introducción

En nuestros días, el encontrar nuevos medicamentos para mejorar el estado cognitivo de personas con Alzheimer sigue siendo la meta de muchos estudios preclínicos y clínicos. Desde que se observaron varios hechos en los años 70 entre los cuales se detallaba una pérdida severa de neuronas colinérgicas (Davies y cols., 1976), además de la correlación de la demencia con una disminución de los núcleos basales de Meynert y una pérdida de actividad de la enzima sintetizadora de acetilcolina, acetil transferasa, en pacientes con deterioro cognitivo (Bowen y cols., 1976), muchos han sido los esfuerzos y las hipótesis puestas a prueba para encontrar una solución a estos problemas. Entre estas hipótesis destaca la llamada hipótesis colinérgica que apunta al mal funcionamiento colinérgico ligado a déficits de memoria con lo que se apela a este neurotransmisor como principal mediador del aprendizaje y la memoria (Deutsch, 1971). Uno de los fármacos elegido para probar sus efectos ante esta situación, fue el inhibidor reversible de la enzima colinesterasa conocido como fisostigmina. El alcaloide fisostigmina es una sustancia con diferentes usos a lo largo de su historia. Aislada de los frutos del *Calabar*, por Jobst y Hesse en 1864, se sigue utilizando como tratamiento del glaucoma (Hardman y cols., 1995), aunque su uso terapéutico más famoso y actual sería en sus estudios clínicos en la enfermedad de Alzheimer y como antídoto para las intoxicaciones por agentes anticolinérgicos (Mach y cols., 2004). Es una sustancia liposoluble capaz de

cruzar la barrera hematoencefálica con facilidad para producir tanto efectos centrales como periféricos en su corto tiempo de acción (Somani y cols., 2001). Este fármaco se ha considerado un potenciador cognitivo, ya que mejoraba los síntomas cognitivos en pacientes de Alzheimer aunque no fue elegido para su tratamiento en humanos debido a que presentó efectos adversos graves sobre una gran proporción de los sujetos (Thal y cols., 1996; Thal y cols., 1999). La literatura muestra diferentes ejemplos en la experimentación animal donde mejora la memoria en general y en concreto sobre la tarea de evitación inhibitoria en roedores, por ejemplo, las infusiones pre-entrenamiento del fármaco en el hipocampo y en la corteza entorrinal amortiguaron el deterioro producido por una infusión del agonista Gaba muscimol en el septum, conocido como deteriorante de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria (Degroot y Parent, 2001). Además, en la en la modalidad “*step down*” de esta misma tarea, diferentes dosis (0.1 a 0.3 mg/kg) inyectadas i.p. pre-entrenamiento mostraron mejoras en la adquisición de la tarea, siendo la dosis de 0.3 mg/kg la más efectiva y deteriorando la memoria en dosis superiores (Zarrindast y cols., 1998). En su administración post-entrenamiento, otros experimentos mostraron una mejora en la retención de la tarea de evitación inhibitoria en ratones cuando ésta se producía 10 minutos después del entrenamiento (Baratti y cols., 1979). Por otra parte, en la administración de 3 dosis distintas de fisostigmina (0.15, 0.3 o 0.6 mg/kg) se encontró que ésta contrarrestaba

los deterioros producidos por la administración de amitriptilina (Monleón y cols., 2009).

Por otro lado, el R-(+)-8-OH-DPAT, hemos explicado en capítulos anteriores que es un agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A} de serotonina. Hemos hecho un repaso en estos experimentos de los efectos de esta sustancia en estudios externos y de esta misma tesis en su administración por varias vías, dosis y momentos y una vez más volvemos a probar sus efectos así como la combinación de éstos con los de la fisostigmina.

En este experimento se intentó averiguar cómo los fármacos fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT afectaban a la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria, en este caso en ratones machos y hembras en etapa prepuberal. La administración de los fármacos se realizó post-entrenamiento porque así lo requiere cuando se analizan los efectos en la consolidación de la memoria (McGaugh, 1989) y se incluyeron grupos en los que se administraron los fármacos de manera combinada para observar los efectos de la modulación en conjunto de los sistemas de neurotransmisión sobre esta consolidación de la evitación inhibitoria.

13.2. Material y método

- *Sujetos*

Se utilizaron 104 ratones machos y 105 ratones hembras de la cepa CD-1 de Charles River (Lyon, Francia) de 3 semanas de edad con pesos comprendidos entre 22-34 g para los machos y 16-23 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, condiciones del animalario, condiciones para realizar los pases y periodo de adaptación fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- Fármacos

Se utilizaron salicilato de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) que fueron disueltos en suero salino e inyectados (*i.p.*) en un volumen fijo de 0.01 ml/g de peso corporal. El grupo control recibió el mismo volumen de suero salino.

Las tres dosis de fisostigmina fueron 0.15; 0.2 y 0.3 mg/kg y las de R-(+)-8-OH-DPAT 0.1; 0.2 y 0.3 mg/kg, seleccionadas a partir del rango de dosis frecuentes recogidas en la literatura.

- Aparatos

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el experimento 1 (ver Apartado 6.2).

- Procedimiento

Los ratones fueron divididos en 10 grupos en cada sexo (n = 10) en función del tratamiento a recibir (a diferencia de otros experimentos, se incluyeron 4 ratones más repartidos en

varios grupos de machos y 5 más repartidos en los grupos de hembras).

Cada condición recibió post-entrenamiento un tratamiento distinto combinando las tres dosis de cada fármaco con suero salino y además contando con un grupo control para cada sexo. Los grupos resultantes fueron: SS: suero salino, SF1: suero salino y fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: suero salino y fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: suero salino y fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: suero salino y R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: suero salino y R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: suero salino y R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg y R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg y R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg y F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg y R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en los experimentos 1, 2 y 3. A modo de resumen el experimento constó de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (*i.p.*) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase de test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no

recibió choque eléctrico y que no recibía tratamiento tras el pase.

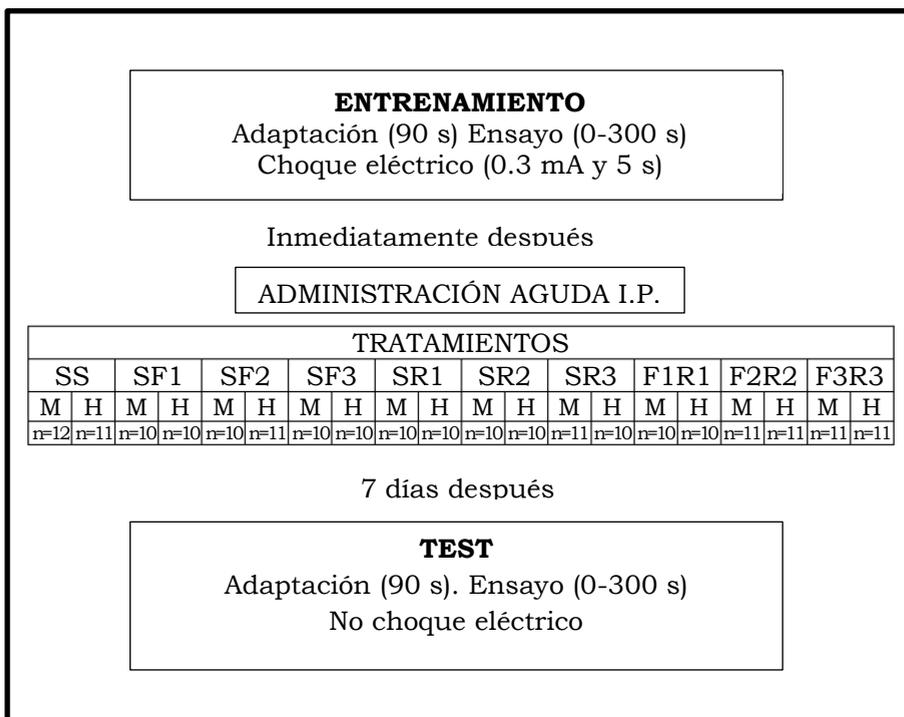


Fig. 13.1. Esquema de diseño del Experimento 8. s = segundos; mA = miliamperios; I.P. = intraperitoneal; M = macho; H = hembra; n = n° sujetos.

- *Análisis estadísticos*

Se analizaron los datos con las mismas pruebas de estadística paramétrica que se emplearon en los experimentos anteriores (ver Apartado 6.2).

13.3. Resultados

El análisis de varianza realizado para las latencias del entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos en las latencias antes de realizar cualquier tratamiento [$F_{(9,189)} = 0.262, p > 0.05$] ni tampoco había diferencias de sexo [$F_{(1,189)} = 1.121, p > 0.05$] (ver Fig. 13.2).

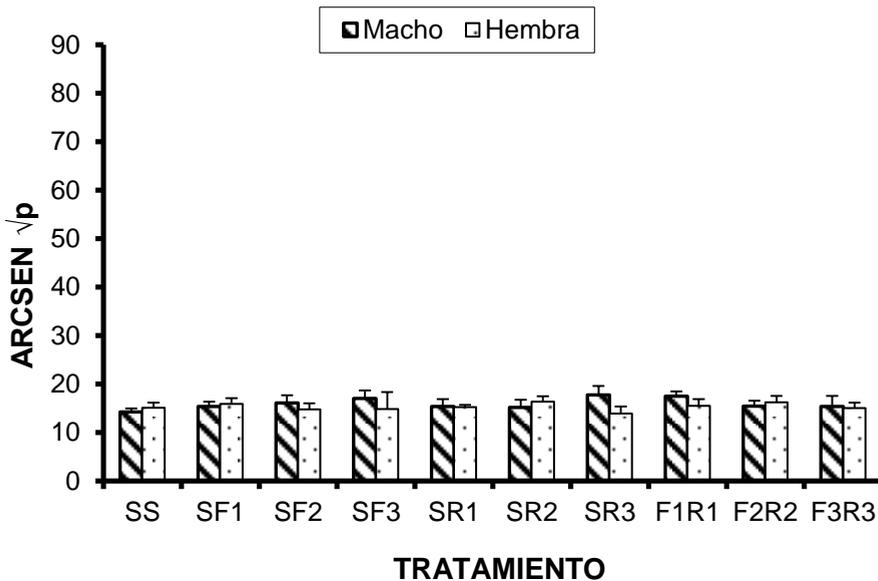


Fig. 13.2. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones prepuberales en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En la fase de test se observó que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo [$F_{(9,189)} = 1.049, p > 0.05$]; sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,189)} = 5.762, p < 0.05$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la

interacción [$F_{(9,189)} = 1.584, p > 0.05$] (ver Fig. 13.3). En las pruebas t para muestras independientes realizadas para el test comparando los grupos homónimos de cada sexo, se observaron diferencias significativas en el grupo SR1 [$t_{(18)} = 2.42, p < 0.05$] y F3R3 [$t_{(12)} = 2.64, p < 0.05$], mostrando en ambos casos, las hembras latencias superiores a los machos.

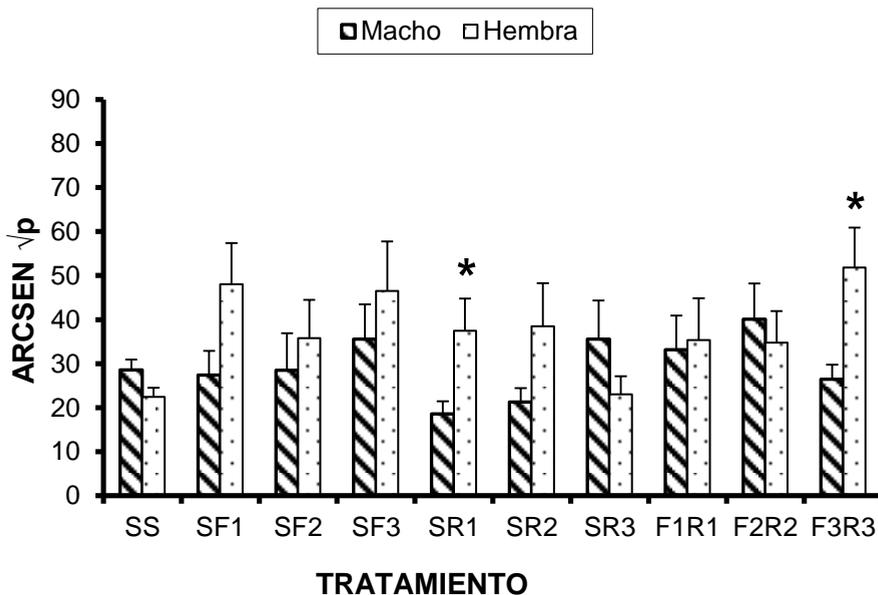


Fig. 13.3. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones prepuberales en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Macho.

En la siguiente gráfica están representadas a modo de resumen las latencias de cruce de cada grupo en las fases de entrenamiento y test. En ésta, no está realizada la separación

por sexos, únicamente por tratamiento farmacológico. Podemos observar que en las pruebas t para muestras relacionadas sin tener en cuenta la variable sexo todos los grupos presentan aprendizaje de evitación con distintos niveles de significación estadística (ver Fig. 13.4).

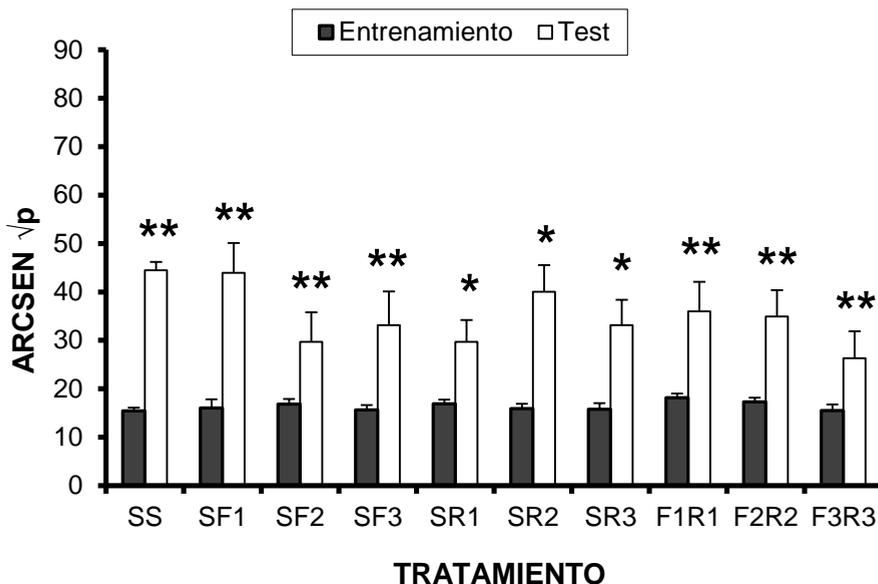


Fig. 13.4. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones prepuberales en función del tratamiento recibido. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Para comprobar si hubo aprendizaje de evitación inhibitoria en cada uno de los grupos de tratamiento, se realizaron pruebas t para muestras relacionadas para cada sexo ya que el sexo había presentado diferencias significativas

en las latencias de la fase test. Dichas pruebas revelaron que los machos del grupo SS (control) mostraron aprendizaje de la conducta de evitación inhibitoria [$t_{(11)} = 5.49$, $p < 0.01$]. Por el contrario, algunos grupos de tratamiento no mostraron este aprendizaje como fueron SF2 [$t_{(9)} = 1.63$, $p > 0.05$], SR1 [$t_{(9)} = 1.43$, $p > 0.05$], SR2 [$t_{(9)} = 1.59$, $p > 0.05$], SR3 [$t_{(10)} = 2.01$, $p > 0.05$] y F1R1 [$t_{(9)} = 2.09$, $p > 0.05$] (ver Fig. 13.5).

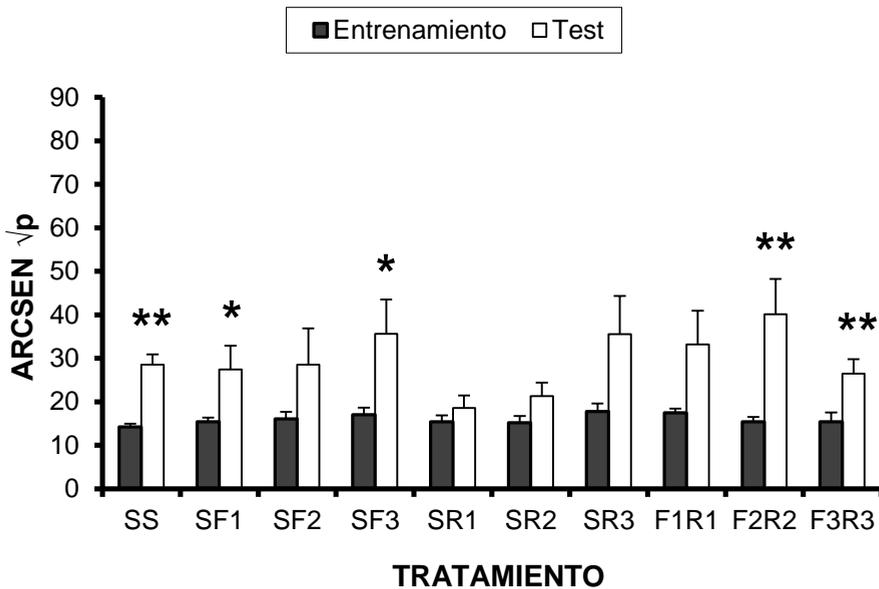


Fig. 13.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test de MACHOS prepuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

En las pruebas t para muestras relacionadas de los grupos de hembras, el grupo SS (control) presentó también aprendizaje de la tarea [$t_{(10)} = 3.46$, $p < 0.01$]. Además algunos grupos de tratamiento presentaron deterioro en el aprendizaje de la tarea: SR2 [$t_{(9)} = 2.18$, $p > 0.05$], SR3 [$t_{(9)} = 2.11$, $p > 0.05$] y F1R1 [$t_{(9)} = 2.10$, $p > 0.05$] (ver Fig. 13.6).

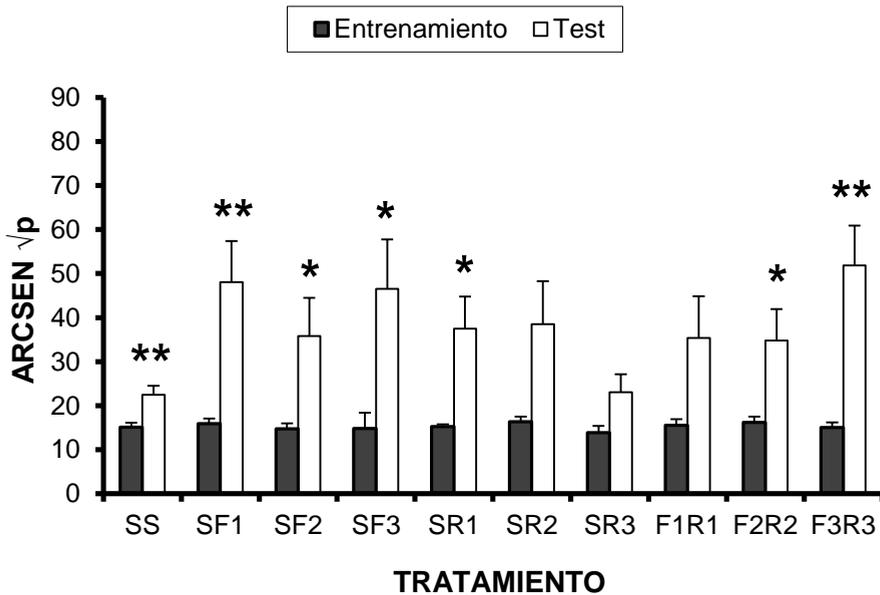


Fig. 13.6. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test de HEMBRAS en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

13.4. Discusión

En el presente experimento se estudiaron los efectos de la administración post-entrenamiento de varias dosis de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT, solas y en combinación, sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras prepuberales.

Tanto los machos como las hembras tratados únicamente con vehículo (grupos controles) aprendieron la tarea. En la fase de entrenamiento no se observaron diferencias en las latencias entre los grupos de tratamiento ni diferencias de sexo, con lo que podemos concluir que los sujetos antes de aprender la tarea no presentaban diferencias destacables en la conducta.

