

57



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO
ESTRIATAL EN LA MEMORIA DE
PREVENCION PASIVA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

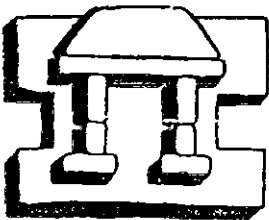
P R E S E N T A:

HECTOR GONZALEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN

gonzalez



IZTACALA LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES

Gracias por todo.

Con todo mi amor y admiración les dedico
este trabajo. Por que todos mis ideales y
acciones tienen un mismo origen.

A NORMA Y EDUARDO

Por que compartimos algo más que simples
genes. Siempre cuenten conmigo.

A MIS TIAS YAZMIN Y

GUILLERMINA

Por todo el apoyo que nos han otorgado.

A YAZMIN, BERENICE Y CLAUDIA

Por los detalles que han enriquecido este
camino.

A NAYELI

Por la luna, los unicornios, por el perro que
se tira por la ventana, por escucharme y
tenerme infinita paciencia. Gracias.

Carpe diem

A HUGO

Por las diferencias que han fortalecido la
amistad de todos estos años, por el estar
ahí y comprender esos momentos
cruciales.

A GABRIEL ROLDÁN

Gracias por todos los consejos, por ser un
maestro y sobre todo un amigo en estos
quehaceres científicos

A todos los amigos que han estado en el
laboratorio César, Angélica, Claudia
Angélica, Enrique Adriana y Marco
gracias por el interés y hacer grato el
trabajo en el laboratorio.

Arturo Roldán por las cervezas y el buen
animo.

Quiero agradecer al Dr. Reyes Haro por el
apoyo y la oportunidad de trabajar en la
clínica de trastornos del sueño. Así mismo
a todos los compañeros y amigos del
hospital de neurología Manuel, Carlos y
Luis, de la clínica de trastornos del sueño
Leticia Ulises, Lulú, Martha, Gonzalo y
Víctor gracias por las lecciones además de
todas esas noches de agradable desvelo.

A las ratas que fueron sacrificadas para la
realización de este trabajo, que su muerte
no haya sido en vano.

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina de la UNAM en el laboratorio de Neurobiología Conductual, con el asesoramiento del Dr. Gabriel Roldán

ÍNDICE

❖ RESUMEN.....	1
❖ ABREVIATURAS.....	3
❖ INTRODUCCIÓN.....	4
♦ APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	5
• ETAPAS DEL APRENDIZAJE.....	8
• CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA.....	10
♦ CUERPO ESTRIADO.....	12
• NEURONAS DEL CUERPO ESTRIADO.....	14
• PARTICIPACIÓN DEL CUERPO ESTRIADO EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	18
♦ OXIDO NÍTRICO.....	19
• PAPEL DEL ON EN LA ACTIVIDAD DEPENDIENTE DEL USO.....	27
• PAPEL DEL ON EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	28
❖ JUSTIFICACIÓN.....	30
❖ OBJETIVO.....	31
❖ HIPÓTESIS.....	31
❖ MATERIAL Y MÉTODO.....	31
♦ SUJETOS.....	31
♦ CIRUGÍA.....	31
♦ MODELO DE PREVENCIÓN PASIVA.....	32
• APARATOS.....	32

♦ PROCEDIMIENTO.....	32
• ENTRENAMIENTO Y PRUEBA.....	32
• TRATAMIENTOS Y GRUPOS.....	33
♦ HISTOLOGÍA.....	35
♦ ESTADÍSTICA.....	35
❖ EXPERIMENTO 1. EFECTO DE L-NAME SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE PREVENCIÓN PASIVA.....	36
♦ PROCEDIMIENTO.....	36
♦ RESULTADOS.....	36
❖ EXPERIMENTO 2. LA L-ARGININA REVIERTE EL EFECTO AMNÉSICO DEL L-NAME.....	38
♦ PROCEDIMIENTO.....	38
♦ RESULTADOS.....	38
❖ EXPERIMENTO 3. EFECTO DEL L-NAME A DISTINTOS TIEMPOS POST-ADQUISICIÓN.....	39
♦ PROCEDIMIENTO.....	39
♦ RESULTADOS.....	40
❖ EXPERIMENTO 4. EFECTO DEL L-NAME SOBRE LA EVOCACIÓN DE LA TAREA DE PREVENCIÓN PASIVA.....	41
♦ PROCEDIMIENTO.....	41
♦ RESULTADOS.....	41
❖ DISCUSIÓN.....	43
❖ CONCLUSIONES.....	46
❖ REFERENCIAS.....	47

Resumen

Existen una gran cantidad de evidencias que implican al óxido nítrico (ON) en los fenómenos de plasticidad neuronal, incluyendo el aprendizaje y la formación de la memoria. El cuerpo estriado es una estructura fundamental en la integración del aprendizaje de prevención pasiva y se ha logrado identificar neuronas productoras de ON con una gran densidad dendrítica en este núcleo. En el presente trabajo se estudiaron los efectos del bloqueo de la sintetasa de ON del cuerpo estriado durante la fase de consolidación y evocación de la tarea de prevención pasiva. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso. Todos los sujetos fueron implantados bilateralmente con cánulas de acero inoxidable en el cuadrante anterodorsal del cuerpo estriado. Se formaron grupos de 8-11 ratas y se entrenaron en una tarea de prevención pasiva en un solo ensayo, el cual consistió básicamente, en evitar un compartimiento oscuro (de castigo) en el que recibieron un choque eléctrico y permanecer en su compartimiento contiguo e iluminado (de seguridad). En el experimento 1 se administro metilester de L-Arginina (L-NAME), inhibidor competitivo de la ON de sintetasa, en dosis de 0, 50, 100, 200 y 400 μM inmediatamente después del entrenamiento. Se probó la capacidad de retención de los animales 24 horas más tarde. Los resultados muestran que el L-NAME provoca un efecto amnésico dependiente de la dosis alcanzando diferencias significativas a 100 ($p < 0.05$) y 200 μM ($p < 0.01$). Debido a que se ha propuesto que la participación del ON se restringe a etapas iniciales de la consolidación de la memoria, en el segundo experimento se analizó el período post-entrenamiento crítico dentro del cual interviene este mensajero. Se administró una dosis amnésica efectiva de L-NAME (200 μM) a intervalos de 10, 20 y 30 minutos después de la adquisición del condicionamiento. Se encontró un profundo deterioro en la capacidad de retención ($p < 0.01$), cuando se aplicó la droga 10 minutos post-adquisición el cual disminuye

considerablemente a los 20 minutos y desaparece a los 30 minutos. Dado que la participación del ON en el aprendizaje y la memoria se ha correlacionado con el fenómeno de potenciación a largo plazo, las investigaciones sobre esta molécula se han concentrado en las fases iniciales del aprendizaje (en relación directa a la fase de mantenimiento e inducción en la potenciación a largo plazo), por lo que en la etapa de evocación se ha relegado su papel y prácticamente no existen reportes de que el ON participe en esta etapa, por esta razón entrenamos y probamos a un grupo de ratas que ejecutaran óptimamente la prueba de prevención pasiva; después de 48 horas del entrenamiento inicial en una segunda retención, se inyectó L-NAME (200 μ M) diez minutos antes de la prueba, se continuaron las retenciones por dos sesiones más. Los resultados muestran que al administrar L-NAME produce efectos amnésicos ($p < 0.02$) que se revierten cuando el inhibidor de la ONS no está presente en las siguientes retenciones. Estos resultados sugieren que el ON podría ser un mensajero químico necesario para la formación, consolidación y evocación de la memoria.

