
Estudios funcionales en aprendizaje y memoria

M.J. Ramírez

Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra, Pamplona.

Resumen: *En este trabajo se describen algunos de los experimentos realizados en nuestro laboratorio con dos de los paradigmas conductuales más utilizados a día de hoy para valorar el aprendizaje y la memoria en el animal de experimentación: el laberinto acuático de Morris y la prueba de reconocimiento de nuevo objeto. Se intentará llevar a cabo una valoración crítica de su utilidad, y se comentarán los diversos factores que hay que tener en cuenta a la hora de escoger un modelo concreto. Así, en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer, en los cuales se imita la hipofunción colinérgica característica, bien mediante antagonistas muscarínicos, como la escopolamina, o mediante la producción de una lesión selectiva colinérgica, se observa un déficit cognitivo en la prueba del laberinto acuático de Morris. En modelos experimentales de depresión (separación materna) se pueden observar, en la prueba de reconocimiento de nuevo objeto, déficit cognitivos asociados. Los estudios funcionales de aprendizaje y memoria que describimos pueden utilizarse para evaluar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de los déficit cognitivos característicos o asociados a diversas enfermedades neuropsiquiátricas.*

Palabras clave: Laberinto acuático de Morris – Reconocimiento de nuevo objeto – Enfermedad de Alzheimer – Escopolamina – Lesión selectiva colinérgica – Depresión – Separación materna – Mifepristona.

Introducción

Una de las características más importantes del ser humano es su capacidad de aprender y recordar. El aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos conocimientos sobre el mundo. La memoria es la retención o almacenamiento de esos conocimientos.

Hay enfermedades, como las demencias, caracterizadas por el deterioro cognitivo. En otras ocasiones, como en la depresión, los problemas de aprendizaje y memoria, aunque no son el signo característico de la enfermedad, la acompañan. En cualquier caso, son necesarios modelos animales que permitan el

estudio de los mecanismos etiopatogénicos que subyacen a los déficit cognitivos, y de sus posibles tratamientos farmacológicos.

En este trabajo se describen algunos de los experimentos realizados en nuestro laboratorio utilizando dos de las pruebas que actualmente más se usan para valorar el aprendizaje y la memoria en el animal de experimentación: el laberinto acuático de Morris y la prueba de reconocimiento de nuevo objeto. Se intentará llevar a cabo una valoración crítica de su utilidad, y comentaremos los factores que hay que tener en cuenta a la hora de escoger un modelo concreto. El caso de los antagonistas de los receptores 5-HT₆ es un ejemplo reciente

de cómo la elección del paradigma funcional, e incluso del protocolo utilizado, lleva a importantes diferencias en los resultados. Así, la administración de Ro 04-6790, un antagonista 5-HT₆, mejora la retención en la prueba del laberinto acuático de Morris¹ y revierte el déficit cognitivo inducido por escopolamina en el *autoshaping task*.² Otros dos antagonistas 5-HT₆, SB-399885 y SB-271046, han mostrado su capacidad de mejorar el reconocimiento de objetos³⁻⁵ y la retención en el laberinto acuático de Morris.⁶ Sin embargo, estos compuestos fueron incapaces de alterar la adquisición en esta misma prueba. En la prueba de la evitación pasiva, SB-271046 revirtió los déficits cognitivos inducidos por escopolamina.⁷ Por el contrario, Russell y Dias⁸ y Lindner y cols.⁹ no pudieron conseguir que Ro 04-6790 y SB-271046 tuvieran un efecto favorable sobre la memoria en el *autoshaping task* ni en la retención en el laberinto acuático de Morris. Pérez-García y Meneses¹⁰ hicieron una interesante discusión sobre la fiabilidad de estos datos, señalando que diferencias metodológicas y en la elección de la prueba funcional podrían contribuir a esos resultados contradictorios.

Demencias: enfermedad de Alzheimer

En estos momentos, la enfermedad de Alzheimer supone la demencia primaria neurodegenerativa más frecuente. Comienza con una pérdida de memoria reciente, originada por un déficit para la formación de nuevos recuerdos, ocasionado por la precoz afectación del córtex entorrinal y el hipocampo, que origina un síndrome de desconexión entre las entradas sensoriales y los circuitos mnésicos cortico-subcorticales. En la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer se han implicado diversas alteraciones histopatológicas, entre las que cabe destacar una marcada atrofia de la corteza cerebral, con pérdida de neuronas corticales y subcorticales, la formación de las denominadas "placas seniles", consistentes en acumulaciones de proteína beta-amiloide (A β) con degeneraciones neuríticas, y ovillos neurofibrilares, compuestos de pares de fi-

lamentos helicoidales de proteína tau (τ) hiperfosforilada.¹¹ El deterioro cognitivo de los pacientes con Alzheimer presenta una correlación directa con la presencia y el número de estas formaciones, que son particularmente notables en el hipocampo y en zonas asociativas de la corteza cerebral.