En la fase de test, no se observaron efectos del tratamiento de forma global, algo que ha ocurrido en experimentos anteriores, pero sí debidas al sexo. Esta variable, en la mayoría de ocasiones resulta significativa en las latencias del test, mostrando mejor aprendizaje las hembras que los machos. Aunque podría esperarse que en etapas más tempranas estas diferencias no fueran tan significativas, tanto en este como en el Experimento 5, se observó este efecto ya en la etapa prepuberal. Estas diferencias sexuales se observan a nivel general y también en las comparaciones de los grupos de tratamiento SR1 y F3R3, en las que los machos se vieron mucho más afectados en sus latencias por los fármacos administrados que las hembras, mostrando latencias mucho más bajas. Todos estos datos apuntan a diferencias a nivel de

afectación por los fármacos administrados o en el nivel de aprendizaje alcanzado por ambos sexos, mostrando una vez más que la consolidación de esta conducta es más fuerte en las hembras que en los machos, algo que fue explicado por algunos autores como un efecto diferencial de la ansiedad en roedores machos y hembras de diferentes edades que interpretaron como una mayor resiliencia de las hembras en estas circunstancias (Beck y Luine, 2010; Grissom y cols., 2012).

En cuanto a los efectos encontrados en la consolidación de la tarea, todos los grupos en conjunto presentaron aprendizaje pero al separar por sexos se observaron deterioros en éste en algunos casos y mejorías en otros con diferentes patrones en los machos y en las hembras (Experimentos 5, 6 y 7). Ya se observaron estos patrones de respuesta sexo-dimórficos a los tratamientos en anteriores experimentos y se explicó que se habían observado diferencias en cuanto a las dosis por las razones apeladas entonces de diferencias en absorción, actividad enzimática y biodisponibilidad de los fármacos (Pollock, 1997; Shapiro y cols., 1995; Yonkers y cols., 1992). Además en estudios previos realizados por otros autores en los que se observaban diferencias en neurogénesis en ratones de ambos sexos, se observó que ésta parecía progresar en diferentes compartimentos de la corteza somatosensorial en ambos sexos y que esta neurogénesis en general se completaba más tardíamente en los machos (Berger-Sweeney, 2003). Las diferencias en maduración cerebral (Loy y Sheldon,

1987; Ricceri y cols., 1997) y la conclusión de otros estudios en los que se sugieren diferentes periodos de labilidad para afectar en sistemas neuroquímicos (Berger-Sweeney, 2003) nos pueden dar una explicación de porqué los patrones de deterioro-facilitación del aprendizaje en la tarea de evitación inhibitoria son tan diferentes en machos y hembras.

En el presente experimento los machos mostraron efectos diferenciados en distintas dosis de fisostigmina, presentando deterioro de la tarea con la dosis intermedia (SF2, 0.2 mg/kg) al contrario de lo que se había encontrado en estudios previos del grupo de investigación en sujetos adultos donde mejoró la memoria en la prueba de natación forzada (Martos y cols., 1999; Parra y cols., 1999b). Observando las gráficas de las latencias, sí se observaron en este caso latencias superiores en la administración en la dosis baja y alta de fisostigmina (SF1 y SF3, 0.15 y 0.3 mg/kg respectivamente) aunque no alcanzaron la significación estadística. En la dosis mayor de fisostigmina hubo aprendizaje, con latencias globales superiores a los controles pero no mostrando diferencias significativas respecto a éstos. En cuanto a los efectos de R-(+)-8-OH-DPAT, las tres dosis produjeron deterioro de la memoria de la tarea mostrándose acorde con nuestras hipótesis. Observando nuevamente la gráfica, las dosis más deteriorantes visualmente fueron la baja e intermedia ya que los sujetos presentaron medias más bajas, aunque en todos los casos el fármaco resultó en deterioro de la memoria. En conclusión, el R-(+)-8-OH-DPAT, en este caso confirmó las hipótesis

planteadas, pudiéndose observar efectos claros en la modulación serotoninérgica de la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en este caso en machos prepuberales. En el caso de la combinación de fármacos, se observó un deterioro en la memoria de evitación inhibitoria en la combinación de dosis bajas, en la cual el R-(+)-8-OH-DPAT en dosis 0.1 mg/kg podría estar potenciando los efectos colaterales producidos por la administración de 0.15 mg/kg de fisostigmina y por ello deteriorando la consolidación de la memoria de la tarea o bien pudiera deberse a que en dosis bajas la fisostigmina no contrarrestó los efectos del agonista serotoninérgico. Por el contrario, en las dosis intermedia y alta de combinación los machos obtuvieron medias de latencias más altas que en el caso de sujetos tratados con el vehículo únicamente que no fueron estadísticamente significativas en el análisis general pero mostraron que los efectos de la fisostigmina en combinación con un agonista serotoninérgico aumentaban las latencias más que anularse los efectos de un fármaco con el otro. Podría interpretarse que la fisostigmina en este caso sí fue efectiva contrarrestando los efectos deteriorantes del R-(+)-8-OH-DPAT.

Por parte de las hembras, todos los grupos que recibieron fisostigmina presentaron aprendizaje, visualmente en la gráfica se observaron latencias más altas en los grupos que la recibieron frente a los controles en todas las dosis de fisostigmina utilizadas, aunque no presentaron diferencias significativas. De manera general, podríamos interpretar estos

efectos frente a los que presentaron los machos como una menor incidencia de los efectos adversos debidos al estrés en éstas o mayor resiliencia y menor probabilidad de cambio hacia estrategias no hipocampo-dependientes (Beck y Luine, 2010; Grissom y cols., 2012) o como una mayor efectividad a favor de la memoria no llegando a ser significativa. Así, la acetilcolina con mucha influencia en el hipocampo, sería más positiva en el caso de éstas. En cuanto al R-(+)-8-OH-DPAT, se observaron deterioros debidos a la administración de la dosis media y alta. Y las combinaciones, al igual que había ocurrido en el caso de los machos, las dosis bajas conjuntas deterioraron y las dos medias y altas mejoraron respecto a las hembras tratadas únicamente con suero salino. Como se ha comentado para los machos, estos efectos podrían deberse a menores efectos fisiológicos secundarios de la fisostigmina al recibir otro fármaco deteriorante en dosis más altas o a que la fisostigmina en caso de deterioro mnésico (que sería mayor en dosis intermedias y altas de R-(+)-8-OH-DPAT) estaría contrarrestando los efectos del agonista serotoninérgico. Tomando los datos en conjunto podemos ver diferentes efectos de los fármacos en esta etapa de forma ya sexodimórfica. La fisostigmina mejoró la consolidación de la tarea de forma dosis-dependiente y en algún caso en los machos sus efectos secundarios podrían incluso deteriorar el aprendizaje. La administración de R-(+)-8-OH-DPAT por sí solo deterioró la conducta en esta etapa en casi todas las dosis en ambos sexos y las combinaciones, en dosis medias y altas mejoraron no

alcanzando niveles significativos pudiendo deberse a la modulación del antagonista serotoninérgico sobre la facilitación de la memoria del anticolinesterásico. Los efectos sexo-dimórficos podrían deberse a diferencias ya en metabolismo de los fármacos (Shapiro y cols., 1995), de absorción y biodisponibilidad (Pollock, 1997; Yonkers y cols., 1992) y también a diferencias en maduración del hipocampo y amígdala que en ratas ha sido demostrado por otros autores que se produce en el caso del primero previamente en hembras (Engelbregt y cols., 2000) y en el caso de la segunda en machos (Cooke y Woolley, 2005).

CAPÍTULO 14
EXPERIMENTO 9: Efectos
de la administración de
fisostigmina y R-8-OH-DPAT
en evitación inhibitoria de
ratones postpuberales
Charles River

14.1. Introducción

Los resultados del Experimento 8 con ratones prepuberales, mostraron la efectividad de algunas dosis de fisostigmina, otras de R-(+)-8-OH-DPAT y otras de la combinación de los fármacos, tanto en machos como en hembras. En dicho capítulo, como en la serie de experimentos anteriores donde se evaluó la efectividad de la escopolamina y el R-(+)-8-OH-DPAT, se observaron resultados muy dispares en función de la etapa vital y del sexo de los animales. En el presente experimento, se evaluaron nuevamente los efectos de la fisostigmina y el R-(+)-8-OH-DPAT en la memoria de evitación inhibitoria de ratones machos y hembras pero post-puberales. En el Experimento homónimo con ratones de la misma edad realizado con un fármaco anticolinérgico y un agonista serotoninérgico de los receptores 5-HT_{1A} los efectos del tratamiento en la fase de test no fueron estadísticamente significativos, sí lo fue la variable sexo y no lo fue la interacción. En cuanto a los deterioros que se observaron, los machos no aprendieron la tarea en la administración de la dosis intermedia de R-(+)-8-OH-DPAT, y en la combinación de dosis bajas de los fármacos; por su parte, en el caso de las hembras, éstas aprendieron la tarea en todos los casos, no observándose los efectos de deterioro esperados por la acción de éstos sobre los dos sistemas de neurotransmisión (Experimento 6). Este mayor efecto en etapas tempranas se había atribuido a una mayor labilidad de la consolidación de la memoria en la edad prepuberal y como consecuencia una

mayor afectación por los fármacos, sobre todo por la escopolamina (Feighley, 1974), y menor estabilidad del aprendizaje adquirido, aunque nuestros animales mostrasen un sólido aprendizaje al comparar las latencias en las dos fases.

Como se ha podido observar a lo largo de esta tesis, las dosis de los fármacos son muy importantes a la hora de evaluar los efectos de éstos, ya que la mayoría de veces estos efectos son dosis-dependientes y además cada dosis es efectiva en un rango de edad determinado, todo esto mediado por factores hormonales, por capacidad de aprendizaje de los animales y por el sexo. En la literatura, la mayoría de estudios llevados a cabo con fármacos deteriorantes/facilitadores de la consolidación de la memoria son realizados con animales en edad adulta (e.g. Arenas y cols., 1995; Boccia y cols., 2005; Jafari-Sabet, 2006). Esto, por una parte estabiliza los efectos de los fármacos y por otra, deja fuera la visión del desarrollo en los efectos de éstos. En este caso, se procedió a utilizar las mismas dosis en las tres etapas vitales, intentando también anular o contrarrestar los efectos de la fisostigmina en los casos de combinación. En este experimento, se trató de evaluar los efectos de las dosis de los mismos fármacos que en el Experimento 8 pero en ratones post-puberales y analizar cómo la edad y el sexo afectaban las acciones de modulación de los fármacos sobre la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria.

14.2. Material y método

- *Sujetos:*

Se utilizaron 107 ratones machos y 106 ratones hembras de la cepa CD-1 de Charles River (Lyon, Francia) de 5 semanas de edad con pesos comprendidos entre 30-37 g para los machos y 20-28 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- *Fármacos*

Se utilizaron salicilato de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) que fueron preparados bajo las mismas condiciones que en el experimento anterior. Las tres dosis de fisostigmina fueron 0.15; 0.2 y 0.3 mg/kg y las de R-(+)-8-OH-DPAT 0.1; 0.2 y 0.3 mg/kg, seleccionadas a partir del rango de dosis frecuentes recogidas en la literatura.

- *Aparatos*

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el experimento 1 (ver Apartado 6.2).

- *Procedimiento*

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos de tratamiento que en el Experimento 8, aunque éstos normalmente tienen 10 sujetos por cada condición

experimental y sexo, en este caso algunos grupos cuentan con algún sujeto más (el grupo SS contó con 12 animales para cada sexo).

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en anteriores experimentos. A modo de resumen, el experimento constó de dos fases: *fase de entrenamiento* en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (*i.p.*) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase de test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico y que no recibía tratamiento tras el pase.

- *Análisis estadísticos*

Se analizaron los datos con las mismas pruebas de estadística paramétrica que se emplearon en experimentos anteriores (ver Apartado 6.2).

14.3. Resultados

El análisis de varianza realizado para las latencias del entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos en las latencias antes de realizar cualquier tratamiento

$[F_{(9,193)} = 0.637, p > 0.05]$ ni tampoco había diferencias de sexo $[F_{(1,193)} = 0.103, p > 0.05]$ (ver Fig. 14.1).

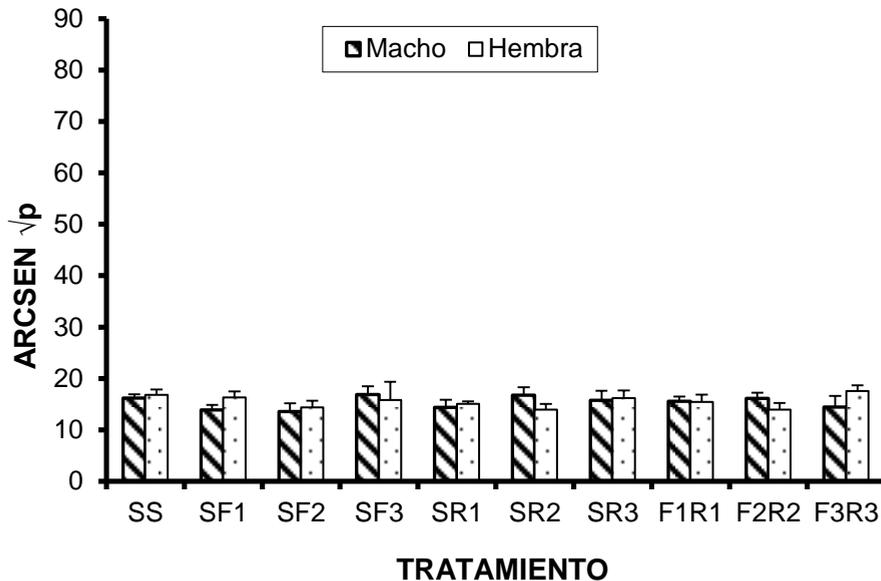


Fig. 14.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones postpuberales en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En la fase de test se observó que el efecto del tratamiento fue estadísticamente significativo $[F_{(9,193)} = 2.167, p < 0.05]$ y también lo fue la variable Sexo $[F_{(1,193)} = 10.312, p < 0.01]$, presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción $[F_{(9,193)} = 0.472, p > 0.05]$. En las pruebas t para muestras independientes realizadas para el test comparando los grupos homónimos de cada sexo, se

observaron diferencias significativas en el grupo SF2 [$t_{(19)} = 2.27, p < 0.05$] y una tendencia a la significación en el grupo SS mostrando las hembras latencias significativamente mayores en todos los casos (ver Fig. 14.2).

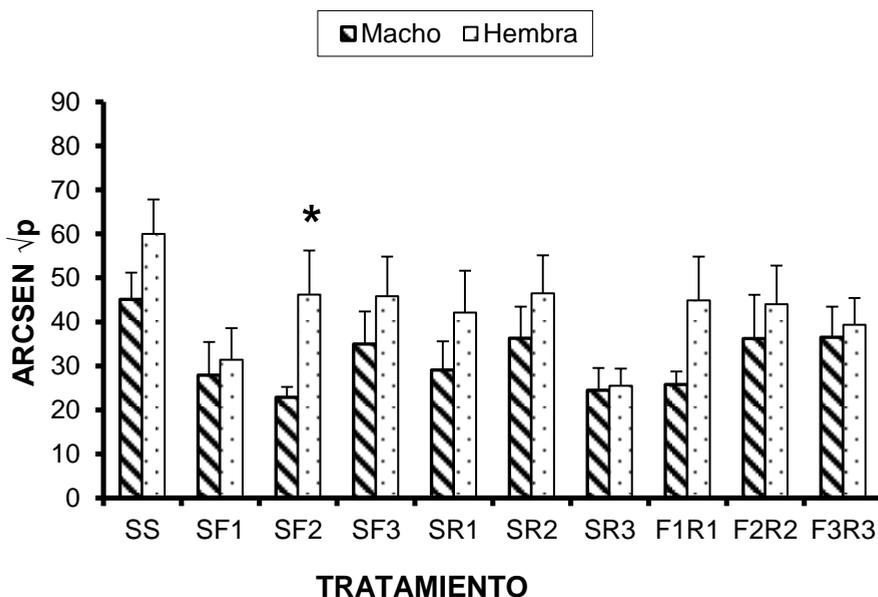


Fig. 14.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones postpuberales en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Macho.

En la siguiente gráfica están representadas a modo de resumen las latencias de cruce de cada grupo en las fases de entrenamiento y test. En ésta, no está realizada la separación por sexos, únicamente por tratamiento farmacológico. Podemos observar que en las pruebas t para muestras

relacionadas, sin tener en cuenta la variable sexo, todos los grupos presentan aprendizaje de evitación con distintos niveles de significación estadística (ver Fig. 14.3).

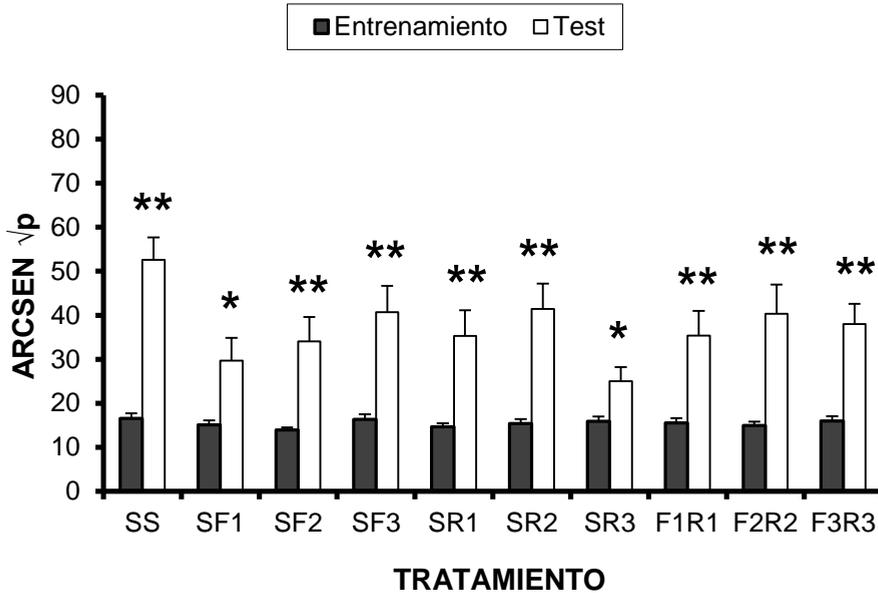


Fig. 14.3. Medias (+ ETM) de las latencias en fase de entrenamiento y test en ratones postpuberales en función del tratamiento recibido. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Para comprobar si hubo aprendizaje de evitación inhibitoria en cada uno de los grupos de tratamiento, se realizaron pruebas t para muestras relacionadas para cada sexo ya que el sexo había sido significativo en la fase de test. Dichas pruebas revelaron que los machos del grupo SS

(control) mostraron aprendizaje de la conducta de evitación inhibitoria [$t_{(12)} = 4.61, p < 0.01$]. Por el contrario, algunos grupos de tratamiento no mostraron este aprendizaje como fueron SF1 [$t_{(9)} = 1.72, p > 0.05$], SR3 [$t_{(10)} = 1.52, p > 0.05$] y F2R2 [$t_{(9)} = 2.05, p > 0.05$] (ver Fig. 14.4).

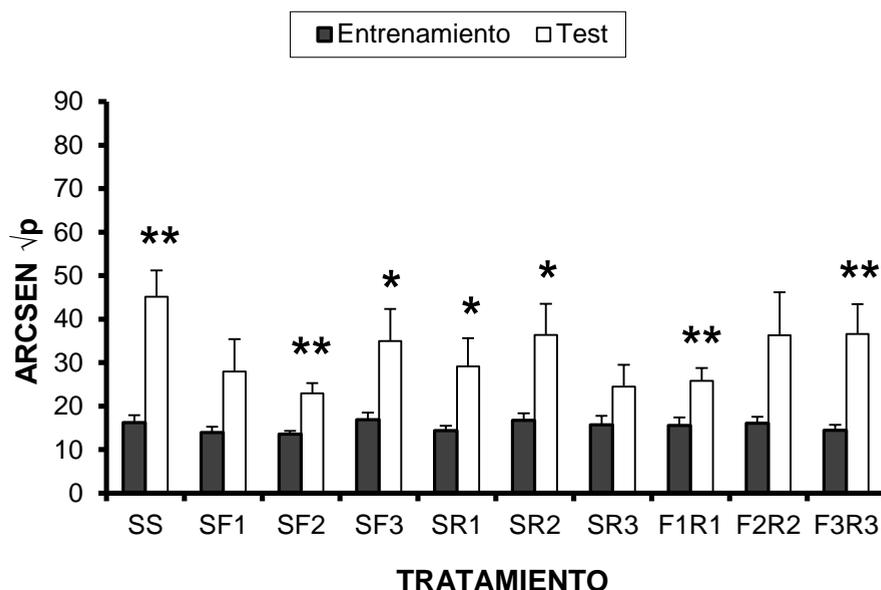


Fig. 14.4. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en MACHOS postpuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

En las pruebas t para muestras relacionadas de los grupos de hembras, el grupo SS (control) presentó también aprendizaje de la tarea [$t_{(12)} = 5.98, p < 0.01$]. Del resto de

grupos de tratamiento, sólo el grupo SF1 presentó deterioro en el aprendizaje de la tarea [$t_{(9)} = 2.17, p > 0.05$] (ver Fig. 14.5).