Abreviaturas:

EC	Estimulo condicionado	ONS	Óxido nítrico
EI	Estimulo incondicionado		sintetasa
RC	Respuesta condicionada	L-NAME	Metilester de la nitro-L-
RI	Respuesta incondicionada		arginina
SNC	Sistema nervioso	L-Mearg	L-N ^G -metilarginina
central		7-NI	7-nitroindazol
CE	Cuerpo estriado	PLP	Potenciación a largo
ON	Óxido nítrico		plazo
GMPc	Monofosfato de guanosina	DLP	Depresión a largo
cíclica			plazo
FRDE	Factor relajante derivado	NPS	Nitroprusiato de
del endotelio			sodio

INTRODUCCIÓN

Un gran reto para las neurociencias es entender cómo el sistema nervioso adquiere, almacena y utiliza la información. Con el establecimiento de la “doctrina neuronal” por Santiago Ramón y Cajal (1906), la cual declara que el sistema nervioso esta hecho de unidades discretas (neuronas), se propone que las redes neuronales no son una continuidad citoplasmática sino que se comunican unas con otras en uniones especializadas; en años posteriores se comprobó claramente que las neuronas tanto en organismos con una glía primitiva como en individuos con cerebros complejos son esencialmente similares en su morfología. A principios de siglo XX el fisiólogo británico Charles Sherrington acuñó el término “sinapsis” para referirse a las interacciones estructurales y funcionales entre las neuronas en todo el sistema nervioso (Sherrington 1906). En 1843 el alemán Emil Du Bois-Reymond descubrió que las corrientes eléctricas están involucradas en la conducción nerviosa; varias generaciones después siguiendo los estudios de Edgar Adrian sobre las propiedades eléctricas de las neuronas (Adrian 1932) los electrofisiólogos tuvieron éxito en descifrar los elementos del lenguaje de señales eléctricas usadas por las células nerviosas para comunicarse e integrar la información. Además, los descubrimientos de muchos farmacólogos y bioquímicos llegaron a la conclusión de que las sustancias químicas son usadas por las neuronas para la comunicación y la regulación en diferentes partes del sistema nervioso y en diferentes organismos tal como se había demostrado con las corrientes eléctricas. En las últimas dos décadas, estudios de biología molecular y neuroquímica han confirmado que la universalidad estructural y funcional de las neuronas es también universalmente molecular; esto es, que las células nerviosas, sean localizadas en los ganglios de una sanguijuela o en cerebelo de un gato, usan similares o idénticos tipos de mecanismos moleculares para su desarrollo, mantenimiento y función. Para los propósitos de la manipulación de la

información, las neuronas emplean un lenguaje compuesto de señales eléctricas y químicas por lo que estos dos tipos de señales son interactivas e interdependientes. Así, cualquiera de los eventos externos que sean procesados por el sistema nervioso son representados en el cerebro como patrones espacio-temporales de la actividad neuronal y estos mismos patrones pueden ser responsables del cambio sináptico. Estas ideas fueron refinadas en los años cuarenta por Hebb (1949) quien propuso una regla de plasticidad sináptica en donde el enlace de dos células nerviosas es fuerte si ambas están activas al mismo tiempo. Además, postula que el aprendizaje asociativo puede estar basado en esta modificación sináptica. Actualmente sabemos que la plasticidad sináptica se expresa de muchas formas como la facilitación postsináptica, y que la regla de Hebb sólo puede ser aplicada en algunas formas de plasticidad. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre la actividad neuronal, conducen a que se mantenga como idea central la modificación sináptica, principalmente para la comprensión de fenómenos como la actividad-dependiente del uso, el aprendizaje, y la memoria; estas últimas funciones tienen gran importancia, ya que son herramientas esenciales que han ayudado a los individuos a modificar sus conductas, lo que les ha permitido adaptarse a los cambios que se presentan en su medio ambiente. El éxito y la supervivencia de las especies dependen, al menos en parte, de estos procesos.

APRENDIZAJE Y MEMORIA

Las observaciones conductuales demuestran claramente que el aprendizaje y la memoria se presentan en muchas especies bajo diferentes circunstancias, desde organismos procariotes muy primitivos como las bacterias quimiotácticas, pasando por organismos unicelulares eucariotes, que muestran una modificación de su conducta de acuerdo a las experiencias (Dudai 1989), hasta los mamíferos que

presentan un complejo sistema nervioso. Por esta razón es difícil dar una definición precisa de lo que es el aprendizaje y la memoria por lo que adoptaremos la definición siguiente:

El aprendizaje en los vertebrados es en primera instancia un proceso que involucra al sistema nervioso central (SNC) y al sistema nervioso periférico, el cual se puede definir como la adquisición de información, que se representa como una modificación a nivel sináptico y resulta en cambios en la conducta de los individuos; estos cambios pueden ser de duración variable y es resultado de la experiencia a la que se ha expuesto previamente. La memoria es la representación física de la información aprendida, es decir los cambios plásticos a nivel sináptico (Dudai 1989).

Se ha clasificado al aprendizaje en diferentes tipos principalmente categorizados por su nivel de complejidad:

1. Aprendizaje simple o no asociativo. La habituación y la sensibilización son ejemplos de aprendizaje simple.
2. Aprendizaje complejo o asociativo. El condicionamiento clásico y operante son ejemplos de aprendizajes complejos.

La habituación es la forma más sencilla de aprendizaje, pues no requiere de la adquisición de nuevas respuestas, sino más bien de la pérdida de las ya existentes. Un animal cesa gradualmente de responder a estímulos que no tienen importancia, que son irrelevantes para su supervivencia. Las curvas de habituación a estímulos visuales y táctiles son diferentes, resaltando que la disminución de la respuesta no se debe a fatiga muscular o circunstancias similares. La naturaleza de los procesos que rigen la habituación es oscura, pero debe ser una propiedad del SNC y no del órgano sensorial. La habituación se distingue de la fatiga y la adaptación sensorial por su persistencia relativamente larga. La habituación desempeña un importante papel en el desarrollo de los animales jóvenes.

En la sensibilización, la presentación de un estímulo fijo produce respuestas similares, pero al aumentar súbitamente la intensidad de un solo estímulo la respuesta producida se ve aumentada proporcionalmente y se mantiene aún cuando el estímulo haya regresado a la intensidad inicial. El estímulo excluyente en la sensibilización es fuerte o nocivo. La sensibilización entra en la clasificación de no asociativo porque no es resultado de asociaciones específicas entre estímulos distintos (como opuestos a aprendizajes asociativos), además un estímulo sensibilizador aumenta la respuesta a una variedad de estímulos. Desde un punto de vista conductual la deshabitación puede ser considerada como un caso de sensibilización. Sin embargo los mecanismos biológicos que subyacen a la sensibilización y la habituación no son necesariamente los mismos. La sensibilización como la habituación son conductas muy dispersas en el reino animal. Este es un mecanismo primario, que incrementa la vigilia, la atención y disminuye el umbral de respuestas defensivas.