El resultado final de muerte neuronal y pérdida de sinapsis es una serie de alteraciones neuroquímicas. En 1982 se planteó la "hipótesis colinérgica" para explicar la patogenia del Alzheimer.¹² Proponía que los déficits cognitivos de la enfermedad estaban causados por la disminución de la síntesis de acetilcolina y que, en consecuencia, si se aumentaba la concentración intrasináptica de este neurotransmisor se produciría una mejoría de estos enfermos. Hasta ahora, la única estrategia farmacoterapéutica (además de la memantina) que ha demostrado cierta eficacia para mejorar, siquiera sintomáticamente, al paciente que sufre enfermedad de Alzheimer, es la encaminada a evitar la degradación de la acetilcolina. Así, por ejemplo, los fármacos que inhiben de forma reversible la acetilcolinesterasa cerebral, como el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina, evitan la degradación del neurotransmisor, y de esta manera favorecen la elevación de las concentraciones de acetilcolina en la hendidura sináptica, facilitando los efectos del neurotransmisor.

De esta forma, los modelos animales de enfermedad de Alzheimer se han centrado tradicionalmente en imitar esa hipofunción colinérgica, y de hecho se ha considerado, exponiéndolo de forma simplificada, que cualquier fármaco capaz de aumentar la liberación de acetilcolina es un posible candidato para el tratamiento de la enfermedad. Para conseguir una hipofunción colinérgica se utilizan fundamentalmente dos métodos: la administración de antagonistas muscarínicos, como la escopolamina, y la producción de lesiones selectivas colinérgicas.

Laberinto acuático de Morris

El hombre puede reconocer estímulos que ha visto antes, realizar asociaciones entre ellos

e incluso orientarse de acuerdo con las relaciones que establece entre los estímulos. La mayoría de los animales también se orientan en el espacio para organizar sus conductas en relación con el entorno en que se encuentran en cada momento. El aprendizaje y la memoria espacial se relacionan con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente, lo que permite al organismo desenvolverse en el espacio. Esta memoria puede ser evaluada mediante modelos animales en que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible. El laberinto acuático es uno de los modelos más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores. En este laberinto, diseñado por Morris en 1984,¹³ los animales tienen que nadar para localizar una plataforma oculta siguiendo una serie de estímulos visuales externos con los que se orienta para conocer su posición exacta.

Este paradigma resulta de especial interés, puesto que no necesita de la privación de agua o comida ni de la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta. Existe amplia evidencia del importante papel que desempeña el hipocampo en la memoria declarativa en los humanos y en la espacial en los roedores. Por lo tanto, dada la afectación del hipocampo y de la memoria visuoespacial en la enfermedad de Alzheimer, esta prueba del laberinto acuático de Morris resulta de especial utilidad.

Déficit cognitivos inducidos por escopolamina

Puesto que la idea del déficit colinérgico en la enfermedad de Alzheimer es ampliamente aceptada, incluyendo que la activación de los receptores muscarínicos es necesaria para la formación de la memoria, los antagonistas colinérgicos muscarínicos, principalmente la escopolamina, se utilizan para reproducir alteraciones de la memoria y para el desarrollo de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad.

En el laberinto acuático de Morris, la escopolamina (0,2-0,6 mg/kg) provoca un déficit

cognitivo que se manifiesta por una incapacidad para encontrar la plataforma oculta, y con frecuencia, dependiendo de la dosis utilizada, por una natación tigmotóxica alrededor de la piscina.

EXPERIMENTO

El tratamiento combinado con ondansetrón (antagonista de los receptores 5-HT₃) y flumazenilo (antagonista de los receptores GABA_A por el lugar de fijación de las benzodiazepinas) revierte los déficit cognitivos inducidos por la escopolamina en el laberinto acuático de Morris.¹⁴

Basándonos en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación,¹⁵ en el cual demostramos que el tratamiento combinado con ondansetrón y flumazenilo producía una liberación de acetilcolina *in vivo* significativamente superior a la de los fármacos por separado, nos propusimos estudiar si este aumento en la liberación de acetilcolina se reflejaba funcionalmente en una prueba cognitiva.

EQUIPO Y PROTOCOLO UTILIZADO

El laberinto consistía en una piscina circular negra (145 cm diámetro × 55 cm altura), llena de agua a 22 °C. Una plataforma negra invisible, situada por debajo del nivel del agua, se mantenía en una posición fija en el cuadrante designado como C. La piscina estaba rodeada de figuras geométricas negras, que servían de pistas visuales externas.