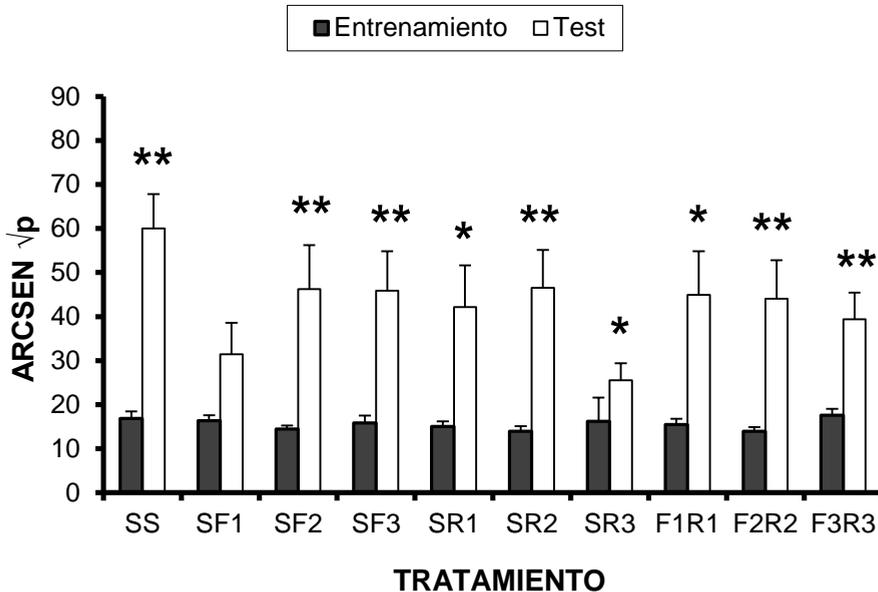


Fig. 14.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS postpuberales en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

14.4. Discusión

En el presente experimento se estudiaron los efectos de la administración de varias dosis de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT en su administración post-entrenamiento, solas y en combinación, sobre la consolidación de la memoria de

evitación inhibitoria en ratones machos y hembras post-puberales.

Los resultados mostraron que tanto los machos como las hembras de los grupos tratados con vehículo únicamente (grupos controles) aprendieron la tarea. No se observaron diferencias en las latencias entre los grupos en el entrenamiento ni debidas al sexo ni al grupo de tratamiento, con lo que podemos concluir que los sujetos antes de aprender la tarea no presentaban diferencias destacables en la conducta.

Por otra parte, el análisis de las latencias en la fase test mostró efectos del tratamiento de forma global aunque en las pruebas post-hoc estas diferencias no fueran específicas de ningún grupo de tratamiento. En esta fase, se observaron además efectos del sexo a nivel general, mostrando diferencias estadísticamente significativas el grupo SF2 y una tendencia a la significación en el grupo tratado únicamente con vehículo. Estas diferencias apuntan siempre en la misma dirección de un mayor aprendizaje de la tarea por parte de las hembras, con latencias más altas que los machos en todos los experimentos aun cuando no sean específicas de un grupo en particular.

En cuanto a los efectos de los tratamientos en la consolidación de la tarea, se observó deterioro de ésta en el grupo que recibió la dosis baja de fisostigmina, tanto en machos como en hembras, así como en los grupos de machos

con la dosis alta de R-(+)-8-OH-DPAT y con la combinación de dosis intermedias. Estos efectos han sido reportados por algunos autores en algunas dosis, en las que debido a los efectos colaterales del fármaco sobre otros sistemas, en lugar de mejorar el aprendizaje, se deteriora su consolidación. Podríamos pensar que el efecto del fármaco pudiera tener una tendencia facilitadora en dosis bajas y altas (aunque las diferencias no se han mostrado significativas respecto a los controles) y su administración en dosis intermedias deteriora por sus efectos adversos y la dosis intermedia no llega a facilitar la consolidación del aprendizaje de la tarea. Puesto que en otros casos la dosis de 0.1 mg/kg de fisostigmina ha sido la más efectiva en ratas adultas frente a otras más bajas y altas, podría ser que la dosis de 0.15 mg/kg utilizada en los grupos de tratamiento SF1 quedara fuera del rango efectivo para mejorar la memoria. Por otra parte, el deterioro observado en la combinación de dosis intermedias (F2R2) pudiera deberse a un efecto sumatorio entre los efectos deteriorantes de R-(+)-8-OH-DPAT, efectivo en este caso para su propósito y la suma de efectos adversos de la fisostigmina que no provocaría facilitación. En su caso, el R-(+)-8-OH-DPAT, ha sido efectivo en la dosis más alta en los machos, efecto atribuido al agonismo de la neurotransmisión serotoninérgica sobre los receptores 5-HT_{1A} reportado por otros autores y encontrado en algunas dosis en estudios previos (Carli y cols., 1992; Misane y Ogren, 2000).

Finalmente, y observando las representaciones gráficas de las latencias, se observó que al contrario que en el experimento anterior, donde se evaluó el desempeño de sujetos prepuberales, en este caso no se han observado mejorías respecto a las latencias de los controles en los grupos tratados con fisostigmina. Todos los grupos de tratamiento, mostraron latencias más bajas –aunque no significativamente– en la fase de test que el grupo tratado únicamente con salino. Esto podría deberse a efectos secundarios fisiológicos producidos por la fisostigmina que superarían la facilitación sobre la memoria que se observó en estudios anteriores. En muchos de los experimentos realizados por otros autores en los que se utilizó fisostigmina, ésta se administraba como facilitador en caso de deterioro colinérgico, es decir que se proporcionaba un antídoto a un déficit en la neurotransmisión colinérgica previa (e.g. Jafari-Sabet, 2006). En este caso la administración de fisostigmina por sí sola no produjo efectos beneficiosos y esto puede ser debido a que no había una condición previa de deterioro colinérgico. Este dato se observó en pacientes humanos a los que se administró fisostigmina en condición de intoxicación por drogas anticolinérgicas o no (Beaver y Gavin, 1998) en los que cuando no existía pre-tratamiento con anticolinérgicos, la administración de diferentes dosis de fisostigmina producía un síndrome parecido al causado por anticolinérgicos.

Por otra parte, Hamburg (1967) estudió la relación entre el momento de inyección de las dosis de fisostigmina y el

intervalo entre entrenamiento y test de la tarea y encontró un deterioro asociado a la fisostigmina cuando el intervalo entre la administración del fármaco y el test era de 30 minutos, mientras que cuando el test se realizaba más tarde no encontró efectos del fármaco. En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se administró el fármaco después del entrenamiento con un intervalo temporal de 24 horas entre el entrenamiento y el test, no observándose efectos facilitadores de la fisostigmina al administrarla sin deterioro previo (Monleón y cols., 2009). De esta manera al igual que en este caso la ineficacia del fármaco podría explicarse por el intervalo entre las fases y la administración del fármaco respecto al entrenamiento.

Por todo ello podríamos afirmar que los efectos de inhibidores de la colinesterasa, como la fisostigmina, administrados post-entrenamiento en ratones post-puberales machos y hembras no son beneficiosos al ser testados en evitación inhibitoria 1 semana después del entrenamiento y la inyección del fármaco, al contrario también de lo observado en la etapa prepuberal.

Por parte del R-(+)-OH-DPAT, se han encontrado deterioros en la consolidación de la tarea en los machos, en la administración de la dosis alta, como se han encontrado en otros experimentos; por lo que el sistema serotoninérgico en este caso tuvo una influencia de deterioro en la administración de 0.3 mg/kg del fármaco y sobretodo en el caso de los

machos, los efectos de las combinaciones de fármacos recortaron las latencias del test por lo que podríamos decir que las dosis combinadas de los fármacos en ratones post-puberales producen un mínimo efecto de deterioro no esperado para estos grupos que afectaría a la consolidación de la memoria.

CAPÍTULO 15

EXPERIMENTO 10: Efectos

de la administración de

fisostigmina y R-8-OH-DPAT

en evitación inhibitoria de

ratones adultos Charles

River

15.1. Introducción

En los Experimentos 8 y 9 se ha observado un efecto diferencial de los fármacos en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria de ratones machos y hembras en dos etapas distintas del desarrollo: prepuberal y post-puberal. Se observó que los fármacos actuaron de forma dosis-dependiente, deteriorando, facilitando la tarea o sin efectos sobre la misma. Además, se atribuyeron los pocos efectos en la etapa post-puberal a que los parámetros experimentales también influyeron en los efectos farmacológicos sobre la consolidación de la memoria, al igual que otros autores habían observado anteriormente con varios anticolinesterásicos (Deutsch y cols., 1966; Hamburg, 1976). Estos efectos se observaron en ratones o ratas adultos, aunque podrían ocurrir en cualquier etapa del desarrollo.

Estudios realizados en la etapa adulta han mostrado efectos facilitadores de la fisostigmina sobre la memoria de evitación inhibitoria (Kopf y Baratti, 1996; Youssefi y cols., 2012; Zarrindast y cols., 1998). Algunas de las dosis utilizadas por éstos fueron incluidas en el presente experimento para poder comparar nuestros resultados con los encontrados por otros autores. Estas dosis fueron las mismas utilizadas en los dos experimentos anteriores en ratones prepuberales y post-puberales para así observar una relación dosis-respuesta a lo largo del ciclo vital de los sujetos. Además, esta relación se esperó fuera modulada por el sexo. El incluir machos y

hembras, como se ha observado a lo largo de esta tesis no es muy frecuente en la literatura. Únicamente encontramos un estudio de nuestro grupo de investigación donde la dosis 0.3 mg/kg fue administrada post-entrenamiento en animales machos y hembras observándose una tendencia gráfica a la mejoría sin presentar diferencias significativas respecto a los controles. Además la fisostigmina fue efectiva contrarrestando los deteriorantes efectos de la amitriptilina administrada pre-entrenamiento (Monleón y cols., 2009).

Los efectos facilitadores sobre el aprendizaje y la memoria de la fisostigmina en roedores machos en edad adulta han sido encontrados en dosis muy bajas en su infusión directamente sobre dos estructuras cerebrales muy importantes para el aprendizaje: hipocampo y corteza entorrinal. Degroot y Parent, (2001) encontraron efectos de amortiguación del déficit en adquisición de una tarea de evitación inhibitoria producido por la infusión de muscimol, un agonista de la neurotransmisión GABAérgica, en el septum medial, que en otros estudios previos también había mostrado efecto deteriorante sobre la memoria (e.g. Zarrindast y cols., 1998).

Por otra parte, varios colinesterásicos como la fisostigmina, la tacrina y el NIK-247 han mostrado mejorar la memoria de evitación inhibitoria al contrarrestar el deterioro en sujetos tratados con escopolamina. La dosis efectiva en este estudio fue la de 0.3 mg/kg, al igual que la dosis elegida para los grupos SF3, revirtiendo los efectos de deterioro de la

escopolamina administrada antes del entrenamiento. Además se observaron varios efectos colaterales que los sujetos sufrían en las diferentes dosis administradas (i.p.): temblores, miosis (contracción de la pupila del ojo), hipotermia y salivación en dosis de fisostigmina de entre 0.1 y 1 mg/kg (Yoshida y Suzuki, 1993).

Esta combinación de un fármaco que mejora la memoria (fisostigmina) y otro que la deteriora (en este caso R-(+)-8-OH-DPAT) ha sido un modelo utilizado antes en la literatura aunque la mayoría de estudios administraron el fármaco deteriorante antes de la adquisición de la tarea (muscimol en Degroot y Parent, 2001; escopolamina en Yoshida y Suzuki, 1993; DL-AP5, atropina y (+)-MK-801 maleato en Jafari-Sabet, 2006 y amitriptilina en Monleón y cols., 2009).

En el presente experimento todos los fármacos fueron administrados después del entrenamiento. Se analizaron los efectos de tres dosis de fisostigmina, tres de R-(+)-8-OH-DPAT y las combinaciones de estos dos fármacos en sus dosis bajas, medias o altas sobre la consolidación de la memoria de ratones adultos machos y hembras.

15.2. Material y método

- *Sujetos:*

Se utilizaron 104 ratones machos y 106 ratones hembras de la cepa CD-1 de Charles River (Lyon, Francia) de 8 semanas

de edad con pesos comprendidos entre 37-43 g para los machos y 26-34 g para las hembras a su llegada al laboratorio. Su alojamiento, las condiciones del animalario, el periodo de adaptación y las condiciones para realizar los pases fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

- Fármacos

Se utilizaron salicilato de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich Química, Madrid) que fueron preparados bajo las mismas condiciones que en los Experimentos 8 y 9. Las dosis de fisostigmina y de R-(+)-8-OH-DPAT fueron las mismas que en los dos experimentos anteriores.

- Aparatos

En este experimento se utilizó nuevamente la caja de evitación inhibitoria y la caja de aislamiento descritas en el experimento 1 (ver Apartado 6.2).

- Procedimiento

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos de tratamiento que en el Experimento 9, aunque éstos normalmente tienen 10 sujetos por cada condición experimental y sexo, en este caso algunos grupos cuentan con algún sujeto más (el grupo SS contó con 11 animales para machos y 10 para hembras).

El procedimiento seguido para la realización de este experimento fue el mismo que en anteriores experimentos. A modo de resumen el experimento constó de dos fases: *fase de*

entrenamiento en la que los animales pasaron por primera vez por la caja de evitación, con parámetros de 90 s de habituación, con un choque eléctrico de 0.3 mA de intensidad y 5 s de duración. Se registraron las latencias de cruce y tras el pase cada animal recibió dos inyecciones (*i.p.*) con las dosis correspondientes de suero salino, fármacos, o suero salino y fármaco. La *fase de test* se realizó de la misma manera 7 días después del entrenamiento, exceptuando que el animal no recibió choque eléctrico y que no recibía tratamiento tras el pase.

- *Análisis estadísticos*

Se analizaron los datos con las mismas pruebas de estadística paramétrica que se emplearon en experimentos anteriores (ver Apartado 6.2).

15.3. Resultados

El análisis de varianza realizado para las latencias de la fase de entrenamiento mostró que no había diferencias entre los grupos en las latencias antes de realizar cualquier tratamiento [$F_{(9,190)} = 0.637, p > 0.05$] ni tampoco había diferencias de sexo [$F_{(1,190)} = 0.048, p > 0.05$] (ver Fig. 15.1).

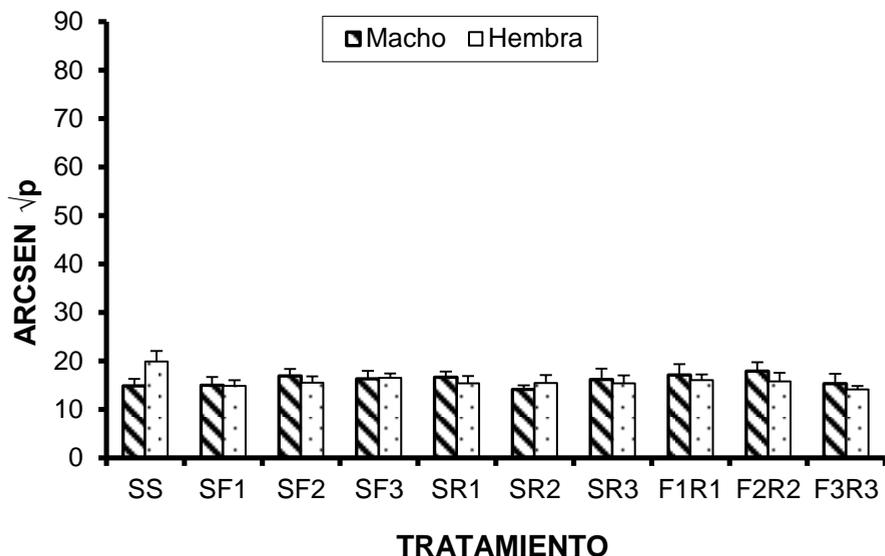


Fig. 15.1. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento en ratones adultos en función del tratamiento recibido y del sexo. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg.

En la fase de test se encontró que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo [$F_{(9,190)} = 0.817$, $p > 0.05$], sí lo fue la variable Sexo [$F_{(1,190)} = 6.805$, $p < 0.01$], presentando las hembras latencias superiores a los machos, y no lo fue la interacción [$F_{(9,190)} = 1.267$, $p > 0.05$]. En las pruebas t para muestras independientes realizadas para el test comparando los grupos homónimos de cada sexo, se observaron diferencias significativas en el grupo SF1 [$t_{(19)} = 2.405$, $p < 0.05$] y una tendencia a la significación en el grupo SF3 [$t_{(19)} = 1.76$,

$p=0.095$] mostrando las hembras latencias mayores en todos los casos. El único caso en el que se observaron latencias menores de las hembras respecto a los machos fue en el grupo SR3 aunque estas diferencias no fueron significativas (ver Fig. 15.2).

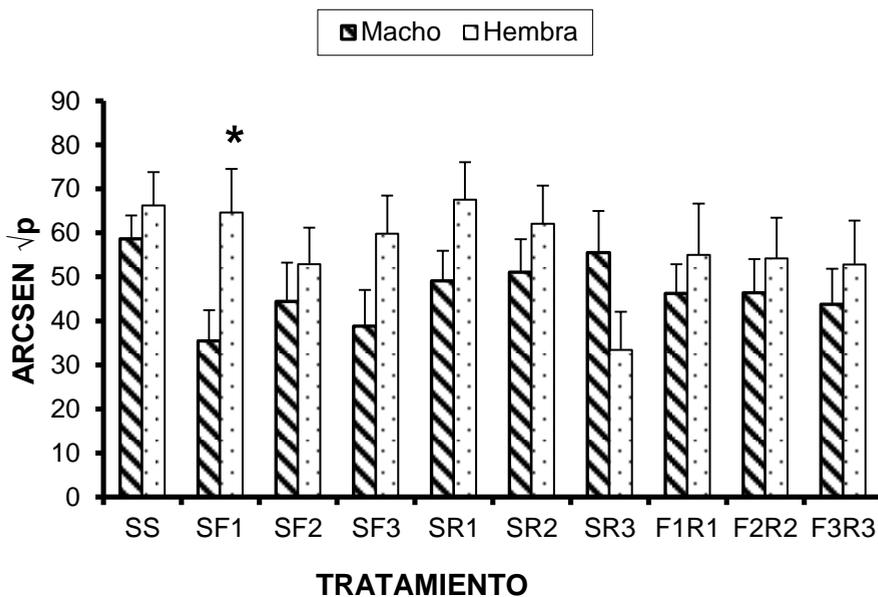


Fig. 15.2. Medias (+ETM) de las latencias de test en ratones adultos en función del sexo y del tratamiento recibido. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$ vs Macho.

En la siguiente gráfica están representadas a modo de resumen las latencias de cruce de cada grupo en las fases de entrenamiento y test. En ésta, no está realizada la separación por sexos, únicamente por tratamiento farmacológico.

Podemos observar que en las pruebas t para muestras relacionadas, sin tener en cuenta la variable sexo, todos los grupos presentan aprendizaje de evitación con significación estadística $p < 0.01$ (ver Fig. 15.3).