El condicionamiento clásico se establece apareando un estímulo neutro que produce respuestas reflejas inespecíficas (estímulo condicionado, EC) con un estímulo que puede producir una respuesta refleja específica (estímulo incondicionado, EI); a la respuesta producida por EI se le llama respuesta incondicionada (RI). Al hacer la asociación entre los dos estímulos, la sola presencia del EC se puede desencadenar la RI, que en esta situación recibe el nombre de respuesta condicionada (RC). A este tipo de condicionamiento también se le llama pavloviano debido a los experimentos clásicos de Ivan P. Pavlov (1905). En estos trabajos de condicionamiento en perros se analizó el reflejo de salivación. Se colocaba alimento en polvo en la boca de un perro hambriento y éste secretaba saliva que era colectada por un tubo insertado en el conducto salival con lo cual podía medirse la saliva producida por el estímulo. Al colocar cantidades conocidas de carne en polvo en la boca del animal, se medía la secreción de saliva producida en respuesta a dicho estímulo. Pavlov asoció la carne en polvo (EI) con el tintineo de un timbre.

Inicialmente el tintineo no causó respuesta, pero tras algunos apareamientos entre los estímulos del timbre y la carne, comenzó a gotear saliva en el tubo cuando se hizo sonar el timbre (EC) antes de que fuera presentada la carne en polvo, a lo que Pavlov llamó reflejo condicionado. Este tipo de reflejos condicionados es muy común observarlos en muchas especies animales, desde lombrices de tierra hasta primates.

En el condicionamiento operante (instrumental o de ensayo y error), un acto en particular es recompensado o castigado cuando se produce, aumentando o reduciendo la probabilidad de que se repita. Una característica central del condicionamiento operante es el concepto de que el animal debe representar un papel en provocar la respuesta que es recompensada o castigada. El modelo típico de aprendizaje operante fue desarrollado por B. F. Skinner: una rata presiona una barra en su jaula con la pata delantera y es recompensada con alimento. Inicialmente la presión ejercida sobre la barra se produce por casualidad, pero en pruebas sucesivas la rata aprende que empujar la barra le proporciona alimento. La rata podría al principio presionar la barra con la nariz o con la pata, pero el experimentador puede determinar cuál de estas conductas será recompensada. Puede disponer la jaula experimental de tal modo que la rata sea castigada con un choque eléctrico, si empuja la barra con otra parte del cuerpo que no sea la pata. Así el adiestramiento operante puede ser adiestramiento recompensador (alimento) o adiestramiento de escape o evitación (evitar la descarga eléctrica).

ETAPAS DEL APRENDIZAJE

El aprendizaje puede ser dividido en varias etapas diferenciadas claramente una de la otra: la primera es la adquisición, en la cual se percibe, se procesa y asocia nueva información. La etapa de consolidación es propiamente la etapa en la que se forma y se almacena la información adquirida que se representa en el sistema

nervioso mediante modificaciones en la red neuronal; estas modificaciones pueden ser temporalmente variables y de eso depende probablemente la persistencia del aprendizaje. Finalmente, la evocación es la fase en la cual se accede al engrama de memoria almacenado y puede ser recuperado para la ejecución conductual. (Figura 1).

Etapas del Proceso de Aprendizaje y Memorización

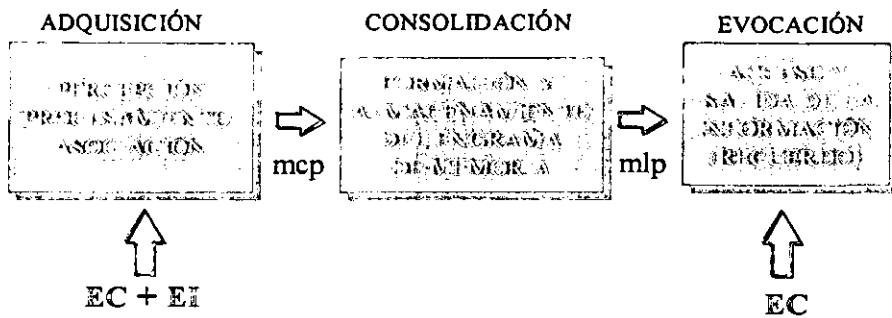


Figura 1. Etapas del aprendizaje. En la adquisición se perciben procesan y asocian los estímulos condicionados e incondicionados, formando una memoria a corto plazo que posteriormente se almacena y se ve representada en el SNC a partir de esta etapa se forma la memoria a largo plazo. Una vez que la información es almacenada se requiere tener acceso y recobrar esta información ante la presentación del estímulo condicionado, esta fase se le conoce como evocación.

CLASIFICACION DE LA MEMORIA

En un principio, es necesario hacer una distinción entre el aprendizaje y la memoria. La memoria es el resultado del aprendizaje desafortunadamente es muy común utilizar ambos términos de como sinónimos, siendo que cada uno de ellos implica procesos diferentes. El estudio de la memoria se a abordado desde diferentes perspectivas resaltando, tal vez, el análisis de los padecimientos que cursan con deficiencias cognitivas y cuadros amnésicos para comprender cómo funciona la memoria normal. Por principio, es necesario establecer que en la actualidad se acepta que existen dos formas de almacenamiento de la memoria: la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo. Existen evidencias (McGaugh 1966) que permiten afirmar que el procesamiento inicial de la memoria o la huella de la experiencia de aprendizaje por sí misma es lábil y está sujeta a la interferencia y un rápido decaimiento. Esta forma de memoria se conoce como memoria de corto plazo y se refiere a un sistema que retiene información temporalmente en un estado especial mientras está siendo incorporada o transferida a un almacén más estable, potencialmente permanente de memoria a largo plazo. La manipulación experimental, tal como la estimulación eléctrica o farmacológica, alteran la memoria cuando son aplicados inmediatamente después del aprendizaje, volviéndose menos efectivos con el paso del tiempo hasta ser completamente inocuos después de varias horas, ya que durante este periodo tiene lugar la consolidación de la huella de memoria. Una evidencia importante, desde el punto de vista clínico, lo aportó el caso H. M. (Atkinson y Shiffrin 1968); este paciente sufrió una cirugía localizada anatómicamente en la región temporal medial del cerebro lo cual provocó un cuadro amnésico severo de la memoria a corto plazo dejando prácticamente intacta la memoria a largo plazo. La misma distinción entre memoria de corto y largo plazo se ha podido demostrar en muchas otras especies de vertebrados e invertebrados. La

memoria de largo plazo se ha clasificado de acuerdo a la experiencia en investigaciones con pacientes amnésicos que pueden ejecutar un tipo de pruebas de memoria mientras que otras que es prácticamente imposible que resuelvan. Así, de acuerdo a los datos clínicos (Squire 1986) se ha clasificado a la memoria en “memoria declarativa” que implica tener conciencia de la información adquirida recientemente. Este tipo de memoria parece estar seriamente alterada en pacientes amnésicos, debido probablemente al daño en alguna parte dentro del sistema relacionado con el lóbulo temporal, sistema límbico y corteza frontal (Squire y Zola-Morgan 1988). El aprendizaje que se encuentra intacto en este tipo de pacientes amnésicos se le denomina “memoria de procedimiento” y refleja la adquisición de habilidades ya que la ejecución puede mejorar normalmente sin ninguna participación de aprendizajes previos. El aprendizaje no declarativo se refiere a un conjunto de habilidades de aprendizaje implícitas y múltiples vías en paralelo con cambios sinápticos en diferentes puntos del circuito que pueden regular diferentes aspectos de la respuesta aprendida. La memoria no declarativa aparece tanto en vertebrados como en invertebrados, la memoria declarativa puede estar bien desarrollada particularmente en el cerebro de los vertebrados dependiendo únicamente de estructuras diencefálicas y límbicas (Morris et al. 1988). Tulving ha propuesto una subdivisión de la memoria a largo plazo en semántica y episódica. La memoria semántica refleja el conocimiento general del mundo y la memoria episódica corresponde al almacenamiento de información acerca de los eventos experimentados personalmente. Su clasificación conserva la memoria de procedimiento. (Figura 2).