El protocolo consistió en un primer día de habituación, en el cual las ratas llevaron a cabo un único pase, durante 60 segundos, sin la plataforma. En la fase de adquisición (días 2 y 3), las ratas llevaron a cabo seis pases por día (de 120 segundos) con la plataforma de escape en una posición fija. Se permitió nadar a las ratas libremente hasta encontrar la plataforma o hasta que pasaban los 120 segundos. Los resultados se expresaron como el tiempo de latencia para encontrar la plataforma. Los días 4 y 7 (días de retención, memoria a corto y largo plazo) se retiró la plataforma de la piscina. Se llevó a cabo un único pase

por día (60 segundos) y se midió el tiempo que el animal nadaba en el cuadrante donde antes estaba la plataforma.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

El tratamiento combinado con ondansetrón, 0,1 µg/kg, y flumazenilo, 10 mg/kg, es capaz de revertir totalmente el déficit cognitivo inducido por la escopolamina (Fig. 1). Estos resultados sugieren que la administración combinada de ondansetrón y flumazenilo podría suponer una nueva aproximación terapéutica en futuros estudios del tratamiento de los déficit cognitivos asociados a una hipofunción colinérgica.

Lesión selectiva colinérgica

Actualmente, para producir una lesión selectiva colinérgica se utiliza la toxina 192-IgG-saporina, formada por un anticuerpo monoclonal del receptor p75 (NGF) unido a la saporina, proteína inactivadora de los ribosomas. Dado

que la mayor parte de las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal son p75-positivas, la 192-IgG-saporina es la toxina disponible más selectiva para destruir la innervación colinérgica al hipocampo y la corteza de rata.¹⁶ La lesión se produce por inyección estereotáxica de la toxina en el núcleo colinérgico elegido, y la caracterización de la lesión se puede hacer por cuantificación de los marcadores colinérgicos: actividades acetilcolintransferasa o acetilcolinesterasa.

EXPERIMENTO

Estudio comparativo de los efectos sobre la memoria de una lesión selectiva colinérgica intracerebroventricular o localizada en el núcleo basal de Meynert.¹⁷

Los núcleos colinérgicos del telencéfalo basal proyectan y son origen de la innervación colinérgica a todo el cerebro. Una lesión selectiva colinérgica en el núcleo basal de Meynert priva de la innervación colinérgica a la corteza frontal, mientras que una lesión no selectiva

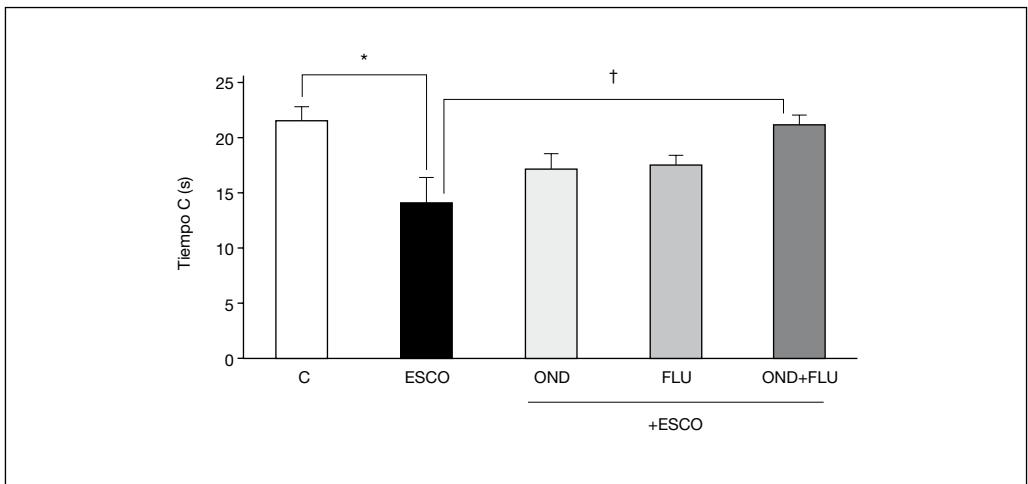


Figura 1. Efecto del ondansetrón (OND, 0,1 µg/kg), el flumazenilo (FLU, 10 mg/kg) y el tratamiento combinado (OND+FLU) sobre los déficit cognitivos inducidos por escopolamina (ESCO, 0,6 mg/kg), en la fase de retención del laberinto acuático de Morris. Los datos mostrados expresan el tiempo que los animales nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma en la fase de adquisición (C) (n = 8-10 por grupo). El análisis estadístico consistió en un ANOVA de dos criterios (criterio ondansetrón y criterio flumazenilo, seguido de un test a posteriori de Tukey). Se vio que existía interacción de ambos tratamientos [$F_{1,31} = 18,55, p < 0.01$]. *p < 0.01 frente a control, †p < 0.05 frente a escopolamina.

anat6micamente, como es el caso de la lesi3n intracerebroventricular, priva de la inervaci3n colin6rgica a la mayor parte de las estructuras cerebrales.