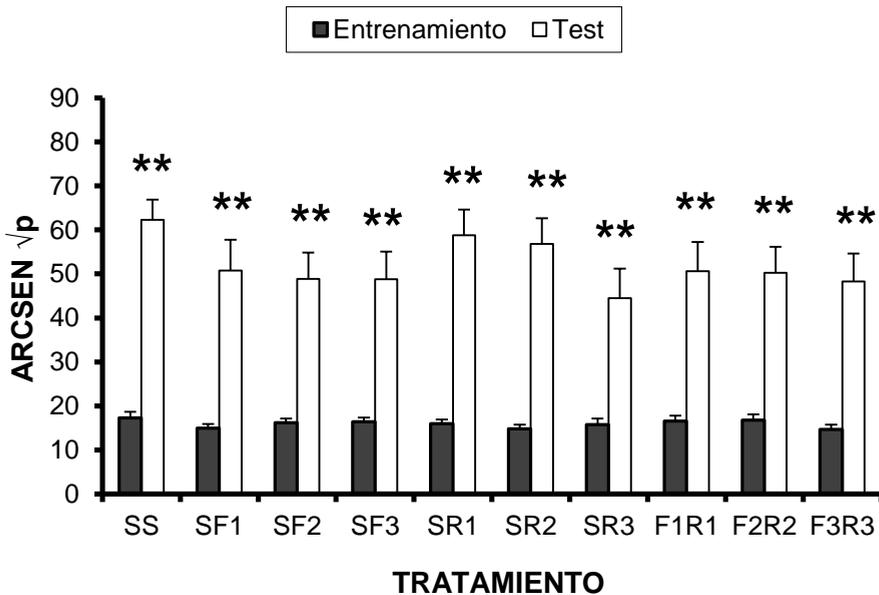


Fig. 15.3. Medias (+ ETM) de las latencias de entrenamiento y test en ratones adultos en función del tratamiento recibido. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

Para comprobar si hubo aprendizaje de evitación inhibitoria en cada uno de los grupos de tratamiento, se realizaron pruebas t para muestras relacionadas para cada sexo ya que el sexo había sido significativo en la fase test. Dichas pruebas revelaron que los machos del grupo SS

(control) mostraron aprendizaje de la conducta de evitación inhibitoria [$t_{(10)} = 8.38, p < 0.01$]. Todos los grupos de tratamiento también mostraron aprendizaje de la tarea en los grupos de machos (ver Fig. 15.4).

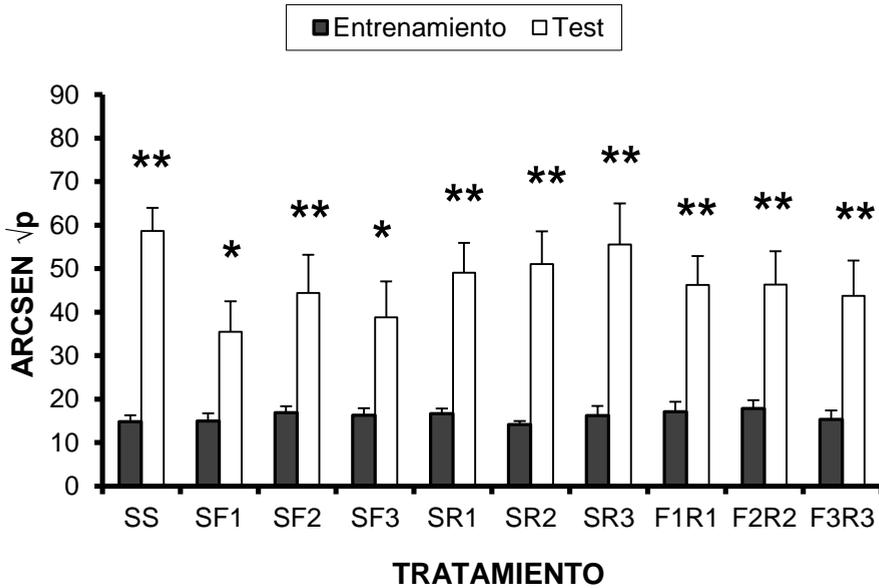


Fig. 15.4. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en MACHOS adultos en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

En las pruebas t para muestras relacionadas de los grupos de hembras, el grupo SS (control) presentó también aprendizaje de la tarea [$t_{(9)} = 5.58, p < 0.01$]. Del resto de grupos

de tratamiento, sólo el grupo SR3 presentó deterioro en el aprendizaje de la tarea [$t_{(10)} = 2.20$, $p > 0.05$] (ver Fig. 15.5).

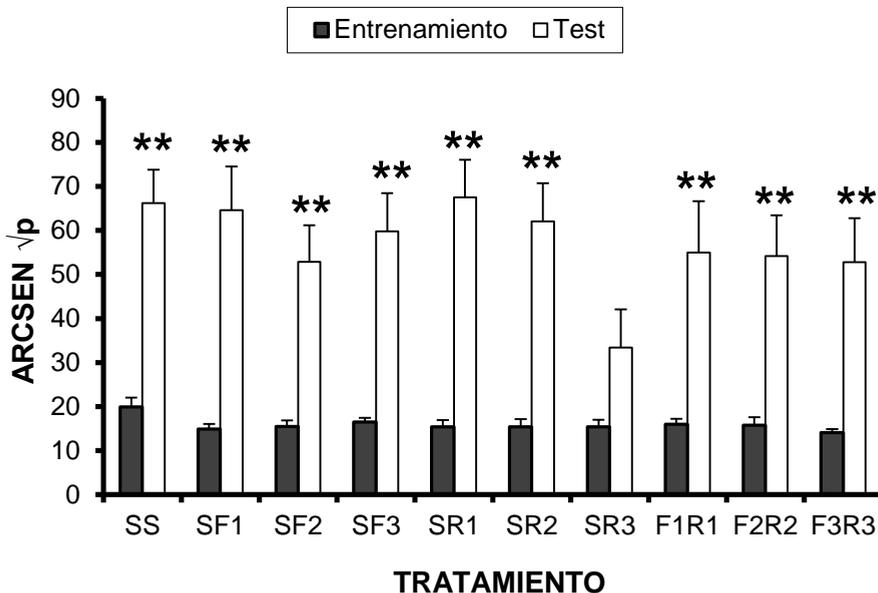


Fig. 15.5. Medias (+ETM) de las latencias de entrenamiento y test en HEMBRAS adultas en función del tratamiento recibido en evitación inhibitoria. SS: salino, SF1: salino + fisostigmina 0.15 mg/kg, SF2: salino + fisostigmina 0.2 mg/kg, SF3: salino + fisostigmina 0.3 mg/kg, SR1: salino + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, SR2: salino + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, SR3: salino + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg, F1R1: fisostigmina 0.15 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.1 mg/kg, F2R2: fisostigmina 0.2 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.2 mg/kg, F3R3: fisostigmina 0.3 mg/kg + R-8-OH-DPAT 0.3 mg/kg. ** $p < 0.01$ vs Entrenamiento.

15.4. Discusión

En este último experimento, se evaluaron los efectos que dos fármacos moduladores de la neurotransmisión, un anticolinesterásico y un agonista serotoninérgico selectivo de un tipo de receptores, sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria de ratones adultos machos y hembras. No

se han encontrado los efectos esperados teniendo en cuenta la literatura. Cabe especular acerca de las dosis efectivas en este paradigma por los parámetros utilizados y la administración del fármaco. Las dosis elegidas y la realización de la fase de test una semana después de la adquisición y el tratamiento habían sido utilizados por Hamburg, (1967). Este autor solamente encontró efectos de mejora de la fisostigmina en evitación inhibitoria cuando el fármaco se administraba antes del pase por la fase de test, 24 h después del entrenamiento en la tarea. Ante una tarea de evitación de “laberinto en Y” donde los animales tenían que evitar un shock y permanecer en el brazo “a salvo” iluminado, los animales mostraban amnesia en función de los días que pasaban entre el entrenamiento y la inyección. Esta reducción de la efectividad del fármaco en su administración post-entrenamiento, también fue encontrada por Santucci y cols., (1989), que compararon los efectos de una dosis de fisostigmina de 0.03 mg/kg en un intervalo entrenamiento-test corto y largo, mostrando efectos del fármaco únicamente cuando se testaba a los sujetos 1.25 h después del entrenamiento o 72 h después de éste. No obstante, en anteriores trabajos de nuestro equipo de investigación, se encontraron efectos de mejora sobre la consolidación de la memoria con una dosis de 0.3 mg/kg en las hembras. En este paradigma de evitación inhibitoria el intervalo entrenamiento-test fue de 24 h. Los resultados más relevantes fueron sus efectos de mejora en la administración post-entrenamiento sobre el deterioro producido por la

administración pre-entrenamiento de varias dosis de amitriptilina (Monleón y cols., 2009). Como hemos citado en el apartado 15.1, Yoshida y Suzuki (1993) encontraron que esta misma dosis de fisostigmina (0.3 mg/kg) mejoró la memoria de la tarea de evitación inhibitoria sobre el deterioro producido por la administración pre-entrenamiento de escopolamina. Además, probaron otros anticolinesterásicos y estudiaron los efectos colaterales que éstos tenían sobre los sujetos al administrarse oralmente e i.p. La fisostigmina mostró graves efectos secundarios como temblores, miosis (dilatación de la pupila), hipotermia y salivación al administrar dosis entre 0.1 y 1 mg/kg y se concluyó que ésta no era de los mejores anticolinesterásicos para mejorar la memoria por los graves efectos colaterales y sus pocos efectos en otras dosis, motivo por el cual en el tratamiento del Alzheimer no ha sido de elección en ensayos clínicos. Nuestros resultados, unidos a estos otros en la literatura, indican que la fisostigmina mejoraría el aprendizaje o la memoria de la tarea al ser administrada en condiciones en las que existe un deterioro previo de la neurotransmisión colinérgica. Algunos de los casos en los que el fármaco deteriora la memoria podrían atribuirse a estas consecuencias fisiológicas negativas comentadas que algunos autores han comparado con el “síndrome colinérgico” debido a poca acetilcolina en la hendidura sináptica. En el caso de la fisostigmina no se debería a esta disminución de acetilcolina sino que por el contrario, podría deberse a un nivel de acetilcolina por encima

de lo normal (Lewin, 1994; Beaver y Gavin, 1998). Por otra parte, podría ser que aunque el aprendizaje de la tarea perdura incluso varias semanas, como se ha comprobado en experimentos previos de nuestro grupo de investigación (datos no publicados), los efectos de los fármacos no se muestran tan claramente al testar a los sujetos una semana después. La mayoría de los estudios en los que se muestra una mejoría respecto a los sujetos controles en los que se administra fisostigmina son procedimientos en los que el intervalo de entrenamiento y test es de 24 horas (e.g. Baratti y cols., 1979; Gower, 1987; Monleón y cols., 2009).

Como hemos observado, en la aplicación de fármacos que modulan la neurotransmisión es muy importante la determinación de la dosis del fármaco. En este caso observamos a nivel general (sin separar por sexos) que la dosis más baja produce una tendencia a la mejora aunque no aumenta la latencia significativamente. Esta dosis es la que tras su administración en general podría producir un nivel óptimo de acetilcolina que se tradujera en una mejoría en el aprendizaje. Esto ha sido reportado en otros casos produciendo las dosis más bajas una mejoría (150 μ g) frente a dosis moderadas que no producen efectos y dosis altas que producen un deterioro de la tarea (Kopf y Baratti, 1996; Sansone y cols., 1993; Santucci y cols., 1989). Por otra parte, diversos estudios han utilizado la fisostigmina inyectándola en hipocampo o núcleos amigdalinos, mostrando resultados más claros en cada caso (e.g. Jafari-Sabet, 2006). Otros, por su

parte, realizan el tratamiento con fisostigmina antes de realizar la prueba, lo que no afectaría en la consolidación de la memoria sino en la adquisición o retención del aprendizaje y podría estar afectando procesos de atención o perceptivos (Zarrindast y cols., 1998). Es decir, que en general, la mayoría de estudios en los que se produce mejora en la tarea con la administración de fisostigmina: o ha sido en su aplicación directa en estructuras cerebrales implicadas o ha sido en condiciones en las que existía una lesión colinérgica previa.

Los casos en los que se administró fisostigmina en combinación con el agonista serotoninérgico no presentaron ni deterioro ni mejora de aprendizaje. Este hecho era esperable en el caso en que las dosis fueran efectivas ya que teóricamente debería haber un efecto de anulación de los efectos de uno y otro fármaco. Aunque este hecho solo podría afirmarse en este experimento para el caso de las hembras donde en el grupo SR3 ha habido un deterioro del aprendizaje que no se ha observado en F3R3. Esto se explicaría porque la acción facilitadora de la fisostigmina contrarrestaría el déficit producido por la administración de un fármaco agonista de los receptores de serotonina 5-HT_{1A} que se ha demostrado que modula la acción colinérgica a la baja.

Para concluir, los pobres resultados en este experimento podrían ser atribuidos a una dosis de fisostigmina no eficiente en estos sujetos a esta edad; a que los parámetros experimentales no han sido los óptimos para probar las acciones de estos fármacos y a que los sujetos en los que el

fármaco fisostigmina es efectivo en la literatura presentan un deterioro en la neurotransmisión colinérgica previo.

CAPÍTULO 16:
DISCUSIÓN
GENERAL

El objetivo principal de esta tesis fue investigar la intervención del sistema colinérgico y serotoninérgico (por sí solos o en combinación) en el efecto producido por la administración aguda de escopolamina, fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT post-entrenamiento en el aprendizaje de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras a lo largo de tres etapas de su ciclo vital (prepuberales, postpuberales y adultos).

Estos fármacos se utilizaron con el fin de esclarecer la relación que los sistemas de neurotransmisión colinérgico y serotoninérgico tenían en la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria y su interrelación en la modulación del aprendizaje de esta tarea.

Anteriores trabajos acerca de la implicación de los sistemas de neurotransmisión han atribuido una relación directa y de gran peso entre los niveles de acetilcolina y el buen funcionamiento mnésico en diferentes estructuras del sistema nervioso central (Bartus y cols., 1981; Blokland, 1996; Fisher y cols., 1989; Klinkenberg y Blokland, 2010; Gold, 2003; Monleón y cols., 2008). Esta hipótesis surgió de los primeros hallazgos encontrados en la pérdida de neuronas colinérgicas en la enfermedad de Alzheimer (e.g. Bartus y cols., 1981; Collerton, 1986). Desde entonces muchas investigaciones del campo de la neurociencia, la psicofarmacología conductual y la neurobiología han intentado encontrar la causa y un tratamiento efectivo de esta

enfermedad. Muchos de estos estudios, han sido realizados en roedores mediante lesiones en diferentes sistemas, localizaciones cerebrales o mediante la aplicación de fármacos a nivel local y sistémico.

El sistema serotoninérgico también ha recibido gran atención en este área, puesto que es uno de los principales moduladores del sistema colinérgico y a la vez de las funciones cognitivas en las que éste interviene (Nilson y cols., 1988; Stancampiano y cols., 1999; Jeltsch-David y cols., 2008; Seyebadabi y cols., 2014).

Ambos sistemas son además diana de diferentes sustancias, muy utilizadas en investigación y con gran tradición a la hora de modificar farmacológicamente el aprendizaje y la memoria. Como hemos revisado en uno de nuestros capítulos teóricos, dentro de estos fármacos están los antidepresivos, que además de actuar sobre el trastorno psicopatológico afectan al aprendizaje y la memoria. Esta relación ha sido atribuida a un mecanismo de acción subyacente común por Parra (2003) dando lugar a una nueva hipótesis de trabajo. Esta hipótesis nos llevó a ahondar más aún en los sistemas de neurotransmisión citados, utilizando los tres fármacos mencionados en un total de 10 experimentos, de los cuales comentamos a continuación los principales resultados obtenidos.

-Aprendizaje de evitación inhibitoria de los animales no tratados

Los parámetros experimentales escogidos, así como los sujetos utilizados (ratones CD-1), habían sido probados en nuestro grupo de investigación en anteriores trabajos. Hasta el momento no se había tenido constancia de diferencias conductuales entre sujetos de la misma cepa. Por tanto, los tres primeros experimentos, nos sirvieron para mostrar y plantear una hipótesis de trabajo que en principio no estaba dentro de los objetivos de la tesis. Los resultados obtenidos en ellos, así como los del Experimento 4, mostraron que todos los sujetos CD-1 no eran exactamente iguales conductualmente o al menos no para el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria. En contra de lo esperado, los animales controles de Harlan, no aprendieron la tarea en una sesión de entrenamiento sin ser tratados farmacológicamente ni en etapa prepuberal ni en adulta, lo que hizo de estos grupos de animales sujetos no válidos para nuestros experimentos. Con el estudio de las diferencias en evitación inhibitoria de animales de la misma cepa de diferentes proveedores (Experimento 4), se observó que los mejores animales para estudiar evitación inhibitoria con los parámetros utilizados eran los provenientes de Charles River. Éstos presentaban mayor capacidad de aprendizaje para ambos sexos y en general frente a ratones Harlan y Janvier (Parra y cols., 2013). Las hembras de Harlan y los machos de Janvier no

aprendieron la tarea. Estos resultados no habían sido reportados hasta el momento en la literatura, aunque sí se habían detectado diferencias conductuales entre ratones de cepas distintas (Johnson y cols., 2010). Únicamente, se encontró un estudio en ratas Wistar que mostró diferencias en evitación inhibitoria entre animales provenientes de distintos proveedores (Hirarte y cols., 1989). Estas diferencias podrían estar relacionadas con diferencias en las condiciones de cría de los animalarios, diferencias fisiológicas y genéticas de los sujetos de los diferentes proveedores que han llevado a desarrollar conductas divergentes a lo largo de la formación de una colonia específica.

-Diferencias de sexo en evitación inhibitoria

El estudio de las diferencias de sexo en conducta animal en Psicofarmacología no ha tenido gran éxito a lo largo de la historia, siendo una tradición incluir únicamente machos en los estudios. Nuestro grupo de investigación se ha diferenciado por incluir en la mayoría de experimentos animales de ambos sexos (para una revisión ver Vinader-Caerols y cols., 2012).

El dimorfismo sexual en el aprendizaje de la evitación inhibitoria ha quedado plasmado en los resultados mostrando en general que el sexo es una variable significativa en las diferencias tanto en los grupos controles como en los tratados con fármacos. Las diferencias debidas al sexo, como se ha observado, se han dado en prácticamente todos los casos en

las latencias de test y a lo largo de todas las etapas del ciclo vital. Las diferencias en animales adultos habían sido reportadas anteriormente por otras investigaciones del grupo pero no se habían incluido sujetos tan jóvenes en dichos experimentos. Así, en estudios con diferentes antidepressivos se habían observado diferencias de sexo en los grupos tratados únicamente con vehículo además de diferencias en los patrones dosis-respuesta a los fármacos (Heinsbroek y cols., 1988; Arenas y cols., 2006; Monleón y cols., 2001; Monleón y cols., 2002).

El hecho de incluir animales de ambos sexos en nuestros experimentos está justificado para evaluar una conducta que muestra claras diferencias entre machos y hembras. Algunos autores han justificado el hecho de utilizar únicamente machos en sus experimentos por la variabilidad que aporta la secreción cíclica de hormonas sexuales a los resultados obtenidos en hembras. Esto se vería correctamente argumentado en estudios de tipo longitudinal, donde el ciclo estral de las hembras conlleva consecuencias conductuales y fisiológicas debidas a las fluctuaciones hormonales. Mediante medidas transversales no se aportaría ninguna variable adicional a dicha medida. Además, un estudio realizado sobre la variabilidad en los experimentos llevados a cabo con hembras ovariectomizadas contra hembras controles reveló que no existe un mayor error típico de la media en hembras con ciclo estral no interrumpido (Parra y cols., 1999).

Teniendo en cuenta la no demostrada mayor variabilidad y que las enfermedades tratadas con estos fármacos afectan tanto o más a mujeres que a hombres (e.g. la depresión) sería más representativo de la realidad incluir en los estudios neuropsicofarmacológicos tanto sujetos hembras como machos. Galea y cols. (2008) argumentan que este ejercicio se realizaría en pro de conseguir una mayor representación de la naturaleza teniendo en cuenta las divergencias reportadas por otros autores en conductas no reproductivas.