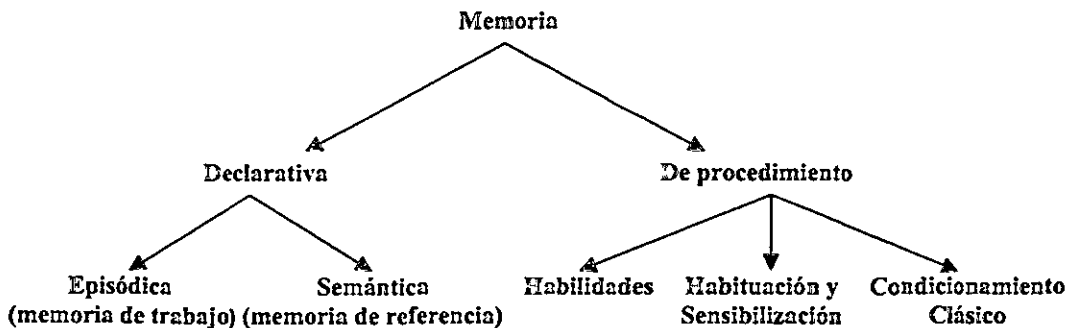


Figura 2. Clasificación de la memoria (modificado de Squire 1986)

CUERPO ESTRIADO

Los ganglios basales están constituidos por un grupo de núcleos subcorticales interconectados que comprenden al telencéfalo, diencefalo, y mesencéfalo (Albin et al., 1989) Desde el punto de vista anatómico, como su nombre implica, incluye las estructuras situadas profundamente en los hemisferios cerebrales (el estriado, el globo pálido y la amígdala). El complejo estriato-padial actúa conjuntamente con sus núcleos relacionados: el núcleo subtalámico (conectado recíprocamente con el globo pálido) y la sustancia nigra (Graybel 1990).

El conjunto del putamen y el globo pálido se le llama núcleo lenticular y el núcleo caudado con el núcleo lenticular se le denomina cuerpo estriado (CE) (Crosby et al. 1962). La terminología más común es la que denomina neostriado al conjunto del núcleo caudado y el putamen; el globo pálido es denominado como paleoestriado. Crosby et al. (1962) y Truex (1971), establecen que el término arquiestriado se reserva para el complejo nuclear amigdalino al que no todos consideran un ganglio

basal, ya que funcionalmente guarda relación con el sistema olfatorio y límbico principalmente.

La estructura eferente primaria de los ganglios basales es el estriado. En algunos mamíferos el estriado es una sola estructura, pero en muchos casos este consiste de dos porciones, el caudado medial y el putamen lateral dividido por células de la cápsula interna. Las principales vías eferentes de los ganglios basales son el globo pálido medial (interno) y la sustancia nigra pars reticulata. En muchos mamíferos están separados por las fibras de los pedúnculos cerebrales, pero contienen neuronas citológicamente parecidas (Yelnik et al. 1987). Similares al núcleo caudado y al putamen, el globo pálido medial y la sustancia nigra pars reticulata se pueden considerar partes de un sistema neuronal único, separados por un tracto de materia blanca. En los felinos y roedores el homólogo del globo pálido medial interno es el núcleo entopeduncular, el cual está inmerso en las fibras de los tractos corticofugales. También se ha demostrado que el globo pálido interno en primates está organizado en una forma diferente a su homólogo en la rata, el núcleo entopeduncular (Van der Kooy y Carter 1981).

Las eferencias estriatales convergen en el globo pálido externo e interno y se continúan hacia la sustancia nigra pars reticulata (Loopjuit y Van der Kooy 1985). El globo pálido lateral da origen a una gran proyección hacia el núcleo subtalámico. Haber (1985) ha demostrado que el globo pálido externo proyecta débilmente al núcleo reticular, el cual proyecta también débilmente a otros núcleos talámicos pero no a la corteza.

El núcleo subtalámico parecido al estriado, recibe una proyección topográficamente organizada de la corteza cerebral (Carpenter 1981) y una entrada gabaérgica prominente desde el globo pálido (Carpenter et al. 1981). La proyección del núcleo subtalámico al globo pálido lateral puede ser un asa de retroalimentación negativa (Nauta et al. 1982). Este núcleo está también conectado reciprocamente con

el núcleo pedúnculo pontino y envía fibras eferentes menos prominentes al estriado y la sustancia nigra (Parent 1986). El estriado también proyecta a la sustancia nigra pars reticulata y a su vez recibe una proyección importante de la sustancia nigra pars compacta. El neurotransmisor clásico de las neuronas estriato-palidales y estriato-nigrales es el GABA (Parent 1986). Sin embargo, las neuronas estriatales que terminan en el globo pálido externo también contienen encefalina, mientras que aquellas que terminan en el globo pálido interno están enriquecidas con sustancia P (Parent 1990). También se ha demostrado que las proyecciones del núcleo subtalámico son excitadoras, posiblemente glutamatérgicas (Smith y Parent 1988). El neurotransmisor de las neuronas de la sustancia nigra pars compacta es la dopamina y estas neuronas nigro-estriatales proyectan a los territorios estriatales asociativos (cabeza del núcleo caudado) o al sensorimotor, los dos tercios caudales del putamen (Parent et al. 1983).

NEURONAS DEL CUERPO ESTRIADO

Ramón y Cajal (1911) dio un buen relato de la histología del cuerpo estriado del hombre visto con el método de Nissl: numerosas células pequeñas (8-10 μm) esféricas o poligonales, con escaso y pobre citoplasma coloreado; células largas con pocos gránulos cromáticos; y raras neuronas gigantes, de forma estrellada con un núcleo largo y el citoplasma ocupado con gránulos cromáticos.

De acuerdo con la nomenclatura usada actualmente, las últimas observaciones hechas sobre las neuronas intrínsecas del neostriado las permite clasificar en: neurona espinosa tipo I (mediana I), neurona espinosa tipo II (mediana II), neurona no espinosa tipo I, neurona espinosa tipo II (grande I), neurona no espinosa tipo III (mediana III) y la célula neurogliforme (pequeña) (Di Figlia et al. 1976).

El estriado contiene un pequeño número de interneuronas. Las interneuronas estriatales pueden ser clasificadas por identificación histoquímica o inmunohistoquímica del neurotransmisor o neuropéptido contenido en éstas. Se han descrito interneuronas gabaérgicas no espinosas, las cuales tienen un gran campo axónico (Bolam, et al. 1985), una pequeña población de neuronas que contienen substancia P, las cuales parecen ser interneuronas (Bolam, et al. 1983), y las interneuronas estriatales (neuronas grandes espinosas) que contienen colina acetiltransferasa (DiFligia, 1987). Otros grupos de interneuronas contienen tanto somatostatina y neuropeptido Y (Vicent y Johansson, 1983).