RESULTADOS Y CONCLUSI3N

Siete d1as despu3s de una lesi3n selectiva colin6rgica, tanto la lesi3n del n1cleo basal de Meynert como la intracerebroventricular produjeron una reducci3n de los marcadores colin6rgicos en la corteza frontal de alrededor del 40%. Sin embargo, como era de esperar, en el hipocampo se obtuvieron descensos en los marcadores colin6rgicos s3lo en el caso de la lesi3n intracerebroventricular.

1nicamente los animales con lesi3n intracerebroventricular mostraron d6ficit cognitivos en la prueba del laberinto acu3tico de Morris, tanto en la adquisici3n como en la retenci3n (Fig. 2), mientras que los animales con lesi3n del n1cleo basal de Meynert no mostraron ninguna alteraci3n en el aprendizaje ni en la memoria. Estos resultados parecen apoyar la idea de que la memoria espacial no depende de la integridad de la corteza frontal, y que es en los casos en que la inervaci3n del hipocampo se ve afectada

cuando se pueden apreciar los d6ficit cognitivos, al menos en la prueba del laberinto acu3tico de Morris.

La depresi3n: un ejemplo de d6ficit cognitivo asociado

La depresi3n es uno de los problemas de salud m1s importantes. Aunque se desconocen los mecanismos neurobiol3gicos de la depresi3n, y superada la cl1sica teor1a monoamin6rgica, cada vez es mayor la evidencia que implica a una respuesta alterada al estr3s en ciertas formas o componentes de la depresi3n.¹⁸⁻²⁰ Bas1ndose en esto y en la dificultad de encontrar modelos animales de depresi3n, en los 1ltimos a1os se est1 prestando especial atenci3n a los modelos basados en una respuesta alterada al estr3s, como son la separaci3n materna o el estr3s cr3nico suave.

La separaci3n materna, modelo de respuesta alterada al estr3s

Se ha demostrado que tiempos prolongados (m1s de una hora) de separaci3n materna

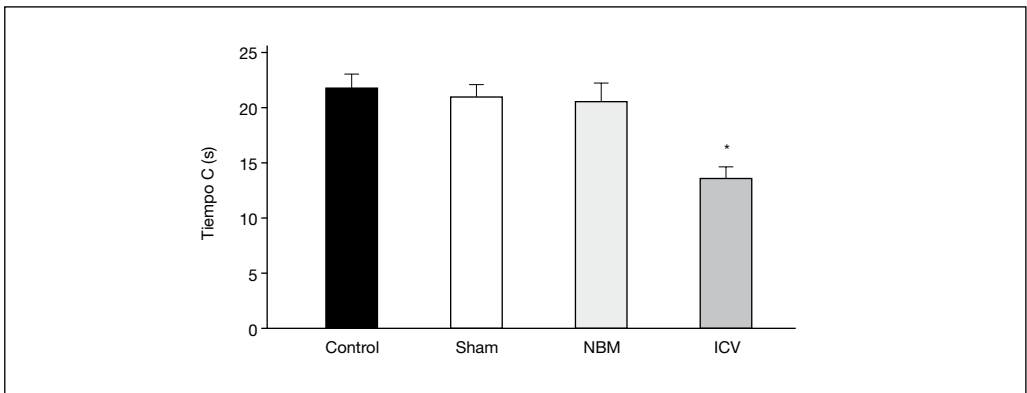


Figura 2. Efectos sobre los procesos de aprendizaje y memoria medidos en el laberinto acu3tico de Morris, en la fase de retenci3n, con una lesi3n selectiva colin6rgica con 192 IgG-saporina en el n1cleo basal de Meynert o intracerebroventricular. Los datos que se muestran son el tiempo que los animales nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma en la fase de adquisici3n (C) ($n = 6-21$ por grupo). El an1lisis estad1stico realizado fue un ANOVA de un criterio (lesi3n) seguido del test de Tamhane ($F_{3,62} = 3,670$; $*p = 0.017$ frente a control, Sham y lesiones del n1cleo basal de Meynert).