De entre las razones a las que apelar para poder explicar estas singularidades debidas al sexo, podemos recurrir a demostradas diferencias en el desarrollo cerebral y en los niveles de hormonas sexuales que pueden incidir en estos mecanismos de neurotransmisión de forma distinta (Bossé y cols., 1996; Maswood y cols., 1995). Existen estudios en los que se observan diferencias en el momento de inervación colinérgica (Berger-Sweeney, 1998; Loy y Sheldon, 1987; Meck y cols., 1989; Ricceri y cols., 1997). Además, los sujetos de ambos sexos difieren en el momento en el que alcanzan la pubertad, siendo de una semana antes en ratas machos que en hembras (Engelbregt y cols., 2000; Kennedy y Mitra, 1963). La amígdala se desarrolla antes en ratas machos (Cooke y Woolley, 2005; Siddiqui y Shah, 1997). Por el contrario, el hipocampo, se desarrolla antes en hembras (Juraska, 1990; Loy y Sheldon, 1987) lo que también es posible que ocurra en ratones.

Por otra parte, Grissom y cols. (2012), concluyeron que las ratas hembras aprendían mejor la tarea por diferentes influencias de los eventos estresantes en las estrategias de memoria utilizadas respecto a los machos. Teniendo en cuenta que la situación de aprendizaje en la mayoría de paradigmas sería estresante para los animales, encontraron relaciones entre el sexo y el aprendizaje de los animales. Los autores relacionaron los estados hormonales de los animales machos y hembras prepuberales y adultos con la búsqueda de estrategias para solucionar una tarea de aprendizaje. Los machos prepuberales se verían menos protegidos por niveles de testosterona bajos (Little y cols., 1992) y sus estrategias memorísticas se verían muy perturbadas por el estrés producido por la situación de aprendizaje testada por lo que recordarían peor la tarea. Algo que no ocurriría en las hembras, donde tanto hembras prepuberales como adultas no se verían tan influidas por situaciones estresantes, siendo más fácil para ellas resolver las situaciones estresantes de test (Beck y Luine, 2010).

En cuanto a las diferencias en los efectos de los fármacos sobre la memoria, se han encontrado mayores efectos en los machos que en las hembras, pudiendo deberse por una parte a diferencias en la inervación de los sistemas de neurotransmisión o a las diferencias en la velocidad de metabolización de los fármacos donde las hembras son más rápidas, lo que dejaría menor parte del fármaco libre para actuar en sus dianas (Shapiro y cols., 1995). Por otra parte, si

los niveles hormonales afectan de distinta manera, siendo los estrógenos protectores de deterioro cognitivo, tenemos un gran número de factores que apoyan las diferencias cognitivo-neurológicas entre los sujetos de ambos sexos.

-Efectos de la administración post-entrenamiento de escopolamina

Se han reportado efectos deteriorantes de la administración de escopolamina sobre la memoria en diferentes tareas cognitivas y en sujetos de distintas especies. Este déficit se ha atribuido a una disminución de la actividad colinérgica de los receptores muscarínicos dando lugar a lo que podría parecerse a un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (Blokland, 1996).

En la presente tesis (Experimentos 1, 2, 3, 5 y 6) la administración i.p. post-entrenamiento de escopolamina ha producido deterioro en casos concretos en algunas de las dosis, siendo inefectiva para evitar la consolidación de la memoria de la tarea en varios casos. En la etapa prepuberal, se han observado deterioros en dosis de 1 y 3 mg/kg para los machos y en dosis de 1 mg/kg en las hembras. Estos deterioros pueden atribuirse a la acción anticolinérgica de la escopolamina sobre la consolidación de la memoria ya que la administración de sustancias post-entrenamiento se considera con influencia sobre este proceso. Sin embargo, cuando administramos las mismas dosis del fármaco en sujetos post-

puberales no encontramos este deterioro. Podríamos pensar que las hormonas sexuales, que en esta edad son liberadas en grandes cantidades, producen un efecto protector sobre los sistemas de neurotransmisión y el deterioro de las funciones resultantes. La pubertad es una etapa en la que los niveles de hormonas gonadales se disparan drásticamente, pudiendo afectar a los efectos de los fármacos. Las estructuras sobre las que hemos querido incidir tienen a su vez receptores para estas hormonas y la presencia de ambas sustancias a la vez podría conllevar una menor efectividad de los fármacos sobre la neurotransmisión en hipocampo, troncoencéfalo y amígdala por la presencia tanto de andrógenos como de estrógenos. Los niveles bajos de testosterona en animales jóvenes han demostrado ser causantes de altos niveles de ansiedad y deterioros en memoria de miedo condicionado (Edinger y cols., 2004; Frye y Seliga, 2001). Los efectos de los estrógenos por su parte también han sido observados en diferentes paradigmas ya que parecen tener un papel importante en el mantenimiento y regeneración de las proyecciones colinérgicas hacia el hipocampo y la corteza prefrontal, mostrando las hembras mejor funcionamiento cognitivo que los machos (Sutcliffe, 2011). Por otra parte, se han mostrado efectos de protección frente a déficits memorísticos en modelos animales (Wise y cols., 2001) relacionando esta neuroprotección con cambios en la densidad de espinas dendríticas asociadas a aumentos en los niveles de estrógenos (Lam y Leranth, 2003) y a los descubrimientos de las mejoras mnésicas por aumento de las

uniones de receptores NMDA en CA1 del hipocampo (Daniel y Dohanich, 2001). Estos datos se interpretarían en la dirección de una mayor capacidad de aprendizaje de los sujetos como una función de la edad que va en aumento con el paso del tiempo desde la etapa post-natal a la adultez (Smith y cols., 1996) y por la acción protectora de las hormonas sexuales en el cerebro a partir del aumento de los niveles hormonales puberales.

En la etapa adulta hemos observado deterioro en el caso del grupo tratado con 3 mg/kg de escopolamina para los machos y de la dosis de 0.3 mg/kg para las hembras. Estos resultados están de acuerdo con la literatura en la que se encuentran deterioros en memoria de los sujetos en dosis bajas y muy altas (Roldán y cols., 1997; Rush, 1988) siendo inefectivas las dosis moderadas en su administración a roedores después del entrenamiento en evitación inhibitoria. En este caso, en general observamos que los animales adultos presentan menos deterioro de aprendizaje que los prepuberales, algo que podría atribuirse al hecho comentado previamente como un mejor aprendizaje de la tarea y menor capacidad de los fármacos para incidir en los procesos mnésicos al producirse la administración post-entrenamiento y por el intervalo entrenamiento-test que fue de 1 semana (las diferencias pueden ser menos notables por mayor tasa de olvido de los sujetos no tratados).

-Efectos de la administración post-entrenamiento de R-(+)-8-OH-DPAT

Los efectos de este agonista serotoninérgico específico de los receptores 5-HT_{1A} habían sido mostrados por otros autores y reportados como amnésicos en sujetos adultos, en diferentes dosis, en evitación inhibitoria y otras pruebas de memoria (Carli y cols., 1992; Jackson y cols., 1994; Onho y cols., 1996). En este caso estos efectos se observaron en varias dosis en las 3 edades, afectando más a los sujetos prepuberales y con diferentes patrones en machos y hembras. Esta efectividad se ha visto ligada a la estimulación de los receptores post-sinápticos 5-HT_{1A} de serotonina que regulan la hiperpolarización de las neuronas piramidales en las regiones hipocámpicas CA1 y CA3 que inhiben la *PLP* (potenciación a largo plazo) por una menor liberación de acetilcolina (Onho y cols., 1996). Los efectos más significativos se observaron en el Experimento 8, donde los machos prepuberales no aprendieron la tarea en ninguna de las dosis administradas. En dicho experimento las hembras tampoco aprendieron la tarea con las dosis media y alta del fármaco. En otro experimento con sujetos prepuberales (Experimento 5) no se observaron los mismos resultados mostrando deterioro únicamente machos y hembras con la dosis más baja. Estos resultados están en consonancia con los de Lüttgen y cols. (2005), concluyendo que este fármaco administrado sistémicamente puede tener un efecto bifásico en la memoria,

facilitándola o impidiéndola según en qué receptores 5-HT_{1A} se actúe en cada caso o según el balance de los efectos sobre las distintas estructuras donde existen estos receptores. Estos autores probaron varios agonistas y antagonistas serotoninérgicos, directamente en distintas estructuras y comprobaron que el 8-OH-DPAT, según activara unos receptores u otros producía unos efectos facilitadores o deteriorantes sobre la evitación pasiva y otras pruebas de memoria. En concreto, concluyeron que si los receptores activados por este fármaco son los autorreceptores del núcleo del rafe dorsal, la activación de éstos produce efectos favorecedores sobre la memoria que producen una disminución del disparo de las neuronas y de los niveles de serotonina en el espacio sináptico. Por el contrario, la activación de los receptores post-sinápticos 5-HT_{1A} produce deterioro de memoria (Tricklebank y cols., 1984) y su mayor concentración con esta función se localiza en la neocorteza y el hipocampo. Así, con la administración sistémica del fármaco estaríamos incidiendo tanto en el núcleo del rafe como en las dianas que nos interesarían, no encontrando el efecto de deterioro deseado u observado en otras ocasiones (Steckler y Sahgal, 1995).

-Efectos de la administración post-entrenamiento de fisostigmina

Con la administración post-entrenamiento de fisostigmina, anticolinesterásico utilizado en ensayos clínicos como potenciador cognitivo en pacientes de Alzheimer (Thal y cols., 1999), no se encontraron los efectos facilitadores esperados. Se han observado efectos sobre la tarea al infundirla en diferentes estructuras, como hipocampo y corteza entorrinal, para contrarrestar el efecto deteriorante del muscimol infundido en el septum (Degroot y Parent, 2001). También se han observado mejorías en evitación pasiva al administrar distintas dosis muy bajas de fisostigmina post-entrenamiento (Baratti y cols., 1979) y cuando había un deterioro previo producido por la administración pre-entrenamiento de amitriptilina (Monleón y cols., 2009). En esta área se ha observado que los parámetros en los que se realiza la prueba de memoria son muy importantes para observar efectos de los fármacos, que casi siempre son dependientes de la dosis. La edad de los sujetos (todos los casos reportados eran sujetos adultos), las dosis utilizadas, la vía de administración y los intervalos de administración previa o post-entrenamiento y posterior realización del test de recuerdo son factores importantes para observar los efectos de algunos fármacos. Éste en especial había mostrado efectos facilitadores dependiendo del intervalo entrenamiento-test (Hamburg, 1967), con una disminución de los efectos al administrarse después del entrenamiento con unos parámetros temporales determinados (Santucci y cols., 2003). Además, los efectos observados, en la mayoría de ocasiones se daban en sujetos

previamente tratados con otros fármacos deteriorantes de la memoria, como antidepresivos u otros agentes farmacológicos (Jafari-Sabet, 2006). En estos casos, la administración de fisostigmina facilitaba la memoria. Contrariamente, algunos autores habían observado en su aplicación clínica a humanos como antídoto a una intoxicación por anticolinérgicos, que cuando tal intoxicación no existía, la administración de fisostigmina produjo un síndrome parecido al mismo consecuente a un déficit de acetilcolina (Lewin, 1994; Beaver y Gavin, 1998). Con todo ello y la adecuación de las dosis efectivas, algo que se discutió en el capítulo correspondiente, se podría explicar que los niveles de acetilcolina son importantes para el correcto funcionamiento cognitivo, debiendo estar en un nivel óptimo.

En relación a los efectos en sujetos prepuberales, se observó deterioro con la dosis intermedia en machos y mayores latencias que los controles con las demás dosis, no alcanzando la significación estadística. En los sujetos postpuberales la dosis más baja fue la que produjo deterioro, tanto en machos como en hembras, y en los demás grupos no se observaron efectos facilitadores al igual que en el caso de los animales adultos. La observación de efectos deteriorantes podría ser una consecuencia de los efectos colaterales en otros sistemas fisiológicos que produce la fisostigmina que impidieran la consolidación del aprendizaje en algunas dosis y a lo comentado acerca de un nivel óptimo de acetilcolina,

teniendo la administración del fármaco consecuencias negativas sobre la memoria si no existe un deterioro previo de ésta.

-Efectos de la administración post-entrenamiento de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT

La combinación de estos dos fármacos se consideró por ser dos fármacos muy selectivos para dos sistemas de neurotransmisión (colinérgico y serotoninérgico) muy implicados en la consolidación de distintos aprendizajes. Por separado, como hemos comentado, la literatura indica que son dos fármacos deteriorantes en evitación pasiva y otras pruebas de memoria. Estudios anatómicos han revelado distintas estructuras cerebrales de importancia para las funciones cognitivas donde hay interacciones directas entre los dos sistemas de neurotransmisión (Steckler y Sahgal, 1995). Además, se considera que el sistema colinérgico viene mediado por las acciones del sistema serotoninérgico y viceversa, es decir, que las relaciones entre ambos sistemas serían recíprocas.

Estudios previos demostraron una sinergia en los efectos de distintos fármacos administrados de forma aguda que interfirieron en los dos sistemas de neurotransmisión encontrando efectos deteriorantes al unirse ambos efectos que los fármacos en la misma dosis que por separado no producían (Riekinnen y cols., 1994). Este trabajo se realizó con

la tarea de navegación de Morris utilizando mecamilamina y R-(+)-8-OH-DPAT. Otros mostraron efectos similares con otros fármacos con las mismas acciones, como escopolamina + PCPA en evitación activa (Vanderwolf, 1987) o mecamilamina + PCPA en evitación pasiva (Riekinnen y Rienkinnen, 1985; Riekinnen y cols., 1992), aunque en estos casos la administración de los fármacos fue previa al entrenamiento.

En los experimentos de esta tesis, como en otras ocasiones, se observaron mayores efectos en la etapa de desarrollo más temprana. Aquí los animales eran más susceptibles de verse afectados por los fármacos, como apuntaron otros autores (Jeltsch-David y cols., 2008). En los machos se observaron efectos más coincidentes con los mostrados por la administración de la escopolamina, siendo más deteriorante a mayores dosis. En las hembras se pudieron observar efectos sinérgicos de los dos fármacos. En animales postpuberales y adultos se observaron únicamente efectos en machos, con la administración de la combinación de dosis bajas, que no presentaban efectos deteriorantes por separado. Se encontraron efectos claramente debidos a una sinergia entre la manipulación colinérgica y serotoninérgica como se observó en nuestro grupo de investigación con la administración de amitriptilina y fluoxetina (Parra y cols., 2010) aunque estos efectos se observaron, como hemos apuntado previamente, con la administración de los fármacos pre-entrenamiento.

-Efectos de la administración post-entrenamiento de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT

Con esta combinación de fármacos se esperaba que hubiese cierta anulación de los efectos producidos por los fármacos por separado. Es decir, que el déficit producido por un fármaco deteriorante de la memoria como el producido por el agonista serotoninérgico, fuera anulado por el efecto favorecedor de la fisostigmina.

Normille y Altman, (1992) ya encontraron efectos sinérgicos de dos fármacos similares: fisostigmina + ketarserina (agonista 5-HT₂) administrados conjuntamente en una prueba de evitación pasiva.

En sujetos prepuberales observamos efectos de deterioro con la administración de dosis bajas, siendo interpretado como un fallo de la fisostigmina en contrarrestar los efectos del R-(+)-8-OH-DPAT o como una unión entre los efectos fisiológicos negativos de la fisostigmina encontrados en algunas dosis y los deteriorantes propios del R-(+)-8-OH-DPAT. Con las dosis intermedia y alta no se observaron efectos significativos aunque las latencias medias fueron superiores a las presentadas por los controles, algo que estaría en detrimento de un balance 0 de los dos fármacos.

En sujetos postpuberales no se observaron efectos en general de esta combinación aunque en uno de los grupos de hembras que recibieron las dosis intermedias se observaron

efectos de deterioro pudiendo deberse a los efectos sumatorios negativos sobre la memoria que hemos comentado.

Finalmente, en sujetos adultos no se observaron diferencias significativas en la administración de combinaciones de los fármacos de acuerdo con lo esperado pudiendo deberse a un balance 0 de los efectos o a ningún efecto de los fármacos por separado, por haber observado pocos efectos de éstos en su administración post-entrenamiento en esta etapa vital.

CAPÍTULO 17: CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de los experimentos realizados en la presente tesis doctoral son:

1. La administración aguda de escopolamina, R-(+)-8-OH-DPAT y fisostigmina tuvieron efectos menos significativos de los esperados.
 2. La administración post-entrenamiento de escopolamina (0.3, 1 y 3 mg/kg) y R-(+)-8-OH-DPAT (0.1, 0.2 y 0.3 mg/kg) produjo deterioros en la consolidación del aprendizaje de la tarea de forma dosis dependiente.
 3. Existen diferencias en el aprendizaje de evitación inhibitoria de ratones CD-1 procedentes de varios proveedores, siendo mejores los ratones machos y hembras de Charles River.
 4. Las combinaciones de escopolamina y R-(+)-8-OH-DPAT en algunos casos mostraron una acción sinérgica, produciendo efectos deteriorantes también de forma dosis dependiente.
 5. La administración de fisostigmina (0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg) no produjo por sí sola una mejora sobre el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria.
 6. Las combinaciones de fisostigmina y R-(+)-8-OH-DPAT mostraron distintos patrones de efectos en distintas etapas y sexo de los animales: deterioro por efectos secundarios de fisostigmina, efectos de anulación del deterioro producido por R-(+)-8-OH-DPAT y ningún efecto de mejora.
-

7. Se observaron diferencias de sexo en el aprendizaje de evitación inhibitoria en todas las etapas del desarrollo, mostrando las hembras latencias más largas en todos los casos y siendo menos afectadas por los efectos farmacológicos.
8. La etapa prepuberal ha mostrado ser la más sensible a los efectos de los fármacos utilizados.
9. Los efectos de la administración post-entrenamiento son menos patentes que los recogidos en la literatura de su administración pre-entrenamiento.

Como conclusión general, podemos afirmar que los sistemas colinérgico y serotoninérgico intervienen de manera importante en la consolidación del aprendizaje de la evitación inhibitoria en las tres etapas del ciclo vital: pre-puberal, post-puberal y adulta con diferencias en ambos sexos.

CAPÍTULO 18:
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Referencias

- Abe, Y., Aoyagi, A., Hara, T., Abe, K., Yamazaki, R., Kumagae, Y., Naruto, S., Koyama, K., Marumoto, S., Tago, K., Toda, N., Takami, N., Yamada, N., Ori, M., Kogen, H., Kaneko, T. (2003). Pharmacological Characterization of RS-1259, an Orally Active Dual Inhibitor of Acetylcholinesterase and Serotonin Transporter, in Rodents: Possible Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Pharmacological Sciences*, 93, 95 – 105.
- Abel, T., Lattal, K.M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 180-187.
- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, A.R. (1998). The human amígdala in social judgement. *Nature*, 393, 470-474.
- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (2015). Informe de utilización de medicamentos antidepresivos en España durante el periodo 2000-2013. Ref. 14012015.
- Albernini, C.M. (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?. *Trends in Neurosciences*, 28, 51-56.
- Alkon, K.L., Amaral, D.G., Bear, M.F., Black J., Carew, T.J., Cohen, N.J., Disterhoft, J.F., Eichembbaum, H., Golski, S., Gorman, L.K., Lynch, G., McNaughton, B.L., Mishikin, M., Moyer, J.R., Olds, J.L., Olton, D.S., Otto, T., Squire, L.R., Staubli, U., Thompson, L.T., Wible, C. (1991). Learning and memory. *Brain Research Reviews*, 16, 193-220.
- Altman, H.J., Normille, H.J. (1987). Different temporal effects of serotonergic antagonists on passive avoidance retention. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 353-359.
- Alvarez, P., Squire LR. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: A simple network model. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 7041-7045.
-

- Amado-Boccaro, I., Gougoulis, N., Poirier, M.F., Galinowski, A., Loño, H. (1995). Effects of antidepressants on cognitive functions: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 19, 479-493.
- Ambrogio Lorenzini, C.G., Balsi, E., Bucherelli, C., Sachetti, B., Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71, 1-8.
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. (5th ed.) Washington D.C.: American Psychiatric Association.
- Anderson, A.K., Phelps, E.A. (2001). Lesions of the human amygdala impair enhanced perception of emotionally salient events. *Nature*, 411, 305-309.
- Andlin-Sobocki, P., Jonsson, B., Wittchen, H.U., Olesen, J. (2005). Cost of disorders of the Brain in Europe. *European Journal of Neurology*, 12(1), 1-27.
- Arenas, M.C., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., Martos, A.J., Everss, E., Ferrer-Añó, A., Parra, A. (2006). Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? *Behavioural Brain Research*, 166, 150-158.
- Arenas, M.C., Parra, A., Simón, V. (1995). Gender differences in the effects of haloperidol on Avoidance Conditioning in Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51, 601-609.
- Arkhipov, V.I. (1999). Memory dissociation: the approach to the study of retrieval process. *Behavioural Brain Research*, 106, 39-46.
- Assi, A.A. (2001). N6-Cyclohexyladenosine and 3-(2-Carboxypiperazine-4-yl)-1-propenyl-1-phosphonic acid enhance the effect of antiepileptic drugs against induced seizures in mice. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 4, 42-51.
- Atkinson, R.C., Shiffrin, R.M. (1968). Advances in Research and Theory. En K.W. Spence (Ed.) *The Psychology of*
-

Learning and Motivation (pp. 89-195). New York: Academic Press.