El estriado está compuesto primariamente de neuronas de proyección (Grofova 1979). Estudios en ratas sugieren que las neuronas estriatales dan origen a extensas proyecciones colaterales hacia ambos segmentos del globo pálido y la substancia nigra pars reticulata (Loopjuit y Va Der Kooy 1985).

Desde el punto de vista histológico todas las aferencias desde el exterior al estriado terminan en las partes más distales del árbol dendrítico y en particular sobre las espinas dendríticas, mientras que las aferencias provinientes de interneuronas (probablemente otras neuronas espinosas medianas) que contienen substancia P y GABA, terminan en las partes proximales del espacio dendrítico y sobre el cuerpo celular. Las aferencias desde las grandes interneuronas colinérgicas terminan en la porción intermedia (Smith y Bolam 1990).

No hay evidencia directa por marcación anterógrada desde la substancia nigra o el área tegmental ventral sobre las neuronas a las cuales proyectan esas aferencias mesencefálicas en el estriado. Sin embargo, los anticuerpos contra la tirosina hidroxilasa revelan botones catecolaminérgicos, los cuales dan fuertes evidencias de que tales entradas terminan extensamente sobre neuronas espinosas de tamaño mediano (estriato-nigrales) en la rata (Smith y Bolam 1990). Una de las principales funciones de la dopamina en el estriado es regular el flujo de información de las

neuronas que terminan en contactos asimétricos sobre las mismas espinas dendríticas. Se ha demostrado que tales terminales se originan en áreas corticales, incluyendo la neocorteza y el hipocampo (Freund et al. 1984). Actualmente, se postula inclusive una interacción glutamatérgica corticoestriatal y monoaminérgica en los ganglios basales con fuertes implicaciones en la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (Carlsson y Carlsson 1990).

Se puede concluir que el circuito estriatal incluye probablemente neuronas espinosas de tamaño mediano (con alta densidad de espinas) que proyectan desde el estriado y que reciben aferencias sobre sus espinas dendríticas desde la corteza y aferencias sobre los espacios y espinas dendríticas distales desde terminales dopaminérgicas. También existe una segunda clase de neuronas espinosas de tamaño mediano con muy baja densidad de espinas (Pasik et al. 1979) que pueden formar parte de otro circuito; este tipo de neuronas recibe aferencias sobre sus espacios dendríticos desde el núcleo parafascicular del tálamo y puede también ser una neurona de proyección y también recibir aferencias dopaminérgicas.

En resumen, el estriado es la estructura más grande de los ganglios basales. Este recibe proyecciones masivas desde la corteza cerebral, el tálamo y la sustancia nigra y las menos prominentes desde el globo pálido y el núcleo tegmental pedúnculo pontino. En cambio el estriado proyecta profusamente únicamente al globo pálido y la sustancia nigra. Histológicamente el estriado está compuesto de un gran número de neuronas de proyección medianas espinosas y un pequeño número de interneuronas de tamaño grande y mediano (Carpenter 1981, Parent 1986).

El CE interactúa con la corteza y los ganglios basales mediante un extenso arreglo de neurotransmisores y neuromoduladores. Las mayores aferencias que recibe el estriado provienen de la corteza y son glutamatérgicas. Además, el CE recibe proyecciones posiblemente excitatorias de los núcleos intralaminares del tálamo. Aproximadamente el 96 % de las células que componen la población neuronal en el

estriado son de tamaño medio con dendritas cubiertas densamente con espinas (neuronas espinosas medianas) y son invariablemente GABAérgicas. También recibe terminales dopaminérgicas, aunque en menor cantidad, de la corteza y del hipocampo. La población neuronal del CE incluye interneuronas tipificadas como no espinosas medianas y gigantes no espinosas. Las gigantes no espinosas son inmunoreactivas para la colin-acetil transferasa, marcan el 2% del total de este núcleo y reciben aferencias dopaminérgicas de la sustancia nigra. Otra clase de interneuronas no espinosas medianas contienen neuropéptido Y y somatostatina; estas neuronas también reciben aferencias corticales y dopaminérgicas de la sustancia nigra. Un tercer grupo celular consiste de interneuronas medianas a largas y con dendritas no espinosas. Estas neuronas son inmunoreactivas para la glutamato descarboxilasa lo que indica que utilizan GABA como neurotransmisor (Lovinger y Tyler 1996).

Se han descrito varios circuitos en los ganglios basales; probablemente el mejor caracterizado es el circuito sensori-motor, que inicia con proyecciones de las cortezas somatosensorial, motora primaria, premotora, y la motora suplementaria hacia el putamen el cual envía nuevamente aferencias de regreso a la corteza por medio de una serie de complejas interacciones con otras estructuras de los ganglios basales. Este es el circuito clásico extrapiramidal para el refinamiento del movimiento (Alexander et al. 1986). El circuito oculomotor se origina con proyecciones de la corteza parietal posterior, de la corteza prefrontal, y los campos oculares frontales al núcleo caudado y otros ganglios basales, que eventualmente provee de retroalimentación a la corteza. Los movimientos oculares son parcialmente controlados por este circuito (Albin et al. 1990). El circuito de asociación recibe entradas de la corteza parietal posterior, premotora y la prefrontal dorsolateral. Las conexiones aferentes proyectan a la cabeza del núcleo caudado que conecta con la sustancia nigra y los segmentos internos del globo pálido. Las vías aferentes

proyectan a la corteza prefrontal dorsolateral por medio del núcleo dorsomedial y ventral anterior del tálamo. Este circuito parece estar involucrado en algunas formas de almacenamiento de información. El último circuito, el límbico, incluye proyecciones del estriado ventral y la cabeza del núcleo caudado hacia el pálido ventral, sustancia nigra y segmentos internos del globo pálido. Este circuito está también involucrado en el almacenamiento de información y funciones cognitivas (Lovinger y Tyler 1996).

PARTICIPACIÓN DEL CUERPO ESTRIADO EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.

El CE se ha descrito como un centro importante en procesos integrativos como lo son el aprendizaje y la memoria. En el humano se ha implicado al circuito estriatal en la memoria implícita o de procedimiento (Mishkin 1987, Phillips y Carr 1987, Knowlton 1996); sin embargo en pacientes con enfermedades degenerativas como el Parkinson que afectan los ganglios basales muestran un deterioro en la memoria declarativa (Buytenhuijs 1994). Los primeros trabajos que se avocan a estudiar el papel del CE en la memoria, se realizan mediante la estimulación eléctrica y la ablación permanente o transitoria por la inactivación temporal por KCl en esta estructura. En estos estudios se observó que dichas manipulaciones provocan un efecto amnésico en tareas como la prevención pasiva y el condicionamiento motor (Chorover y Gross 1963; Wyres et al. 1968; Wyres y Deadwyler 1971). Divac (1975) demostró que la lesión del CE producía los mismos efectos que la ablación de la corteza prefrontal en una tarea de memoria de trabajo; en trabajos posteriores, al lesionar sólo el cuerpo estriado con ácido Kaínico que afecta principalmente los cuerpos neuronales sin dañar a las fibras de paso, observaron que dicha lesión deterioraba la memoria de trabajo, por lo que concluyó que la lesión del CE y no la

interrupción de las fibras de proyección de la corteza eran la causa de los deterioros encontrados (Kirkby 1978).