durante las primeras semanas de vida dan origen, al llegar a adultos, a animales con signos neuroendocrinos y de comportamiento de una hiperreactividad al estrés.²¹⁻²⁴ Así, estos animales muestran un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de la natación forzada de Porsolt, y anhedonia. Este endofenotipo se acompaña de una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que es el principal sistema efector de las respuestas mediadas por estrés en el organismo.²⁵

Hay importantes alteraciones en la memoria en los trastornos psiquiátricos asociados al estrés.^{26,27} Los animales macho sometidos a separación materna muestran un déficit cognitivo en la retención en el laberinto acuático de Morris; sin embargo, las hembras no muestran ningún déficit en esta prueba (Fig. 3). Estos datos podrían indicar que, en respuesta a un estrés adicional (como puede ser el agua del laberinto acuático), las ratas hembra muestran un mejor comportamiento que los machos. En general se sabe que las hembras parecen ser más resistentes que los machos a los efectos del estrés sobre la memoria, y que las hembras tienen mejor memoria espacial.²⁸ En este caso, para evitar tales diferencias entre sexos, en el estudio de las alteraciones cognitivas que acompañan a la depresión

resulta útil el modelo del reconocimiento de nuevo objeto.

Prueba del reconocimiento de nuevo objeto

Se puede definir la memoria de reconocimiento como la habilidad para discriminar lo nuevo de lo familiar. Dos investigadores, Ennaceur y Delacour, desarrollaron un paradigma animal de reconocimiento de objetos basado en la tendencia natural de los roedores a explorar más los objetos nuevos que los familiares. Se ha propuesto que esta tarea mantiene una clara analogía con las pruebas de reconocimiento que se usan ampliamente en humanos para evaluar la memoria y que sirven para caracterizar los síndromes amnésicos, ya que proporcionan un índice de la gravedad del daño de la memoria explícita. Este paradigma cognitivo puede utilizarse para medir la participación de las estructuras del lóbulo temporal en la formación de la memoria de reconocimiento a corto (90 minutos) y largo plazo (más de 24 horas). A diferencia del aprendizaje espacial, la corteza frontal y no el hipocampo es la que parece estar más estrechamente relacionada con este tipo de aprendizaje y memoria.²⁹⁻³³

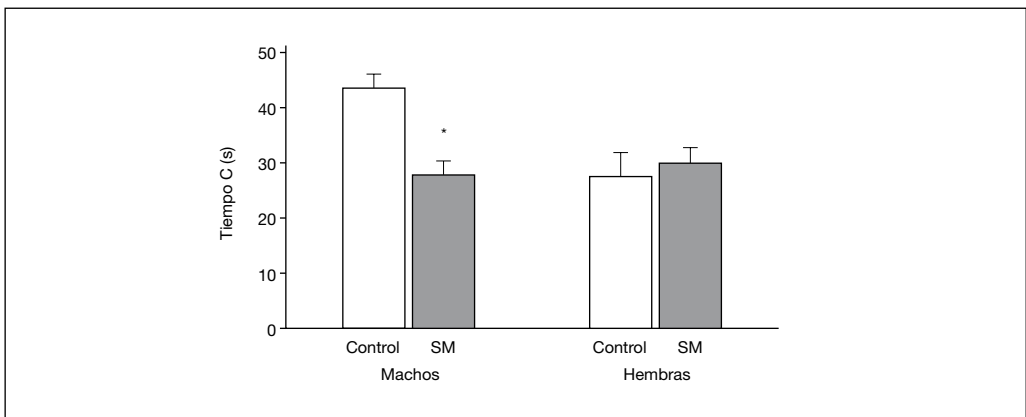


Figura 3. Efecto de la separación materna en la prueba del laberinto acuático de Morris, en la fase de retención, en ratas macho y hembra. Los datos que se muestran son el tiempo que los animales nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante la fase de adquisición (C) (n = 12 por grupo). El análisis estadístico fue una prueba t de Student comparando control con separación materna. *p <0.05 frente a control.

EXPERIMENTO

Reversión de los déficit cognitivos presentes en el modelo de separación materna en rata²⁵ (Marcos et al., observaciones no publicadas).