- Azami , N.S., Piri, M., Oryan, S., Jahanshahi, M., Babapour, V., Zarrindast, M.R. (2010). Involvement of dorsal hippocampal a-adrenergic receptors in the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93, 455-462.
- Azizbeigi, R., Zarrindast, M.R., Ahmadi, S. (2013). Interaction between gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor agents and scopolamine in the nucleus accumbens on impairment of inhibitory avoidance memory performance in rat. *Behavioural Brain Research*, 241, 191-197.
- Babar, E., Melik, E., Ozgunen, T., Kaya, M., Polat, S. (2002). Effects of excitotoxic median raphe lesions on scopolamine-induced working memory deficits in inhibitory avoidance. *International Journal of Neuroscience*, 112, 525-35.
- Baddeley, A.D. (1994). Las memorias humanas. *Mundo Científico*, 150, 802-807.
- Baddeley, A.D. (1998). Recent development in working memory. *Current opinion in neurobiology*, 8, 234-238.
- Baghai, T.C., Blier, P., Baldwin, D.S., Bauer, M., Goodwin, G.M., Fountoulakis, K.N., Kasper, S., Leonard, B.E., Malt, U.F., Stein, D., Versiani, M., Möller, H. (2011). General and comparative efficacy and effectiveness of antidepressants in the acute treatment of depressive disorders: a report by the WPA section of pharmacopsychiatry. *European Archives Psychiatry Clinic Neuroscience*, 261(3), 207-245.
- Bailey, C.H., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 13445-13452.
- Baldessarini, R.J. (2001). Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and anxiety disorders,
-

En L.E. Hardman, A.G. Limbird, J.G. Gilman (Eds.) *The pharmacological basis of therapeutics* (10th ed.)(pp. 447-483). New York: McGraw-Hill.

- Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 6, 247-296.
- Baratti, C.M. y Boccia, M.M. (1999). Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behavioural Pharmacology*, 10, 731-737.
- Baratti, C.M., Huygens, P., Miño, J., Merlo, A., Gardella, J. (1979). Memory facilitation with Posttrial Injection of Oxotremorine and Physostigmine in Mice. *Psychopharmacology*, 64, 85-88.
- Barros, D.M., Mello e Souza, T., David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, P., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D₁, β -noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of rat. *Behavioural Brain Research*, 124, 1-7.
- Barros, D.M., Ramirez, M.R., Izquierdo, I. (2005). Modulation of working, short- and long- term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdale in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83, 113-118.
- Bartus, R.T., Dean, R.L. (1981). Age-related memory loss and drug therapy: Possible directions based on animal models. En S.J. Enna, T. Samorajsky, B. Beer, (Eds.), *Aging*. Vol 10. (pp. 209-223).New York: Reven Press New York.
- Beasley, C.M., Masica, D.N., Potvin, J.H. (1992). Fluoxetine: a review of receptor and functional effects and their clinical implications. *Psychopharmacology*, 107, 1-10.
- Beatty, W.W. (1979). Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: organizational and activational influences. *Hormones and Behavior*, 12, 112-163.
-

- Beaver, K.M., Gavin, T.J. (1998). Treatment of acute anticholinergic poisoning with physostigmine. *American Journal of Emergency Medicine*, 16, 505-507.
- Beck, A.T., Greenberg, R.L. (1979). Brief cognitive therapy. *The Psychiatric Clinics of North America*, 2, 23-37.
- Beck, K.D., Luine, V.N. (2002). Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: Role of housing conditions. *Physiology and Behavior*, 75, 661-673.
- Beck, K.D., Luine, V.N. (2010). Evidence for sex-specific shifting of neural processes underlying learning and memory following stress. *Physiology and Behavior*, 99(2), 204-211.
- Berendsen, H.H.G., Jenck, F., Broekkamp, C.L.E. (1989). Selective activation of 5-HT_{1A} receptors induces lower lip retraction in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 33, 821-827.
- Berger-Sweeney, J. (1998). The effects of neonatal basal forebrain lesions on cognition: towards understanding the developmental role of the cholinergic basal forebrain. *International Journal Developmental Neuroscience*, 16, 603-612.
- Berger-Sweeney, J. (2003). The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 401-411.
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I., Medina, J.H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signalling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 7041-7046.
- Berón de Astrada, M., Maldonado, H. (1999). Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnatus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 63, 109-118.
-

- Bert, B., Fink, H., Rothe, J., Walstab, J., Bönisch, H. (2008). Learning and memory in 5-HT(1A)-receptor mutant mice. *Behavioural Brain Research*, 195, 78-85.
- Bethea, C.L., Lu, N.Z., Gundlach, C., Streicher, J.M. (2002) Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 23, 41-100.
- Bevilaqua, L.R., Silva, W.N., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2005). Extinction and readquisition of a fear-motivated memory require activity of the Src family kinases in the CA1 region of the hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81, 139-145.
- Bianchi, C., Siniscalchi, A., Beani, L. (1990). 5-HT_{1A} agonists increase and 5-HT₃ agonists decrease acetylcholine efflux from cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology*, 101, 448-452.
- Blake, M. G., Boccia, M. M., Krawczyk, M. C., Baratti, C. M. (2011). Scopolamine prevents retrograde memory interference between two different learning tasks. *Physiology and Behavior*, 102, 332-337.
- Blanchard, D.C., Sakai, R.R., McEwen, B., Weiss, S.M., Blanchard, R.J. (1993). Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behavioural Brain Research*, 58, 113-121.
- Blokland, A. (1996). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory?. *Brain Research Reviews*, 21, 285-300.
- Boccia, M.M., Blake, M.G., Acosta, G.B., Baratti, C.M. (2004). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience*, 124, 735-741.
- Boccia, M.M., Blake, M.G., Acosta, G.B., Baratti, C.M. (2005). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: effects of a new different learning task. *Neuroscience*, 135, 19-29.
- Boccia, M.M., Blake, M.G., Krawczyk, M.C., Baratti, C.M. (2011). Sildenafil, a selective phosphodiesterase type 5
-

inhibitor, enhances memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Behavioural Brain Research*, 220, 319-324.

- Bonini, J.S., Rodrigues, L., Kerr, D.S., Bevilaqua, L.R., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2003). AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair formation of inhibitory avoidance in rats. *Behavioural Pharmacology*, 14, 161-166.
- Borowicz, K.K., Kleinrok, Z., Czuczwar, S.J. (2001). Glutamate receptor antagonists differentially affect the protective activity of conventional antiepileptics against amygdale-kindled seizure in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 11, 61-68.
- Bossé, R., Di Paolo, T. (1996). The modulation of brain dopamine and GABA A receptors by estradiol: a clue for CNS changes occurring at menopause. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 5, 859-873.
- Both, F.L., Meneghini, L., Kerber, V.A., Henriques, A.T., Elisabetsky, E. (2005). Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a Kht2a/c serotonin modulator. *Journal of Natural Products*, 68, 374-380.
- Botton, P.H., Costa, M.S., Ardais, A.P., Mioranza, S., Souza, D.O., Teixeira da Rocha, J.B., Porciúncula, L.O. (2010). Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behavioural Brain Research*, 214, 254-259.
- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P., Davison, A. N. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*, 99, 459-496.
- Bures, J. (1993). Critical appraisal of behavior tests used for evaluation of age-related memory deficits in animals. *Neuroscience Research Communications*, 13, 35-38.
-

- Bures, J., Buresová, C., Houston, J.P. (1983). *Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour*. Amsterdam: Elsevier, 148-161.
- Cafferata, G.L.; Kasper, J., Bernstein, A. (1983). Family roles, structure and stressors in relation to sex differences in obtaining psychotropic drugs. *Journal of Health & Social Behavior*, 24, 132-143.
- Camelo, S.M., Ardila, A. (2013). Effects of short- and long-term Scopolamine Intoxication on Memory and Conceptual Skills. *Diversitas: Perspectivas en Psicología*, 9, 335-346.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Rosato, J.I., Ramirez, M., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84, 25-32.
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., MacQueen, G.M. (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*, 161, 598-607.
- Carageorgiou, H., Zarros, A., Tsakiris, S., (2003). Selegiline long-term effects on brain acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase activities, antioxidant status and learning performance of aged rats. *Pharmacology Research*, 48, 245-251.
- Carli, M., Tranchina, S., Samanin, R. (1992). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin, a 5-HT_{1A} receptor agonist, impairs performance in a passive avoidance task. *European Journal of Pharmacology*, 211, 227-234.
- Carlson, N.R. (2014). *Fisiología de la conducta* (11^a Ed.). Madrid: Pearson.
- Castaneda, A.E., Tuulio-Henriksson, A., Marttunen, M., Suvisaari, J., Lönnqvist, J. (2008). A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. *Journal of Affective Disorders*, 106, 1-27.
-

- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes, *Current Drug Targets*, 2, 273-283.
- Chan, K.H., Morrell J.R., Jarrad, L.E., Davidson, T.L. (2001). Reconsideration of the role of the hippocampus in learned inhibition. *Behavioural Brain Research*, 1, 111-130.
- Chen, Y.G. (2005). Specific tau phosphorylation sites in hippocampus correlate with impairment of step-down inhibitory avoidance task in rats. *Behavioural Brain Research*, 158, 277-284.
- Choi, R.L., Roch, M. , Jenden, D.J. (1973). A regional study of acetylcholine turnover in rat brain and the effects of oxotremorine. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 16, 188-190.
- Ciamei, A., Aversano, M., Cestari, V., Castellano, C. (2001). Effects of MK-801 and nicotine combinations on memory consolidation in CD1 mice. *Psychopharmacology*, 154,126-130.
- Cipolotti, L., Shallice, T., Chan, D., Fox, N., Scahill, R., Harrison, G., Stevens, J., Rudge, P. (2001). Long-term retrograde amnesia: the crucial role of the hippocampus. *Neuropsychologia*, 39, 151-172.
- Cole, B.J., Jones, G.H., Turner, J.D. (1994). 5-HT1A receptor agonists improve the performance of normal and scopolamine-impaired rats in an operant delayed matching to position task. *Psychopharmacology*, 116, 135-42.
- Collerton, D. (1986). Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 19, 1-28.
- Conrad, C.D., Jackson, J.L., Wiczorek, L., Baran, S.E., Harman, J.S., Wright, R.L., Korol, D.L., (2004). Acute stress impairs spatial memory in male but not female rats: influence of estrous cycle. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 78, 569-579.
- Conrad, R. (1964). Acoustic confusions in immediate memory. *Britanic Journal of Psychology*, 55, 75-84.
-

- Contador-Castillo, I., Fernandez-Calvo, B., Cacho-Gutierrez, L.J., Ramos-Campos, F., Hernandez-Martin L. (2009). Depresión en la demencia tipo Alzheimer: ¿existe algún efecto sobre la memoria?. *Revista de Neurologia*, 49(10), 505-510.
- Cooke, B.M., Woolley, C.S. (2005a). Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. *Journal of Neurobiology*, 64, 34-46.
- Cooke, B.M., Wolley, C.S. (2005b). Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Journal of Neuroscience*, 25, 10759-10767.
- Cooper, L.A., Shepard, R.N. (1973). Chronometric studies of the rotation of mental images. En W. G. Chase, (Ed.), *Visual information processing*. New York: Academic Press.
- Cosgrove, K.P., Mazure, C.M., Staley, J.K. (2007). Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function and chemistry. *Biological Psychiatry*, 62(8), 847-855.
- Costa, J.C., Costac, K.M., Martins do Nascimento, J.L. (2010). Scopolamine- and diazepam-induced amnesia are blocked by systemic and intraseptal administration of substance P and choline chloride. *Peptides*, 31, 1756-1760.
- Curzon, G. (1990). Stereotyped and other motor responses to 5-hydroxytryptamine receptor activation. En S.J. Cooper, C.T. Dourish (Eds.), *Neurobiology of Stereotyped Behaviour* (pp 142-167). Oxford, UK: University Press.
- Curzon, G., Kennett, G.A. (1990). m-CPP: A tool for studying behavioral responses associated with 5-HT1c receptors. *TIPS*, 11, 181-182.
- D'Agata, V., Cavallaro, S. (2003). Hippocampal gene expression profiles in passive avoidance conditioning. *European Journal of Neuroscience*, 18, 2835-2841.
- Daniel, J.M., Dohanich, G.P. (2001). Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory. *Journal of Neuroscience*, 21, 6949-6956.
-

- Daum, I., Schugens, M.M. (1996). On the cerebellum and classical conditioning. *Current Directions in Psychological Science*, 5, 58-61.
- Davis, K. L., Hollister, L.E., Overall, J., Johnson, A., Train, K. (1976). Physostigmine: Effects on Cognition and Affect in normal subjects. *Psychopharmacology*, 51, 23-27.
- Degroot, A., Parent, M.B. (2001). Infusions of physostigmine into the hippocampus or the entorhinal cortex attenuate avoidance retention deficits produced by intra-septal infusions of the GABA agonist muscimol. *Brain Research*, 920, 10-18.
- Degroot, A., Nomikos, G. (2005). Fluoxetine disrupts the integration of anxiety and aversive memories. *Neuropsychopharmacology*, 30, 391-400.
- Detrait, E.R., Danis, B., Lamberty, Y., Foerch, P. (2014). Peripheral administration of an anti-TNF- α receptor fusion protein counteracts the amyloid induced elevation of hippocampal TNF- α levels and memory deficits in mice. *Neurochemistry International*, 72, 10-13.
- Deutsch, J.A., Hamburg, M.D., Dahl, H. (1966). Anticholinesterase-induced amnesia and its temporal aspects. *Science*, 151, 221-223.
- Deutsch, J.A. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*, 174, 788-794.
- Dourish, C.T., Hutson, P.J., Curzon, G. (1985). Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacology*, 86, 197-204.
- Dudai, Y. (2000). The shaky trace. *Nature*, 406, 686-687.
- Dudai, Y., Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44, 93-100.
- Duka, T., Curran, H.V., Rusted, J.M., Weintgartner, H.J. (1996). Perspectives on cognitive psychopharmacology research. *Behavioural Pharmacology*, 7, 401-410.
-

- Duman, R.S., Malberg, J. , Thome, J. (1999). Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biological Psychiatry*, 46, 1181-1191.
- Edinger, K.L., Frye, C.A. (2004). Testosterone's analgesic, anxiolytic, and cognitive-enhancing effects may be due in part to actions of its 5 α -reduced metabolites in the hippocampus. *Behavioural Neuroscience*, 118, 1352-1364.
- Eichenbaum, H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 123-133.
- Eichenbaum, H. (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural Brain Research*, 127, 199-207.
- Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., Bunsey, M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13500-13507.
- Eidi, M., Zarrindast, M.R., Eidi, A., Oryan, S. , Parivar, K. (2003). Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *European Journal of Pharmacology*, 465, 91-96.
- Engelbregt, M.J., Houdijk, M.E.C.A.M., Popp-Snijders, C., Delemarre-van de Waal, H.A. (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research*, 48, 803-807.
- Eriksson, T.M., Holst, S., Stan, T.L., Hager, T., Sjögren, B., Ögren, S.O., Svenningsson, P., Stiedl, O. (2012). 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropharmacology*, 63, 1150-1160.
- Evenden, J.L., Angeby-Möller, K. (1990). Effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) on locomotor activity and rearing of mice and rats. *Psychopharmacology*, 102, 485-491.
-

- Everitt, B.J., Robbins, T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annual Review of Psychology*, 48, 649-684.
- Everss, E., Arenas, M.C., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., Parra, A. (1999). Effects of amitriptyline on memory consolidation in male and female mice. *Medical Science Research*, 27, 237-239.
- Everss, E., Arenas, M.C., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., Parra, A. (2005). Piracetam counteracts the effects of amitriptyline on inhibitory avoidance in CD1 mice. *Behavioural Brain Research*, 159, 235-242.
- Farkas, L., Crowe, S.F. (2000). The role of the benzodiazepine-GABA system in the memory processes of the day-old chick. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65, 223-231.
- Feigley D.A. (1974). Effects of scopolamine on activity and passive avoidance learning in rats of different ages. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 87, 26-36.
- Ferreira, A.R., Furstenau, L., Blanco, C., Kornsiuk, E., Sanchez, G., Daroit, D., Castro e Silva, M., Cervenansky, C., Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J.A. (2003). Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74, 411-415.
- Ferrer-Añó, A. (2008). *Estudio de la mediación del sistema histaminérgico en el efecto producido por la amitriptilina sobre la evitación inhibitoria en ratones*. (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia. Valencia.
- Fischer, W., Gage, F.H., Björklund, A. (1989). Degenerative changes in forebrain cholinergic nuclei correlate with cognitive impairments in aged rats. *European Journal of Neuroscience*, 1, 34-44.
- Frackiewicz, E.J., Sramek, J.J. , Cutler, N.R. (2000). Gender differences in depression and antidepressant pharmacokinetics and adverse events. *The Annals of Pharmacotherapy*, 34, 80-88.
-

- Frye, C.A., Seliga, A.M. (2001). Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*, 1, 371-381.
- Gabilondo, A., Rojas-Farreras, S., Vilagut, G., Haro, J.M., Fernández, A., Pinto-Meza, A., Alonso, J. (2010). Epidemiology of major depressive episode in a southern European country: Results from the ESEMeD-Spain project. *Journal of Affective Disorders*, 120, 76-85.
- Gabrieli, J.D.E (1998). Cognitive Neuroscience of human memory. *Annual Review of Psychology*, 49, 87-115.
- Galea, L.A., Uban, K.A., Epp, J.R., Brummelte, S., Barha, C.K., Wilson, W.L., Lieblich, S.E., Pawluski, J.L. (2008). Endocrine regulation of cognition and neuroplasticity: our pursuit to unveil the complex interaction between hormones, the brain, and behavior. *Canadian Journal of Experimental Psychology*, 62, 247-260.
- Gandhi, M., Aweeka, F., Greenblatt, R.M., Blaschke, T.F. (2004). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 499-523.
- García, R., Vouimba, R.M., Baudry, M., Thompson, R.F. (1999). The amygdale modulates prefrontal cortex activity relative to conditioned fear. *Nature*, 402, 294-296.
- Gareri, P., Falconi, U., de Fazio, P., de Sarro, G. (2000). Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Progress in Neurobiology*, 61, 353-396.
- Gibbs, R.B. (1997). Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons vary as a function of dose and duration of treatment. *Brain Research*, 757, 10-16.
- Gluck, M.A., Myers, C.E. (1998). Psychobiological models of hippocampal function in learning and memory. En J.L. Martinez, R.P. Kesner (Eds.), *Neurobiology of learning and memory* (pp. 417-444). New York: Academic Press.
-