Prado-Alcalá demostró que al bloquear la actividad neuronal del estriado interfería con las etapas de consolidación y retención de respuestas instrumentales, tanto de un sólo ensayo como de varios ensayos, como es el caso de la tarea denominada prevención pasiva, la cual se basa en la administración de un choque eléctrico de baja intensidad. Particularmente en esta prueba observa que al administrar inyecciones de KCl y escopolamina (un antagonista colinérgico) en la cabeza del núcleo caudado se impide el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Prado-Alcalá 1980). Numerosos trabajos posteriores, en los que se investiga la participación de otros neurotransmisores en esta estructura han confirmado este resultado; así, la administración intraestriatal de fármacos anticolinérgicos provocan amnesia, en tanto que agonistas de los receptores a ACh facilitan la adquisición y consolidación de la memoria de prevención pasiva (Quirarte et al. 1993, Cruz-Morales et al. 1992, Solana y Prado-Alcalá 1990, Giordano y Prado-Alcalá 1986), o la administración de antagonistas GABAérgicos (Chávez et al. 1995 Cobos-Zapiain et al. 1996), producen amnesia. Los autores concluyen que el CE se encuentra críticamente involucrado en la memoria de prevención pasiva.

ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (ON) es una molécula gaseosa a la que se le ha implicado en una gran cantidad de fenómenos biológicos como mensajero químico en la comunicación celular. Se la ha identificado como el factor relajante derivado del endotelio el cual tiene un papel importante en diversos procesos fisiológicos, desde la respuesta mediada por la activación de los macrófagos en el sistema inmune, hasta la señalización sináptica en el sistema nervioso central (Bruhwylter et al. 1993).

La historia del ON es bastante peculiar y podríamos considerar que inicia con el trabajo de Robert Furchgott y Zawadzki en 1980, en el que demuestra que al privar a los vasos sanguíneos de su endotelio no se produce su relajación. El endotelio se compone de una sola capa celular que recubre el interior de los vasos sanguíneos, encontrándose en contacto con la capa muscular. En experimentos posteriores demostró que la acetilcolina actúa sobre los receptores localizados en las células endoteliales, esto provoca la liberación de una molécula (hasta ese entonces desconocida) que llega a la capa muscular adyacente y la relaja. Inmediatamente se le nombró "factor relajante derivado del endotelio" (FRDE; Furchgott y Zawadzki 1980). Trabajos posteriores de Furchgott y Louis Ignarro resultaron en un descubrimiento importante: demostraron que el FRDE estimula la formación de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) conocida por su acción como segundo mensajero (Furchgott y Jothianandan 1991). No fue sino hasta 1986 que el grupo de Salvador Moncada estimuló la liberación de FRDE de células endoteliales y registraron su efecto relajante sobre el músculo liso. Al mismo tiempo registraron la cantidad de ON liberado por el endotelio. La cantidad liberada de ON por el endotelio era suficiente para explicar la relajación del músculo liso y por lo tanto llegaron a la conclusión de que el ON y el FRDE eran la misma molécula (Moncada et al, 1986). El primer indicio de que el ON pudiera tener relevancia en el sistema nervioso central lo obtiene Takeo Deguchi; él observa que la síntesis de ON en el cerebro requiere de arginina (Deguchi y Yushioka 1982). Por otra parte, el grupo de Salvador Moncada en 1989 relacionó la presencia de arginina y la síntesis de ON con la formación de GMPc. Él mismo descubrió que en preparaciones de tejido cerebral se producía la síntesis de ON (Moncada et al., 1989). Por la misma época Garthwaite observó que al estimular cultivos de tejido cerebral administrando glutamato obtenía una sustancia de vida muy corta que posteriormente se identificó como ON. Snyder en 1989, inició investigaciones sobre el ON y la transmisión sináptica desarrollando una técnica la

cual medía la cantidad de ON indirectamente cuantificando la citrulina liberada. Mediante esta técnica pudo observar que al estimular los receptores tipo NMDA aumentaba de manera significativa y a una rapidez considerable (comparada con la velocidad enzimática) la producción de ON. Moncada descubrió que para sintetizar ON era necesario la presencia de calcio añadiendo una pieza más al rompecabezas, ya que el ión calcio está asociado a la calmodulina, que explicaba la relación entre la aplicación de NMDA y el aumento de ON; siguiendo en esta línea, sus experimentos se enfocaron en la localización de la óxido nítrico sintetasa (ONS) en todo el cerebro. Para el marcaje de las células productoras de ON se adaptó la técnica desarrollada por Bollman y Pearse (1974), que teñía ciertas neuronas de azul al unirse a la NADPH; por ello se les dio el nombre de neuronas diaforásicas. Al investigar más estas neuronas, descubrieron que las teñidas de azul, lo que en realidad marcaban era la actividad de la ONS.

Se ha propuesto que el ON podría tener una función de mensajero intracelular a nivel local. Este mensajero en las células endoteliales y las neuronas es sintetizado a partir de la L-arginina, de uno o de los dos nitrógenos del grupo terminal guanidino, mediante la ONS; de manera similar, varios investigadores han descrito su actividad en los macrófagos y probablemente en otras células fagocitosas (Bruhwylter et al. 1993).

El ON puede tener diversos orígenes en el cerebro, ya que puede provenir de células endoteliales de los capilares cerebrales, de la microglía por inmunestimulación, de diversas arterias ricamente innervadas por nervios vasodilatadores y por la estimulación de receptores a glutamato del tipo NMDA en las neuronas.

La ruta metabólica principal de la arginina es el ciclo de la urea; en este camino, a partir de la arginina y por medio de la arginasa, se produce ornitina, que a su vez al integrarse a la carbamilfosfatasa tiene como producto a la citrulina; esta ruta es muy conocida; sin embargo en el cerebro está ausente la carbamilfosfatasa, que es

la enzima limitante para la formación de citrulina a partir de la ornitina y por ello se propuso que el ONS actúa como un eslabón para producir ON como un coproducto de la síntesis de citrulina (Figura 3, Garthwaite 1991).