EQUIPO Y PROTOCOLO

Los descriptos a continuación están adaptados de Ennaceur y Delacour.³⁴ El campo abierto consiste en un cuadrado negro (65 × 65 × 45 cm). El día previo al experimento, los animales se familiarizan con el campo durante 30 minutos. En el primer pase del experimento se muestran a los animales dos objetos similares en cuanto a color, forma, tamaño y textura, y se colocan equidistantes de los bordes (10 cm). El animal se sitúa en el centro del campo y se le permite explorar libremente durante 5 minutos. Se considera exploración cuando la cabeza del animal se orienta hacia el objeto y su nariz está situada a menos de 2 cm de él. Una hora más tarde se lleva a cabo el segundo pase (5 minutos), tras remplazar uno de los objetos por otro nuevo, y se mide el tiempo de exploración. Los resultados se expresan como porcentaje de tiempo explorando el nuevo objeto en relación con el tiempo total de exploración (índice de discriminación).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la prueba de reconocimiento de objeto no se encontraron diferencias en el tiempo que las ratas exploran dos objetos idénticos. Al sustituir uno de los objetos por otro nuevo, los animales exploran un tiempo significativamente superior el objeto nuevo. Sin embargo, los animales que habían sido separados de sus madres, tanto machos como hembras, mostraron un déficit cognitivo, con un índice de discriminación en los animales con separación materna cercano a 50.

La administración de un antagonista de los receptores 5-HT₆, como el compuesto SB-271046, consiguió revertir el déficit cognitivo asociado a la separación materna (Fig. 4A). Sin embargo, los datos bibliográficos parecen apoyar la idea de que son los agonistas 5-HT₆ los que se muestran más efectivos como antidepresivos,³⁵ por lo que no está clara la posible utilidad de los antagonistas 5-HT₆ en el caso de las alteraciones cognitivas asociadas a la depresión.

En este mismo modelo se ha descrito que las alteraciones cognitivas podrían deberse a la alteración del eje HPA, en concreto a un exceso de glucocorticoides circulantes²⁵. Por lo tanto, teóricamente, un antagonista de los recepto-

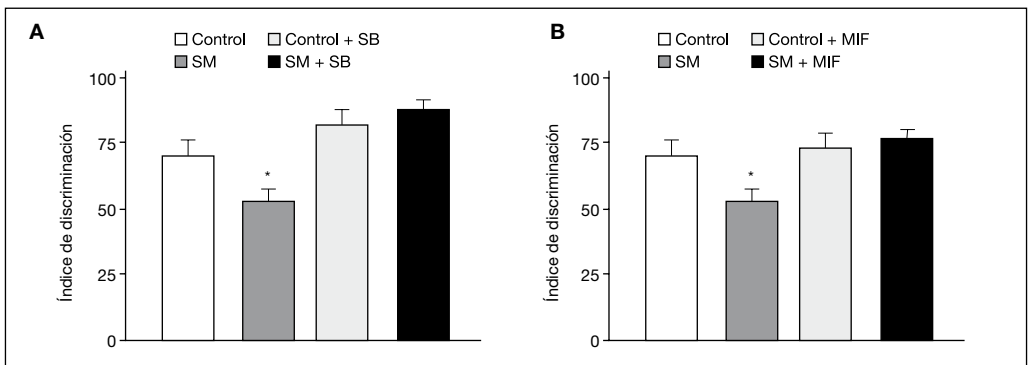


Figura 4. Efecto del tratamiento A) con un antagonista 5-HT₆ (SB-271046, 10 mg/kg) y B) con mifepristona (10 mg/kg) en los déficit cognitivos inducidos por la separación materna en la prueba de reconocimiento de nuevo objeto (n = 8-12 por grupo). El estudio estadístico mostró una interacción significativa entre el estrés neonatal (separación materna) y el tratamiento con SB-271046 ($F_{1,51} = 5,280, p < 0.05$) o mifepristona ($F_{1,43} = 4,83, p < 0.05$). El análisis a posteriori con la prueba t de Student reveló que los animales separados de sus madres tratados con SB-271046 o mifepristona no mostraban ningún déficit cognitivo.

res de glucocorticoides, como la mifepristona, debería revertir los déficit cognitivos asociados a la separación materna. Al estudiar el efecto de la mifepristona vimos que este fármaco no sólo es eficaz para revertir los déficit cognitivos (Fig. 4B), sino que también disminuye el tiempo de inmovilidad en la prueba de la natación forzada de Porsolt. Todos estos datos parecen sugerir una posible utilidad de la mifepristona para el tratamiento de los trastornos afectivos y las alteraciones cognitivas asociadas.²⁵ Actualmente la mifepristona está en fase 3 de ensayo clínico para el tratamiento de la depresión mayor, y puede ser el primer antidepresivo no monoaminérgico del mercado.