- Gold, P.E. (2003). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 194-210.
- González-Pardo, H., Conejo, N.M., Arias, J.L., Monleón, S., Vinader-Caerols, C., Parra, A. (2008). Changes in brain oxidative metabolism induced by inhibitory avoidance learning and acute administration of amitriptyline. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89, 456-462.
- Gotlib, I.H., Joormann, J. (2010). Cognition and Depression: Current status and future directions. *Annual Review of Clinical Psychology*, 6, 285-312.
- Gower, A.J. (1987). Enhancement by sevecorine and physostigmine of retention of passive avoidance response in mice. *Psychopharmacology*, 91, 326-329.
- Grissom, E.M., Hawley, W.R., Bromley-Dulfano, S.S., Marino, S.E., Stathopoulos, N.G., Dohanich, G.P. (2012). Learning strategy is influenced by trait anxiety and early rearing conditions in prepubertal male, but not prepubertal female rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98, 174-181.
- Grüter, W., Pödlinger, W. (1982). Maprotiline. *Modern Problems of Pharmacopsychiatry*, 18, 17-48.
- Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R.C., Rodrigues, M.V., Schmatz, R., Pimentel, V.C., Vieira, J.M., Marisco, P., Ribeiro, D.A., Leal, C., Rubin, M.A., Mazzanti, C.M., Spanevello, R. (2012). Protective effects of anthocyanis on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life Sciences*, 91, 1221-1228.
- Hamburg, M.D. (1976). Retrograde amnesia produced by intraperitoneal injection of physostigmine. *Science*, 156, 973-974.
- Hamon, M., Collin, E., Chantrel, D., Daval, G., Verge, D., Bourgoin, S., Cesselin, F. (1990). Serotonin receptors and the modulation of pain. En J.M. Besson (Ed.), *Serotonin and Pain*. (pp 53) Amsterdam: Excerpta Medica.
-

- Hardman JG, Goodman Gilman A, Limbird LE. (1995) *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Harvey, A.T., Rudolph, R.L., Preskorn, S.H. (2000). Evidence of the dual mechanisms of action of venlafaxine. *Archives of General Psychiatry*, 57, 503-509.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Heinsbroek, R.P., Van Haaren, F., Van de Poll, N.E. (1988). Sex differences in passive avoidance behavior of rats: sex-dependent susceptibility to shock-induced behavioral depression. *Physiology and Behavior*, 43, 201-206.
- Heise, G.A. (1981). Learning and memory facilitators: experimental definition and current status. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2, 158-160.
- Henderson, V.W., Paganini-Hill, A., Emanuel, C.K., Dunn, M.E., Buckwalter, J.G. (1994). Estrogen replacement therapy in older women: Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Archives of Neurology*, 51, 896-900.
- Hertz, L., Chen, Y., Gibbs, M.E., Zang, P., Peng, L. (2004). Astrocytic adrenoceptors: a major drug target in neurological and psychiatric disorders? *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 3, 239-267.
- Hirarte, K., Kuribara, H., Tadokoro, S. (1989). Breeder differences within Wistar strain rats in step-through type passive avoidance response. *Japanese Journal of Pharmacology*, 51, 563-567.
- Honarmand, A.R., Pourtabatabaei, N., Rahimi, N., Dehpour, A.R., Javadi-Paydar, M. (2014). Suppression of memory acquisition following co-administration of lithium and atorvastatin through nitric oxide pathway in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 122, 203-211.
-

- Howland, R.H. (2009). The antidepressant effects of anticholinergic drugs. *Journal of Psychosocial Nursing*, 47, 17-20.
- Hozumi, S., Nakagawasai, O., Tan-No, K., Nijjima, F., Yamadera, F., Murata, A., Arai, Y., Yasuhara, H., Tadano, T. (2003). Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy. *Behavioural Brain Research*, 138, 9-15.
- Huang, Z.B., Wang, H., Rao, X.R., Zhong, G.F., Hu, W.H., Sheng, G.Q. (2011). Different effects of scopolamine on the retrieval of spatial memory. *Behavioural Brain Research*, 221, 604-609.
- Humphreys, M.R., Reinberg, Y.E. (2005). Contemporary and emerging drug treatments for urinary incontinence in children. *Pediatric Drugs*, 7, 151-162.
- Ishida, T., Sato, T., Irifune, M., Tanaka, K., Hirate, K., Nakamura, N., Nishikawa, T. (2007). Inhibitory effect of cyclooxygenase inhibitors on the step-through passive avoidance performance in mice treated with NC-1900, an arginine-vasopressin fragment analog. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 29, 315-320.
- Iso, H., Simoda, S., Matsumaya, T. (2007). Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behavioural Brain Research*, 179, 90-98.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., Souza, M., Izquierdo, L.A. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393, 635-636.
- Izquierdo, I., Belvilaqua, L.R., Rossato, J.I., Boinini, J.S., Da Silva, W.C., Medina, J.H., Cammarota, M. (2006). The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotoxicity Research*, 10, 113-121.
-

- Izquierdo, I., McGaugh, J.L. (2000). Behavioural Pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology*, 11, 517-534.
- Izquierdo, I., Medina, J.H. (1997b). The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology*, 25, 1-9.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 1-11.
- Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Ardenghi, P.G., Pereira, P., Rodrigues, C., Choi, H., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2000a). Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behavioural Brain Research*, 111, 93-98.
- Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2000b). Novelty enhances retrieval of one-trial avoidance learning in rats 1 and 31 days after training unless the hippocampus is inactivated by different receptor antagonists and enzyme inhibitors. *Behavioural Brain Research*, 117, 215-220.
- Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna M.R.M., Cointio, A.S., Davide Silva T., Choi, H., Izquierdo, I. (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22, 269-288.
- Izquierdo, L.A., Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P.K., Medina, J.H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 9, 786-793.
- Jackson, D.M., Bengtsson, A., Johansson, C., Cortizo, L., Ross, S.B. (1994). Development of Tolerance to 8-OH-DPAT Induced Blockade of Acquisition of a Passive Avoidance Response. *Neuropharmacology*, 33, 1003-1009.
-

- Jafari-Sabet, M. (2006). NMDA receptor blockers prevent the facilitatory effects of post-training intra-dorsal hippocampal NMDA and physostigmine on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 169, 120-127.
- Jafari-Sabet, M., Khodadadnejad, M., Ghoraba, S., Ataee, R. (2014). Nitric oxide in the dorsal hippocampal area is involved on muscimol state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 117, 137-143.
- Janowski, D.S., el-Yousef, M.K., Davis, J.M., Sekerke, H.J. (1972). A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. *Lancet*, 2, 632-635.
- Jeltsch-David, H., Koenig, J., Cassel, J. (2008). Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: General data and focus on 5-HT_{1A} receptors of the medial septum. *Behavioural Brain Research*, 195, 86-97.
- Johnson, J.M., Bailey, J.M., Johnson, J.E., Newland, M.C. (2010). Performance of BALB/c and C57BL/6 mice under an incremental repeated acquisition of behavioral chains procedure. *Behavioural Processes*, 84, 705-714.
- Juraska, J.M. (1990). Gender differences in the dendritic tree of granule neurons in the hippocampal dentate gyrus of weaning age rats. *Developmental Brain Research*, 53, 291-294.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294, 1030-1038.
- Kandel, E.R., Jessell, T.M., Schwartz, J.H. (1997). *Neurociencia y conducta*. Madrid: Prentice Hall.
- Kennedy, G.C., Mitra, J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *Journal of Physiology*, 166, 408-418.
-

- Kim, J.J., Jung, M.W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 46, 142-145.
- Klein, S.B. (1994). *Aprendizaje. Principios y aplicaciones*. Madrid: McGrawHill.
- Klinkenberg, I., Blokland, A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34, 1307-1350.
- Kolb, B., Walkey, J. (1987). Behavioural and anatomical studies of the posterior parietal cortex in the rat. *Behavioural Brain Research*, 23, 127-145.
- Konradi, C., Heckers, S. (2001). Antipsychotic drugs and neuroplasticity: insights into the treatment and neurobiology of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 50, 729- 742.
- Kornstein, S. (1997). Gender differences in depression: implications for treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*, 58, 2-18.
- Kopf, S.R., Baratti, C.M. (1996). Effects of posttraining administration of glucose on retention of a habituation response in mice: participation of a central cholinergic mechanism. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63(3), 253-260.
- Lalumiere, R.T., Nawar, E.M., McGaugh, J.L. (2005). Modulation of memory consolidation by the basolateral amygdale or nucleus accumbens shell requires concurrent dopamine receptor activation in both brain regions. *Learning and Memory*, 12, 296-301.
- Lalumiere, R.T., Nguyen, L.T., McGaugh, J.L. (2004). Post-training intrabasolateral amygdale infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. *European Journal of Neuroscience*, 20, 2804-2810.
- Lam, T.T., Leranth, C. (2003). Role of the medial septum diagonal band of Broca cholinergic neurons in oestrogen-
-

induced spine synapse formation on hippocampal CA1 pyramidal cells of female rats. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1997-2005.

- Lana, D., Cerbai, F., Di Russo, J., Boscaro, F., Gianetti, A., Petkova-Kiroba, P., Pugliese, A.M., Giovannini, M.G. (2013). Hippocampal long term memory: Effect of the cholinergic system on local protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 246-257.
- Lavenex, P., Amaral, D.G. (2000). Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 10, 420-430.
- Lewin, N.A. (1994). Physostigmine salicylate. En L.R. Goodfrank, N.E. Flomenbaum, N.A. Lewin, y cols. (Eds.) *Goldfrank's Toxicologic Emergencies* (pp. 607-608). New York: McGraw-Hill.
- Little, P.J., Adams, M.L., Cicero, T.J. (1992). Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the developing male rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263, 1056-1061.
- Liu, T.L., Liang, K.C. (2009). Posttraining infusion of cholinergic drugs into the ventral subiculum modulated memory in an inhibitory avoidance task: Interaction with the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91, 235-242.
- Lo, A.L., De Maeyer, J.H., Vermaercke, B., Callaerts-Vegh, Z., Schuurkes, J.A.J., D'Hooge, R. (2014). SSP-002392, a new 5-HT₄ receptor agonist, dose-dependently reverses scopolamine-induced learning and memory impairments in C57Bl/6 mice Adrian C. *Neuropharmacology*, 85, 178-189.
- Loy, R., Sheldon, R.A. (1987). Sexually dimorphic development of cholinergic enzymes in the rat septohippocampal system. *Development Brain Research*, 34, 156-160.
- Lüttgen, M., Elvander, E., Madjid, N., Ögren, S.O. (2005). Analysis of the role of 5-HT_{1A} receptors in spatial and aversive learning in the rat, *Neuropharmacology*, 48, 830-852.
-

- Mach, M., Grubbs, R.D., Price, W.A., Paton, S.J., Lucot J.B. (2004). Behavioral changes after acetylcholinesterase inhibition with physostigmine in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 79, 533-540.
- Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation- a decade of progress?. *Science*, 285, 1870-1874.
- Malmberg-Aiello, P., Ipponi, A., Bartolini, A., Schunack, W. (2000). Antiamnesic effect of metoprine and of selective histamine H1 receptor agonists in a modified mouse passive avoidance test. *Neuroscience Letters*, 288, 1-4.
- Maren, S. (1999). Long-term potentiation in the amygdale: a mechanism for emotional learning and memory. *TINS*, 22, 561-567.
- Maren, S. (2005). Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdale. *Neuron*, 47, 783-786.
- Marisco, P.C., Carvalho, F.B., Rosa, M.M., Girardi, B.A., Gutierrez, J.M., Jaques, J.A.S., Salla, A.P., Pimentel, V.C., Schetinger, M.R.C., Leal, D.B.R., Mello, C.F., Rubin, M.A. (2013). Piracetam Prevents Scopolamine-Induced Memory Impairment and Decrease of NTPDase, 5'-Nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities. *Neurochemical Research*, 38, 1704-1714.
- Mathis, C., Paul, S.M., Crawley, J.N. (1994). The neurosteroid pregnenolone sulphate blocks NMDA antagonistinduced deficits in a passive avoidance memory task. *Phychopharmacology*, 116, 201-206.
- Matynia, A., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J. (2001). Weaving the molecular and cognitive strands of memory. *Neuron*, 32, 557-559.
- Martényi, F., Dossenbach, M., Mraz, K., Metcalfe, S. (2001). Gender differences in the efficacy of fluoxetine and maprotiline in depressed patients: a double-blind trial of antidepressants with serotonergic or norepinephrine reuptake inhibition profile. *European Neuropsychopharmacology*, 11, 227-232.
-

- Martos, A.J., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., Arenas, M.C. and Parra, A. (1999). Efectos de la fisostigmina y de la nicotina sobre la inmovilidad aprendida en la prueba de natación forzada. *Psicothema*, 11, 631-639.
- Maswood, S., Stewart, G., Uphouse, L. (1995). Gender and estrous cycle effects of the 5-HT1A agonist, 8-OH-DPAT, on hypothalamic serotonin. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 51, 807-813.
- McGaugh, J.L. (1989). Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Research Bulletin*, 23, 339-345.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory: A century of consolidation. *Science*, 287, 248-251.
- McGaugh, J.L., Izquierdo, I. (2000). The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends In Pharmacological Sciences*, 21, 208-210.
- McGaugh, J.L., Cahill, L., Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdale in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 13508-13514.
- Meck, W.H., Smith, R.A., Williams, C.L. (1989). Organizational changes un cholinergic activity and enhanced visuospatial memory as a function of choline administered prenatally or postnatally or both. *Behavioural Neuroscience*, 103, 1234-1241.
- Medina, H.M., Schröder, N., Izquierdo, I. (1999). Two different properties of short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 119-121.
- Meguro, K.I., Yanai, K., Sakai, N., Sakurai, E., Maeyama, K., Sasaki, H., Watanabe, T. (1995). Effects of thioperamide, a histamine H3 antagonist, on step-through passive avoidance response and histidine decarboxylase activity in senescence-accelerated mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 50, 321-325.
-

- Milekic, M.H., Alberine, C.M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, 36, 521-525.
- Misane, I., Johansson, C., Ögren, S.O. (1998a). Analysis of the 5-HT_{1A} receptor involvement in passive avoidance in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 125, 499-509.
- Misane, I., Ögren, S.O. (2000). Multiple 5-HT Receptors in Passive Avoidance Comparative Studies of p-Chloroamphetamine and 8-OH-DPAT. *Neuropsychopharmacology*, 22, 168-190.
- Misane, I., Razani, H., Wang, F.H., Jansson, A., Fuxe, K., Ögren, S.O. (1998b). In vivo modulation of 5-HT_{1A} receptor-mediated response by the neuropeptide galanin in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 10, 1230-1240.
- Misik, J., Vanek, J., Musilek, K., Kassa, J. (2014). Cholinergic antagonist 2-quinuclidinyl benzilate- Impact on learning and memory in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 266, 193-200.
- Monleón, S., Casino, A., Vinader-Caerols, C., Arenas MC. (2001). Acute effects of fluoxetine on inhibitory avoidance consolidation in male and female OF1 mice. *Neuroscience Research Communications*, 28, 123-130.
- Monleón, S., Parra, A. (1997). Sex differences in escape-avoidance behavior in BALB/c mice after haloperidol administration. *Medical Science Research*, 25, 565-567.
- Monleón, S., Urquiza, A., Arenas, M.C., Vinader-Caerols, C., Parra, A. (2002). Chronic administration of fluoxetine impairs inhibitory avoidance in male but not female mice. *Behavioural Brain Research*, 136, 483-488.
- Monleón, S., Urquiza, A., Vinader-Caerols, C., Parra, A. (2009). Effects of oxotremorine and physostigmine on the inhibitory avoidance impairment produced by amitriptyline in male and female mice. *Behavioural Brain Research*, 205, 367- 371.
- Monleón, S., Vinader-Caerols, C., Arenas, M.C., Parra, A. (2008). Antidepressant drugs and memory: insights from
-

animal studies. *European Neuropsychopharmacology*, 18, 235-248.

- Morgado, I. (1998). Aprendizaje y memoria: conceptos, categorías y sistemas neurales. En J.M. Delgado, A. Ferrús, F. Mora, F.J. Rubia (Eds). *Manual de Neurociencia* (pp. 825-854). Madrid: Síntesis.
- Morris, R.G., Moser, E.I., Riedel, G., Martin, S.J., Sandin, J., Day, M., O'Carroll, C. (2003). Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity dependent synaptic plasticity in memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358, 773-786.
- Morris, J.S., Öhman, A., Dolan, R.J. (1998). Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature*, 393, 467-470.
- Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews*, 41, 268-287.
- Nadel, L., Bohbot, V. (2001). Consolidation of memory. *Hippocampus*, 11, 56-60.
- Nadel, L., Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 7, 217-227.
- Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. (2000a). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722-726.
- Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Daszuta, A., Bjorklund, A. (1988). Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produces severe deficits in spatial learning task in the rat. *Brain Research*, 453, 235-246.
- Normile, H.J., Altman, H.J. (1992). Effects of combined acetylcholinesterase inhibition and serotonergic receptor blockade on age-associated memory impairments in rats. *Neurobiological Aging*, 13, 735-740.
-

- Noble, R.E. (2005). Depression in women. *Metabolism*, 54, 49-52.
- Nyberg, L., Tulving, E. (1996). Classifying human long-term memory: evidence from converging dissociations. *European Journal of Cognitive Psychology*, 8, 163-183.
- Olfson, M., Klerman, G.L. (1993). Trends in the prescription of antidepressants by office-based psychiatrists. *Annual Journal of Psychiatry*, 150, 571-577.
- Ogasawara, T., Itoh, Y., Tamura, M., Mushiroy, T., Ukai, Y., Kise, M., Kimura, K. (1999). Involvement of cholinergic and GABAergic systems in the reversal of memory disruption by NS-105, a cognition enhancer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 64, 41-52.
- Ögren, S.O., Eriksson, T.M., Elevander-Tottie, E., D'Addario, C., Ekström, J.C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J., Stiedl, O. (2008). The role of 5HT(1A) receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 195, 54-77.
- Ohno, M., Kishi, A., Watanabe, S. (1996). Effect of cholinergic activation by physostigmine on working memory failure caused in rats by pharmacological manipulation of hippocampal glutamatergic and 5-HTergic neurotransmission. *Neuroscience Letters*, 217, 21-24.
- Ohno, M., Watanabe, S. (1996). Interactive processing between glutamatergic and cholinergic systems involved in inhibitory avoidance learning of rats. *European Journal of Pharmacology*, 312, 145-147.
- Overton, D.A. (1974). Experimental methods for the study of state-dependent learning. *Federation Proceedings*, 54, 1800-1813.
- Overton, D.A. (1984). State dependent learning and drug discriminations. En L.L. Iversen, S.D. Iversen, S.H. Snyder, (Eds.) *Handbook of Psychopharmacology* (pp. 59-127). New York: Plenum Press.
- Owens, M.J., Morgan, W.N., Plott, S., Paizanis, E. Hamon, M., Lanfumey, L. (2007). Hippocampal neurogenesis,
-

depressive disorders, and antidepressant therapy. *Neural Plasticity*, 73754-73760.

- Pacher, P., Kecskemeti, V. (2004). Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns?. *Current Pharmaceutical Design*, 10(20), 2463-2475.
- Paizanis, E., Hamon, M., Lanfumey, L. (2007). Hippocampal neurogenesis, depressive disorders, and antidepressant therapy. *Neural Plasticity*, 2007, 1-7.
- Paratcha, G., Furman, M., Bevilaqua, L., Cammarota, M., Vianna, M., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., Medina, J. (2000). Involvement of hippocampal PKC β isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Research*, 855, 199-205.
- Parra, A. (2003). A common role for psychotropic medications: memory impairment. *Medical Hypotheses*, 60, 133-142.
- Parra, A., Arenas, M.C., Monleón, S., Vinader-Caerols, C., Simón, V.M. (1999). Sex differences in the effects of neuroleptics on escape-avoidance behavior in mice: a review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 813-820.
- Parra, A., Everss, E., Arenas, M.C., Vinader-Caerols, C., Monleón, S. (2006). Amitriptyline administered after consolidation of inhibitory avoidance does not affect memory retrieval. *Psicothema*, 18, 514-518.
- Parra, A., Everss, E., Monleón, S., Vinader-Caerols, C., Arenas, M.C. (2002). Effects of acute amitriptyline administration on memory, anxiety and activity in male and female mice. *Neuroscience Research Communications*, 31, 135-144.
- Parra, A., Ferrer-Añó, A., Fuentes, C., Monleón, S., Vinader-Caerols, C. (2010). Effects of co-administration of amitriptyline and fluoxetine on inhibitory avoidance in mice. *Behavioural Brain Research*, 214, 343-348.
- Parra, A., Monleón, S., Arenas, M.C., Vinader-Caerols, C. (2000). Effects of acute and chronic maprotiline
-

administration on inhibitory avoidance in male mice. *Behavioural Brain Research*, 109, 1-7.