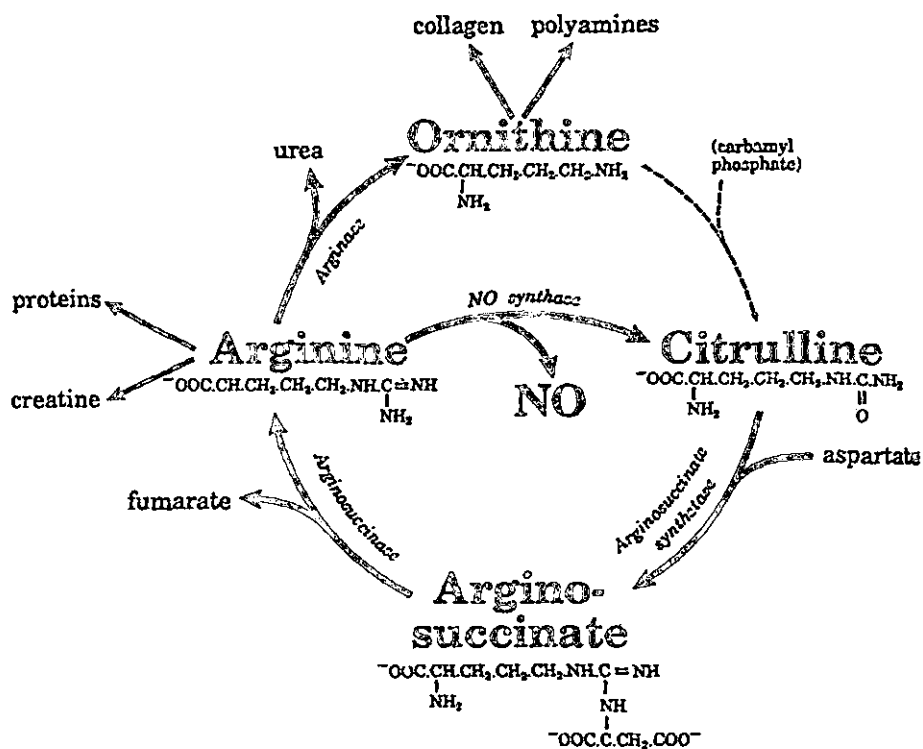


Figura 3. Síntesis del óxido nítrico (tomada de Garthwaite 1991)

Esta actividad de la enzima puede ser bloqueada por derivados de la L-arginina que actúan como inhibidores competitivos de la ONS como la L-N^G-metilarginina (L-Mearg), el 7-nitroindazol (7-NI) y el metilester de la nitro-L-arginina (L-NAME) entre otros.

Se han descubierto varias isoformas de la ONS que se dividen en dos grupos: uno dependiente de la enzima calcio-calmodulina; en este grupo se encuentran las isoformas endotelial y neural (Figura 4). El otro grupo es independiente de calcio y es activado por citoquinas (Marletta et al. 1988); este último se encuentra en los macrófagos donde su activación está determinada directamente por inmunestimulación.

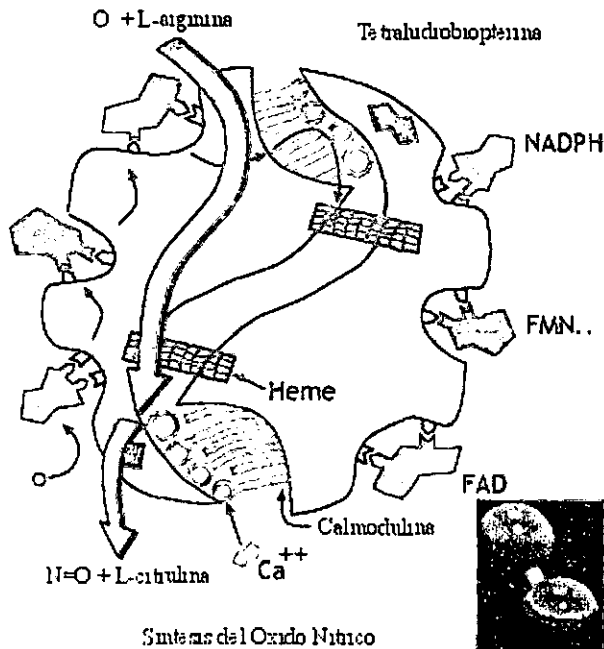


Figura 4. Síntesis de ON y cofactores de la óxido nítrico sintetasa

La ONS parece ser una enzima altamente regulada, ya que puede ser fosforilada por cAMP-dependiente de proteína cinasa activada por cGMP en concentraciones fisiológicas (Müller 1996), proteína cinasa C, y calcio-calmodulina dependiente de proteína cinasa II (Bredt y Snyder 1992). La activación de las isoformas neural de la ONS es dependiente de calcio; debido a que el calcio citosólico no es suficiente para la activación de la ONS, los receptores a NMDA juegan un papel importante para permitir una despolarización suficiente para provocar la entrada de calcio y activar a la ONS. La relación entre la estimulación de los receptores a NMDA y la biosíntesis de ON se ha demostrado ampliamente (Garthwaite et al. 1988). El glutamato liberado de las terminales presinápticas actúa en dos tipos de receptores: NMDA y no-NMDA. Los receptores tipo NMDA están acoplados a un canal de sodio/potasio, y la activación de estos provoca una entrada importante de calcio. Se conoce que durante una estimulación de baja frecuencia, los receptores no-NMDA median más rápidamente la excitación sináptica, ya que los canales asociados a receptores NMDA son bloqueados por magnesio. Una depolarización de larga duración de la membrana permite remover el magnesio de los canales asociados a los receptores a NMDA, dejando entrar una corriente de calcio que active la ONS, dando como resultado la difusión de ON a través de la membrana postsináptica y el espacio sináptico para activar a la guanilato ciclasa en la neurona presináptica (Figura 5, Garthwaite 1991). Aunado a esto Price et al. (1993) demostró que las neuronas que expresaban más receptores a NMDA eran las mismas que expresaban la ONS, por lo que se ha propuesto al ON como mensajero retrógrado debido a que difunde de la neurona postsináptica hacia la neurona presináptica, además de que no se almacena en vesículas sinápticas, sino que se sintetiza de acuerdo a la demanda metabólica (Bredt y Snyder 1992). En recientes trabajos se ha demostrado que existen otros subtipos de receptores (colinérgicos), además de los de glutamato que pueden activar a la ONS (Vincent y Hope 1992).

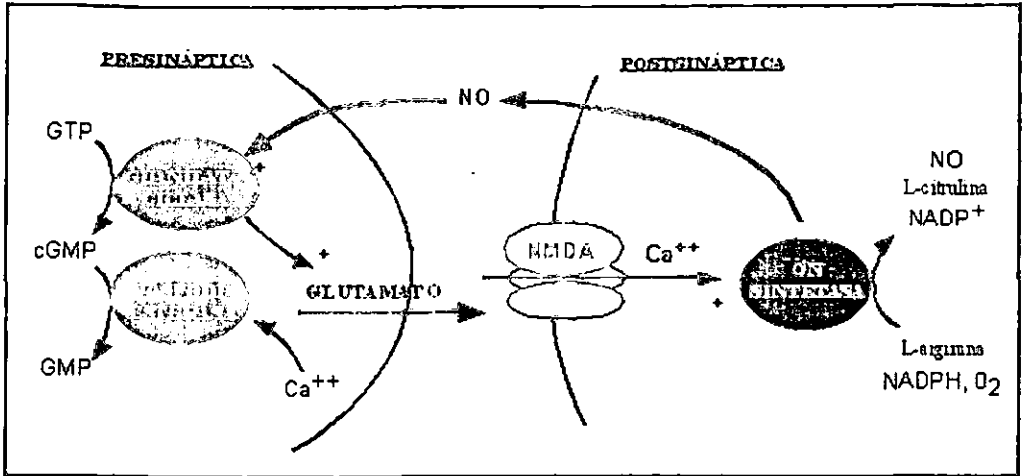


Figura 5. Acción del ON sobre la neurona presináptica en respuesta a la activación de los receptores tipo NMDA

La vida media del ON es aún desconocida pero la actividad de éste disminuye al 50% en alrededor de cuatro segundos. Parece ser que este tiempo es suficiente para que el ON difunda a través de la membrana postsináptica a la presináptica y active a la guanilato ciclasa (Bruhwylter et al. 1993).