Conclusiones

Para los estudios funcionales en aprendizaje y memoria se han desarrollado diversas pruebas. A la hora de elegir qué prueba utilizar hay que tener en cuenta las particularidades de cada modelo, en cuanto a sustrato anatómico y tipo de aprendizaje, ya que podemos encontrarnos resultados inesperados o incluso contradictorios. Los modelos funcionales de aprendizaje y memoria aquí presentados pueden utilizarse tanto para estudiar los mecanismos anatomopatológicos causantes de enfermedades como para evaluar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de los déficit cognitivos característicos o asociados a diversas afecciones neuropsiquiátricas, como la enfermedad de Alzheimer y la depresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Woolley ML, Bentley JC, Sleight AJ, Marsden CA, Fone KC. A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacol.* 2001;41:210-9.
2. Meneses A. Effects of the 5-HT₆ receptor antagonist Ro 04-6790 on learning consolidation. *Behav Brain Res.* 2001;118:107-10.
3. Hirst WD, Abrahamsen B, Blaney FE, Calver AR, Aloj L, Price GW, et al. Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *Mol Pharmacol.* 2003;64:1295-308.
4. Hirst WD, Moss SF, Bromidge SM, Riley G, Stean TO, Rogers SC. Characterization of SB-399885, a potent and selective 5-HT₆ receptor antagonist. *Soc Neurosci Meet.* 2003;576:7.
5. King MV, Sleight AJ, Woolley ML, Topham IA, Marsden CA, Fone KC. 5-HT₆ receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation – an effect sensitive to NMDA receptor antagonism. *Neuropharmacol.* 2004;47:195-204.
6. Rogers DC, Hagan JJ. 5-HT₆ receptor antagonists enhance retention of a water maze task in the rat. *Psychopharmacol.* 2001;158:114-9.
7. Foley AG, Murphy KJ, Hirst WD, Gallagher HC, Hagan JJ, Upton N, et al. The 5-HT₆ receptor antagonist SB-271046 reverses scopolamine-disrupted consolidation of a passive avoidance task and ameliorates spatial task deficits in aged rats. *Neuropsychopharmacol.* 2004;29:93-100.
8. Russell MG, Dias R. Memories are made of this (perhaps): a review of serotonin 5-HT(6) receptor ligands and their biological functions. *Curr Topics Med Chem.* 2002;2:643-54.
9. Lindner MD, Hodges DB Jr, Hogan JB, Orié AF, Corsa JA, Barten DM, et al. An assessment of the effects of serotonin 6 (5-HT₆) receptor antagonists in rodent models of learning. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:682-91.
10. Pérez-García G, Meneses A. Oral administration of the 5-HT₆ receptor antagonists SB-357134 and SB-399885 improves memory formation in an autoshaping learning task. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;81:673-82.
11. Ávila J. Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies. *FEBS Lett.* 2000;30:89-92.
12. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 1982;217:408-14.
13. Morris R. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth.* 1984;11:47-60.
14. Díez-Ariza M, Redondo C, García-Alloza M, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Flumazenil and tacrine increase the effectiveness of ondansetron on scopolamine-induced impairment of spatial learning in rats. *Psychopharmacol.* 2003;169:35-41.

15. Díez-Ariza M, García-Alloza M, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. GABA(A) receptor antagonists enhance cortical acetylcholine release induced by 5-HT(3) receptor blockade in freely moving rats. *Brain Res.* 2002;956:81-5.
16. Torres EM, Perry, TA, Blockland A, Wilkinson LS, Wiley RG, Lappi DA, et al. Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience.* 1994;63:95-122.
17. García-Alloza M, Zaldua N, Díez-Ariza M, Marcos B, Lasheras B, Gil-Bea FJ, et al. Effect of selective cholinergic denervation on the serotonergic system: implications for learning and memory. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:1074-81.
18. Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Clinical characteristics of major depression that predict risk of depression in relatives. *Arch Gen Psychiatry.* 1999;56:322-7.
19. Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol.* 1997;48:191-214.
20. Van Praag HM. Can stress cause depression? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004;28:891-907.
21. Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci.* 1998; 16:149-64.
22. Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res.* 2000;122:81-103.
23. Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci.* 2000;11:383-408.
24. Ploj K, Roman E, Nylander I. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience.* 2003;121:787-99.
25. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinol.* 2007;32:256-66.
26. Bremner JD, Narayan M. The effects of stress on memory and the hippocampus throughout the life cycle: implications for childhood development and aging. *Dev Psychopathol.* 1998;10:871-85.
27. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Southwick SM, McGlashan T, Staib LH, et al. Neural correlates of declarative memory for emotionally valenced words in women with posttraumatic stress disorder related to early childhood sexual abuse. *Biol Psychiatry.* 2003;53:879-89.
28. Luine V. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. *Stress.* 2002;5:205-16.
29. Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:51-61.
30. Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res.* 1997;113:509-19.
31. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learning Mem.* 2004;82:26-34.
32. Kirchoff BA, Wagner AD, Maril A, Stern CE. Prefrontal-temporal circuitry for episodic encoding and subsequent memory. *J Neurosci.* 2000;20:6173-80.
33. Xiang JZ, Brown MW. Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. *Neuron.* 2004;42:817-29.
34. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31:47-59.
35. Svenningsson P, Tzavara ET, Qi H, Carruthers R, Witkin JM, Nomikos GG, et al. Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT6 receptor stimulation. *J Neurosci.* 2007;27:4201-9.