- Parra, A., Rama, E., Vinader-Caerols, C., Monleón, S. (2013). Inhibitory avoidance in CD1 mice: Sex matters, as does the supplier. *Behavioural Processes*, 100, 36-39.
- Parra, A., Vinader-Caerols, C., Ferrer-Añó, A., Urquiza, A., Monleón, S. (2009). The effect of amitriptyline on inhibitory avoidance in mice is dose-dependent. *Psicothema*, 21, 528-530.
- Passani, M.B., Bacciottini, L., Mannaioni, P.F., Blandina, P. (2000). Central histaminergic system and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24, 107-113.
- Patel, T.D., Zhou, F.C. (2005). Ontogeny of 5-HT_{1A} receptor expression in the developing hippocampus. *Developmental Brain Research*, 157, 42-57.
- Pavone, F., Fagioli, S., Castellano, C. (1993). Effects of oxotremorine on inhibitory avoidance behavior in two inbred strains of mice: interaction with 5-methoxy-NN-dimethyltryptamine. *Psychopharmacology*, 112, 249-252.
- Pinel, J.P.J. (2001). *Biopsicología* (4^a ed.). Madrid: Pearson Education.
- Piri, M., Rostampour, M., Nasehi, M., Zarrindast, M.R. (2013). Blockade of the dorsal hippocampal dopamine D1 receptors inhibits the scopolamine-induced state-dependent learning in rats. *Neuroscience*, 252, 460-467.
- Pittenger, C., Duman, R.S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, 88-109.
- Pollock, M. (1997). Gender differences in psychotropic drug metabolism. *Psychopharmacology Bulletin*, 33, 235-241.
- Posner, M. I. (1978). *Chronometric explorations of mind*, Hillsdale: Erlbaum.
- Power, A.E., Vazdarjanova, A., McGaugh, J.L. (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory
-

consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 178-193.

Pritchett-Corning, K., Girod, A., Avellaneda, G., Fritz, P.E., Chou, S., Brown, M.J. (2011). *Handbook of Clinical Signs in rodents and rabbits*. Charles River, Wilmington: M.A.

Purves, D. (2008). *Neurociencias* (3^a ed.). Madrid: Editorial Panamericana.

Quartermain, D., Leo, P. (1988). Strength of scopolamine-induced amnesia as a function of time between training and testing. *Behavioral Neural Biology*, 50, 300-310.

Quevedo, J., Vianna, M., Zanatta, M.S., Roesler, R., Izquierdo, I., Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J.A. (1997). Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not the caudate nucleus in memory. *Behavioural Pharmacology*, 8, 713-717.

Quirarte, G.L., Cruz-Morales, S.E., Cepeda, A., García-Montañez, M., Roldán-Roldán, G., Prado-Alcalá, R.A. (1994). Effects of central muscarinic blockade on passive avoidance: anterograde amnesia, state dependency, or both?. *Behavioral Neural Biology*, 62, 15-20.

Reber, P.J., Knowlton, B.J. y Squire, L.R. (1996). Dissociable properties of memory systems: differences in the flexibility of declarative and nondeclarative knowledge. *Behavioral and Neuroscience*, 110, 861-871.

Richelson, E. (2001). Pharmacology of antidepressants. *Mayo Clinic Proceedings*, 76, 511-527.

Richelson, E. (2003). Interactions of antidepressants with neurotransmitter transporters and receptors and their clinical relevance. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64, 5-12.

Ricceri, L., Calamandrei, G., Berger-Sweeney, J. (1997). Different effects of postnatal day 1 versus 7 192 immunoglobulin G-saporin lesions on learning, exploratory behaviors and neurochemistry in juvenile rats. *Behavioural Neuroscience*, 111, 1292-1302.

- Riedel, W.J., van Praag, H.M. (1995). Avoiding and managing anticholinergic effects of antidepressants. *CNS Drugs*, 3, 245-259.
- Riekkinen, Jr., P., Sirvio, J., Valjakka, A., Miettinen, R., Riekkinen, P. (1991). Pharmacological consequences of cholinergic plus serotonergic manipulations. *Brain Research*, 552, 23-26.
- Riekkinen, M., Riekkinen, Jr., P. (1994). Effects of THA and physostigmine on spatial navigation and avoidance performance in mecamylamine and PCPA-treated rats. *Experimental Neurology*, 125, 111-118.
- Roldán, G., Bolaños-Badillo, E., González-Sánchez, H., Quirarte, G.L., Prado-Alcalá, R.A. (1997). Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience Letters*, 230, 93-96.
- Roldán, G., Cobos-Zapíaín, G., Quirarte, G.L., Prado-Alcalá, R.A. (2001). Dose- and time-dependent scopolamine-induced recovery of an inhibitory avoidance response after its extinction in rats. *Behavioural Brain Research*, 121, 173-179.
- Rolls, E.T. (2000). Memory systems in the brain. *Annual Review of Psychology*, 51, 599-630.
- Roozendaal, B. (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 213-238.
- Roozendaal, B., McGaugh, J.L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 1-8.
- Rosenbaum, R.S., Winocur, G., Moscovitch, M. (2001). New views in old memories: reevaluating the role of the hippocampal complex. *Behavioural Brain Research*, 127, 183-197.
-

- Rosatto, J.I., Bonini, J.S., Coitinho, A., Vianna, M.R., Medina, J.H., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2004). Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. *Behavioural Neuroscience*, 118, 563-568.
- Rubin, M.A., Boemo, R.L., Jurach, A., Rojas, D.B., Zanolla, G.R., Obregon, A.D.C., Souza, D.O., Mello, C.F. (2000). Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioural Pharmacology*, 11, 57-61.
- Rubin, M.A., Stiegemeier, J.A., Volkweir, M.A., Oliveira, D.M., Fenili, A.C., Boemo, R.L., Jurach, A., Mello, C.F. (2001). Intra-amygdala spermidin administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology*, 423, 35-39.
- Rush, D.K. (1988). Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behavioral Neural Biology*, 50, 255-74.
- Sansone, M., Battaglia, M., Pavone, F. (1999). Attenuation by nimodipine of amitriptyline-induced avoidance impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62, 613-618.
- Sansone, M., Castellano, C., Palazzesi, S., Battaglia, M., Ammassari-Teule, M. (1993). Effects of oxiracetam, physostigmine, and their combination on active and passive avoidance learning in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 451-455.
- Santucci, A.C., Kanof, P.D., Haroutunian, V. (1989). Effect of physostigmine on memory consolidation and retrieval processes in intact and nucleus basalis-lesioned rats. *Psychopharmacology*, 99, 70-74.
- Sapolsky, R.M. (2000). The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological Psychiatry*, 48, 755-765.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, 7, 284-301.
-

- Sapronov, N.S., Fedotova, Y.O., Losev, N.A. (2006). Combined Administration of NAN-190 and 17 β -Estradiol Abolishes the Amnesic Effect of Scopolamine in Middle-Aged Ovariectomized Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 142, 80-82.
- Schafe, G.E., LeDoux, J.E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in The amygdale. *Journal of Neuroscience*, 20, RC96.
- Schatzberg, A.F. (2000). New indications for antidepressants. *Journal of Clinical Psychiatry*, 61, 9-17.
- Schneider, A.M., Wilkins, E., Firestone, A., Everbach, E.C., Naylor, J.C., Simson, P.E. (2003). Enhanced retention in the passive-avoidance task by 5-HT(1A) receptor blockade is not associated with increased activity of the central nucleus of the amygdale. *Learning and Memory*, 10, 394-400.
- Seminerio, M.J., Hansen, R., Kaushal, N., Zang, H., McCurdy, C.R., Matsumoto, R.R. (2013). The evaluation of AZ66, an optimized sigma receptor antagonist, against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and memory impairment in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16, 1033-1044.
- Sempere, E., Salazar, J., Palop, V., Vicens, C. (2014). Evolución de la utilización de antidepressivos, ansiolíticos e hipnóticos en la Comunitat Valenciana. Período 2000-2010. *Atención Primaria*, 46 (8), 416-425.
- Senda, T., Matsuno, K., Kobayashi, T., Mita, S. (1997). Reduction of the scopolamine-induced impairment of passive-avoidance performance by σ receptor agonist in mice. *Physiology and Behavior*, 61, 257-264.
- Seyedabadi, M., Fakhfouri, G., Ramezani, V., Mehr, S.E., Rahimian, R. (2014). The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Experimental Brain Research*, 232, 723-738.
-

- Shapiro, B.H., Agrawal, A.K., Pampori, N.A. (1995). Gender differences in drug metabolism regulated growth hormone. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*, 27, 9-20.
- Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A., Gado, M.H. (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss on medically healthy women recurrent major depression. *Journal of Neuroscience*, 19, 5034-5043.
- Shulz, D.E. (2000). Memories of memories: The endless alteration of the engram. *Neuron*, 28, 25-29.
- Siddiqui, A., Shah, B.H. (1997). Neonatal androgen manipulation differentially affects the development of monoamine systems in rat cerebral cortex, amygdala and hypothalamus. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 98, 247-252.
- Simpkins, J.W., Green, P.S., Gridley, K.E., Singh, M., de Fiebre, N.C., Rajakumar, G. (1997). Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine*, 103(3a), 19-25.
- Sindrup, S.H., Otto, M., Finnerup, N.B., Jensen, T.S. (2005). Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, 399-409.
- Smith, R.D., Kistler, M.K., Cohen-Williams, M., Coffin, V.L. (1996). Cholinergic improvement of a naturally-occurring memory deficit in the young rat. *Brain Research*, 707, 13-21.
- Somani, S.M., Husain, K., Jagannathan, R. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of carbamates under physical stress. En S.M. Somani, J.A. Romano, (Eds.) *Chemical warfare agents: toxicity at low levels*. (pp. 166 - 177) Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G. (1980). *Statistical Methods*. Ames: The Iowa State University Press.
- Souza, F.A., Sanchis-Segura, C., Fukada, S.Y., Bortoli, V.C., Zangossi, H.J.R., Oliveira, A.M. (2004). Intracerebroventricular effects of angiotensin II on a step-
-

- through passive avoidance task in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81, 100-103.
- Souza, M.M., Mello Souza, T., Vinade, E.R., Rodrigues, C., Choi, H.K., Dedavid Silva, T.L., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2002). Effects of posttraining treatments in the posterior cingulate cortex on short- and long-term memory consolidation for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77, 202-210.
- SPSS para Windows 7. 2014. Versión 22.0.0. Chicago: SPSS Inc. [programa informático en CD-ROM]. Disponible en SPSS Inc. Página web de SPSS disponible en: <http://www.spss.com/>.
- Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Review*, 99, 195-231.
- Squire, L.R., Clark, R.E., Knowlton, B.J. (2001). Retrograde amnesia. *Hippocampus*, 11, 50-55.
- Squire, L.R., Knowlton, B. y Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Annual Review of Psychology*, 44, 453-495.
- Squire, L.R. y Zola, S. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*, 93, 13515-13522.
- Stahl, S.M. (1998). Basic psychopharmacology of antidepressants. Part 1: Antidepressants have seven distinct mechanism of action. *Journal of Clinical Psychiatry*, 59, 5-14.
- Stahl S.M. (2002). *Psicofarmacología esencial: bases neurocientíficas y aplicaciones clínicas*. Barcelona: Ariel.
- Stahl, S.M. (2008). *Stahl's essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications (3rd ed.)*, New York: Cambridge University Press.
- Stancampiano, R., Cocco, S., Cugusi, C., Sarais, L., Fadda, F. (1999). Serotonin and Acetylcholine release response in the
-

rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience*, 89, 1135-1143.

- Stark, P., Fuller, R.W., Wong, D.T. (1985). The pharmacologic profile of fluoxetine. *Journal of Clinical Psychiatry*, 46, 7-13.
- Steckler, T., Sahgal, A. (1995). The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behavior. *Behavioural Brain Research*, 67, 165-199.
- Stefanacci, L., Bufalo, E.A., Schmolck, H., Squire, L.R. (2000). Profound amnesia after damage to the medial temporal lobe: a neuroanatomical and neuropsychological profile of patient E.P. *Journal of Neuroscience*, 20, 7024-7036.
- Sutcliffe, J.S. (2011). Female rats are smarter than males: influence of test, oestrogen receptor subtypes and glutamate. En J.C. Neill, J. Kulkarni (Eds.) *Biological Differences in Psychopharmacology, Current Topics in Behavioral Neurosciences* 8.
- Suzuki, W.A., Clayton, N.S. (2000). The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 168-773.
- Takahashi, K., Yamamoto, M., Suzuki, M., Ozawa, Y., Yamaguchi, T., Andoh, H., Ishikawa, K., (1995). Effects of cerebral metabolic enhancers on brain function in rodents. *Current Therapeutic Research*, 56, 478-485.
- Tanabe, S., Shishido, Y., Furushiro, M., Kado, K., Hashimoto, S., Yokokura, T., Ohsawa, T. (1997). Facilitation of passive avoidance response by newly synthesized cationized arginine vasopressin fragment 4-9 in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57, 251-256.
- Taubenfeld, S.M., Wiig, K.A., Bear, M.F., Alberini, C.A. (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 2, 309-310.
- Taylor, P. (2001). Anticholinesterase agents, En, J.G. Hardman, L.E. Limbird, A.G. Gilman (Eds.), *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics (10th ed.)* (pp. 175-191). New York: McGraw-Hill.
-

- Thal, L.J., Ferguson, J.M., Mintzer, J., Raskin, A., Targum, S.D. (1999). A 24-week randomized trial of controlled-release physostigmine in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 52, 1146-1152.
- Thal, L.J., Schwartz, G., Sano, M., Weiner, M., Knopman, D., Harrell, L., Bodenheimer, S., Rossor, M., Philpot, M., Schor, J., Goldberg, A. (1996). A multicenter double-blind study of controlled-release physostigmine for the treatment of symptoms secondary to Alzheimer's Disease. *Neurology*, 47, 1389-1395.
- Thompson, P.J. (1991). Antidepressants and memory: a review. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 6, 79-90.
- Thompson, R.F. y Kim, J.J. (1996). Memory system in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 13438-13444.
- Thomson, P.L.M. (2005). Diccionario de especialidades farmacéuticas (DEF). Edición 51, México. Available from: <http://www.thomsonplm.com/>.
- Torras, M., Portell, I., Morgado, I. (2001). The amygdaloid body: functional implications. *Revista de Neurobiología*, 33, 471-476.
- Tricklebank, M.D., Forler, C., Fozard, J.R. (1984). The involvement of subtypes of the 5-HT_{1A} receptor and catecholaminergic system in the behavioral response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 106, 271-282.
- Tsukahara, T., Iihara, K., Hashimoto, N., Nishijima, T., Taniguchi, T. (1998). Increases in levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and its promoters after transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurochemistry International*, 33, 201-207.
- Ulak, G., Göçmez, S., Erden, F., Tanyeri, P., Utkan, T., Yildiz, F., Mutlu, O., Gacar, N., (2006). Chronic administration of fluoxetine or venlafaxine induces memory deterioration in
-

an inhibitory avoidance task in rats. *Drug Development Research* 67, 456– 461.

- Unmegaki, H., Muñoz, J., Meyer, R.C., Spangler, E.L., Yoshimura, J., Ikari, H., Iguchi, A., Ingram, D.K. (2001). Involvement of dopamine D₂ receptors in complex maze learning and acetylcholine release in ventral hippocampus of rats. *Neuroscience*, 103(1), 27-33.
- Urquiza, A. (2007). *Estudio de la intervención del sistema colinérgico en el efecto producido por la amitriptilina en una tarea de evitación inhibitoria en ratones machos y hembras*. (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia. España.
- Vanderwolf, C.H. (1987). Near total loss of learning and memory as a result of combined cholinergic and serotonergic blockade in the rat. *Behavioural Brain Research*, 23, 43-57.
- Vázquez, F.L., Blanco, V., Torres, A., Otero, P., Hermida, E. (2014). La eficacia de la prevención indicada de la depresión: una revisión. *Anales de psicología*, 30(1), 9-24.
- Vianna, M.R.W, Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Medina, J.H., Izquierdo, I. (1999). Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. *Behavioural Pharmacology*, 10, 223-227.
- Vianna, M.R.W, Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2001). Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 233-240.
- Vianna, M.R.W, Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Walz, R., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2000). Short- and long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72, 353-364.
- Vinader-Caerols, C., Parra, A., Monleón, S. (2012). Effects of antidepressants on inhibitory avoidance in mice: a review.
-

En: R-B. Lu (Ed.), *Effects of antidepressants* (pp. 23-46). Rikeka: Intech.

- Walz, R., Roesler, R., Barros, D.M., Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Quevedo, J., Choi, H., Neto, W.P., DeDavid e Silva, T.L., Medina, J.H., Izquierdo, I. (1999). Effects of amitogen-activated protein kinase inhibitor into the hippocampus or entorrinal cortex on short- and long-term retention of inhibitory avoidance. *Behavioural Pharmacology*, 10, 723-730.
- Walz, R., Roesler, R., Reinke, A., Martins, M.R., Quevedo, J., Izquierdo, I. (2005). Differential role of entorrhinal and hippocampal nerve growth factor in short- and long-term memory modulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 55-58.
- Wickelgren, I. (1997). Getting a grasp on working memory. *Science*, 275, 1580-1582.
- Wilensky, A.E., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. (2000). The amygdale modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 20, 7059-7066.
- Wilson, W.J., Cook, J.A. (1994). Cholinergic manipulations and passive avoidance in the rat: effects on acquisition and recall. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 54, 377-391.
- Wise, P.M., Dubal, D.B., Wilson, M.E., Rau, S.W., Böttner, M., Rosewell, K.L. (2001). Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. *Brain Research Reviews*, 37, 313-319.
- Witkin, J. M., Overshiner, C., Li, X., Catlow, J.T., Wishart, G.N., Schober, D.A., Heinz, B.A., Nikolayev, A., Tolstikov, V.V., Anderson, W.H., Higgs, R.E., Kuo, M.S., Felder, C.C. (2014). M1 and M2 Muscarinic Receptor Subtypes Regulate Antidepressant-Like Effects of the Rapidly Acting Antidepressant Scopolamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351, 448-446.
-

- Wood, E.R., Dudchenko, P.A., Robitsek, R.J., Eichenbaum, H. (2000). Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron*, 27, 623-633.
- Yonkers, K.A., Kando, J.C., Cole, J.O., Blumenthal, S. (1992). Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic medication. *American Journal of Psychiatry*, 149, 587-595.
- Yoshida, S., Suzuki, N. (1993). Anti-amnesic and cholinomimetic side-effects of the cholinesterase inhibitors, physostigmine, tacrine and NIK-247 in rats. *European Journal of Pharmacology*, 250(1), 117-124.
- Yousefi, B., Nasehi, M., Khakpai, F., Zarrindast, M.R. (2012). Possible interaction of cholinergic and GABAergic systems between MS and CA1 upon memory acquisition in rats. *Behavioural Brain Research*, 235, 231-243.
- Zanatta, M.S., Schaeffer, E., Schmitz, P.K., Medina, J.H., Quevedo, J., Quillfeldt, J.A., Izquierdo, I. (1996). Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behavioural Pharmacology*, 7, 341-347.
- Zarrindast, M.R., Bakhsha, A., Rostami, P., Shafaghi, B. (2002). Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 16, 313-319.
- Zarrindast, M.R., Khodjastehfar, E., Oryan, S., Torkaman-Boutorabi, A. (2001) Baclofen-impairment of memory retention in rats: possible interaction with adrenoceptors mechanism(s). *European Journal of Pharmacology*, 411, 283-288.
- Zarrindast, M.R., Lahiji, P., Shafaghi, B., Sadegh, M. (1998). Effects of GABAergic drugs on Physostigmine-induced improvement in memory acquisition of passive avoidance learning in mice. *General Pharmacology*, 31, 81-86.
-

- Zarrindast, M.R., Lahiji, P., Shafaghi, B., Sadegh, M. (1998). Effects of GABAergic Drugs on Physostigmine-Induced Improvement in Memory Acquisition of Passive Avoidance Learning in Mice. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31, 81-86.
- Zarrindast, M.R., Sadegh, M., Shafaghi, B. (1996). Effects of nicotine on memory retrieval in mice. *European Journal of Pharmacology*, 295, 1-6.
-

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Las fuentes de financiación para la realización de esta tesis han sido el “Ministerio de Ciencia e Innovación” (Proyecto PSI2008-0616/PSIC) y la “Generalitat Valenciana” (Proyecto PROMETEO/2011/48).