DISCUSIÓN

C. GOICOECHEA: ¿Cómo discrimináis en el test de Morris qué parte se debe al aprendizaje y cuál a la ansiedad producida por el mismo test? Sobre esta prueba había leído que se situaba al animal en frente de la plataforma y luego se ocultaba para ver si era capaz de llegar al mismo lugar. ¿Qué diferencias hay con el método que nos has explicado?

M.J. RAMÍREZ: Hay distintos protocolos para desarrollar un laberinto acuático de Morris. El que os he mostrado es el de plataforma invisible, en el cual el animal aprende por las pistas externas. El protocolo que mencionas es el de plataforma visible, que se utiliza cuando tenemos la sospecha de que la capacidad visual del animal está afectada. Por ejemplo, en general, cuando trabajamos con ratones, primero realizamos una plataforma visible y a continuación una invisible, que es la que en realidad nos aporta el dato de memoria.

P. ROBLEDO: ¿El test de Morris es válido para el Alzheimer?

M.J. RAMÍREZ: Es un modelo que gusta mucho porque en el Alzheimer la primera área y la más profundamente afectada es el hipocampo y la corteza entorrinal, que precisamente son el sustrato anatómico del laberinto acuático de Morris.

M.J. SANZ: En referencia a las diferencias observadas entre hembras y machos, ¿habéis probado si con un antagonista de un receptor estrogénico cambian las respuestas?

M.J. RAMÍREZ: En la bibliografía está descrito, pero nosotros, por motivos técnicos, no lo hemos podido realizar. Lo primero que se debe hacer es controlar el ciclo de la rata para ver en qué momento puedes realizar la prueba.

A.M. PLANAS: Sobre este mismo tema, ¿se ha probado utilizando ratas ovariectomizadas?

M.J. RAMÍREZ: Sí, pero nosotros no lo hemos realizado.

A.M. PLANAS: Nos has comentado que las hembras responden mejor al estrés. ¿Habéis observado si suben los valores de corticosteroides en plasma en respuesta al estrés y si hay diferencias entre machos y hembras?

M.J. RAMÍREZ: Sí, en la prueba de separación materna (modelo de respuesta alterada al estrés) se observa un aumento significativo de los corticosteroides en los animales separados, tanto en machos como en hembras.

A.M. PLANAS: A partir de estos resultados me planteo cómo afectará a la sociedad que las mujeres trabajen, ya que si en ratones, con sólo separarlos unas horas, ya induce esta depresión, las futuras generaciones...

S. ERILL: Considerando el efecto antiglucocorticoide de la progesterona, si pensamos que el parto es un proceso de cesación brusca de concentraciones altas de progesterona, a lo mejor la depresión posparto tiene algo que ver con todo esto.

M.J. RAMÍREZ: Y los problemas cognitivos, porque siempre dicen que después del parto es mejor no estudiar demasiado.

M.I. COLADO: ¿Tienes datos del ondansetrón y el flumazenilo sobre la actividad locomotora de los animales en el test del laberinto acuático?

M.J. RAMÍREZ: Sí, y no afectan. La primera prueba que hicimos fue la de actividad motora, porque un animal con una actividad motora elevada sesgaría los resultados.

J.M. BAeyENS: Tal vez se debería ser algo más prudente respecto a la generalización sobre la limitada capacidad de aprendizaje de los

ratones. Sólo me gustaría añadir que probablemente también dependerá de la cepa que se utilice.

M.J. RAMÍREZ: No se puede generalizar, pero daré solamente un apunte: un protocolo de Morris normal es un día de habituación, dos de adquisición y puedes hacer una retención al día siguiente y a los cuatro días, por ejemplo. Cuando trabajas con ratones (nosotros utilizamos los C55) se necesita un día de

habituación, tres o cuatro días de plataforma visible, seis a ocho días de adquisición y luego la retención.

A. BADÍA: Cuando utilizáis inhibidores de la acetilcolinesterasa en el laberinto acuático de Morris, ¿cuánto tiempo tarda el animal en mostrar signos de aprendizaje?

M.J. RAMÍREZ: El segundo día ya muestra signos de aprendizaje.