Para conocer la distribución en el sistema nervioso central de la ONS se han utilizado técnicas histoquímicas, mediante la cual se ha demostrado una dispersión irregular de la enzima en todo el cerebro (Vincent y Kimura 1992); así, tenemos una abundancia de la enzima en el cerebelo y en el bulbo olfatorio, en los colículos superiores e inferiores, en el giro dentado del hipocampo, en los islotes de Calleja, en la banda diagonal de Broca y en las capas superficiales de la corteza. En esta última representan el 1 o 2 % de las neuronas inmunoreactivas y en el CE entre 5 y 10 %. En esta estructura, la ONS se encuentra dispersa tanto a los somas como en el neuropilo de las neuronas espinosas medianas y grandes (Price et al. 1993). Es importante

señalar que a pesar de la poca abundancia de células productoras de ON en el CE, el neuropilo de las mismas se encuentra sumamente ramificado, de tal suerte que se supone que la mayor parte de las otras poblaciones neuronales de esta estructura se encuentran inervadas por ellas o podían inervarlas, lo cual es importante en las funciones que se les han atribuido.

El ON se ha implicado en diversas funciones del sistema nervioso central. Se ha sugerido que se encuentra involucrado neurotóxicamente en las enfermedades de Alzheimer y de Huntington, así como en los daños incluidos por isquemia, entre otras. Además de su participación en estos procesos patológicos, el ON parece desempeñar un papel importante en los fenómenos de plasticidad sináptica (neural) como la potenciación a largo plazo (PLP), la depresión a largo plazo (DLP), y en el aprendizaje y la formación de la memoria.

La PLP es un proceso bastante estudiado que consiste en el incremento de la eficacia sináptica, durante periodos prolongados (en el orden de días) observada después de una breve estimulación tónica de la neurona presináptica, por lo que se le ha propuesto como un modelo celular del aprendizaje. La producción de ON en el cerebro y la PLP es inducida por eventos bioquímicos similares: la activación de receptores tipo NMDA y el incremento de los niveles intracelulares de calcio (Bliss y Collingridge 1993).

La DLP en el cerebelo es un modelo de plasticidad sináptica en donde al estimular en conjunto las fibras ascendentes y las fibras paralelas de las células de Purkinje, evocan este fenómeno que consiste en una disminución en la respuesta de la neurona postsináptica. Este fenómeno se ha implicado como el mecanismo celular para ciertas formas de aprendizaje motor (Ito 1989).

PAPEL DEL ON EN LA ACTIVIDAD DEPENDIENTE DEL USO

Las neuronas del sistema nervioso central de los mamíferos son capaces de cambiar los patrones de sus conexiones sinápticas. Esta plasticidad dependiente de la actividad es un posible mecanismo por el cual los animales aprenden y recuerdan. (Chapman et al. 1992). Evidencia reciente sugiere que el ON participa en procesos de plasticidad sináptica tanto en el cerebelo, donde se le involucra con la DLP de las células de Purkinje como en el hipocampo, donde participa en la PLP (Yanigihara y Kiondo 1996, O'Dell et al. 1991).

Shibuki y Okada (1991) demostraron que a la liberación de ON se presentaba después de la estimulación de las fibras ascendentes y que se bloqueaba este efecto con la administración de un inhibidor de la ONS, la N^G -monometil-L-arginina o con un captador de ON, la hemoglobina. Sin embargo, el donador de ON nitroprusiato de sodio (NPS), o un inductor de la síntesis de ON, el cGMP, son capaces de sustituir al ON para estimular las fibras ascendentes en la evocación de la DLP (Bredt y Snyder 1992).

Al examinar la PLP en rebanadas hipocampales de la región CA1, Boheme et al. (1993) encontraron que el inhibidor N^w -nitro--L-arginina ($0.1 \mu M$) bloquea completamente la PLP, revirtiendo este efecto con L-arginina, además, al administrar nitroprusiato de sodio se produce un aumento considerable en la eficacia sináptica independiente de la tetanización inducida de la PLP. O'Dell, et al (1991), también observaron que la PLP de CA1 puede de ser inhibida mediante dos métodos: 1) la nitro-arginina, la cual bloquea la PLP al ingresar en la célula postsináptica, y 2) hemoglobina, que no es captada por las neuronas y probablemente una al ON que difunde de la célula postsináptica a el espacio extracelular. Ellos mismos encontraron que el aumento espontáneo de ON liberaba transmisores del cultivo de células piramidales del hipocampo, lo que pone en evidencia que el ON puede servir como

un factor retrogrado en la PLP. Sin embargo, no en todos los laboratorios se han encontrado reducciones significativas de PLP en presencia de inhibidores de la ONS; esto es, los niveles de potenciación producidos, son moderados por un condicionamiento de un sólo tren y esta potenciación no es disminuida por los inhibidores de la ONS aún en concentraciones altas (O'Dell et al. 1994). Resultados similares se han observado en la DLP (Linden y Connor 1992).

PAPEL DEL ON EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

La relación entre la producción de ON con el aprendizaje y la memoria en animales íntegros, fue demostrada por primera vez en los trabajos de Chapman et al.,(1992) al administrar L-NAME, i.p., a ratas durante el entrenamiento en un laberinto acuático y durante el condicionamiento de la membrana nictitante en conejos. El primero, es un aprendizaje complejo de tipo especial que involucra al hipocampo, mientras que el segundo, es un proceso elemental de asociación en el cual el cerebelo juega un importante papel. Las ratas y conejos recibieron L-NAME durante los períodos de entrenamiento, mostrando un deterioro en la adquisición. La misma droga en la misma dosis no afectó la expresión de la memoria en otros animales entrenados sin droga. Los autores concluyeron que el ON es importante para la adquisición de ambas formas de aprendizaje, en tanto que para la retención no es necesario. Hölsher y Rose (1992) demostraron que la inyección de L-NAME antes de la adquisición de un condicionamiento aversivo en pollos, provocaba un efecto amnésico, que podía revertirse mediante la administración previa de dosis mayores de L-arginina, la cual compite con el inhibidor. Ohno, et al.(1993), inyectaron intrahipocampalmente L-NAME a ratas, 10 minutos antes de ser entrenadas en una tarea de prevención pasiva, encontrando un deterioro de la memoria en la prueba a la que se sometían los sujetos. Huang y Lee (1995), reportaron que el ON juega un

papel importante en el proceso de consolidación en la prevención pasiva. Encontraron que al aplicar directamente *NPS* en el giro dentado del hipocampo se aumentaba la capacidad de retención. Ésta es la primera evidencia, *in vivo*, de que un donador de ON facilita la retención. Sin embargo, en dosis altas el *NPS* induce un efecto opuesto (Huang et al. 1995). Para apoyar estos hallazgos, administraron también un inhibidor de ON, el L-Mearg logrando una disminución en la retención que se contrarresta con la coadministración de L-arginina, precursor del ON. Finalmente, se han reportado efectos significativos en un modelo de prevención pasiva, al administrar un inhibidor de la ONS en el hipocampo 10 minutos antes de la tarea o inmediatamente después de está, pero al aplicar el inhibidor 60 minutos post-entrenamiento no encontró ningún efecto (Bernabeu, et al. 1995). Estos efectos conductuales coinciden con la cinética de liberación de ON en dicha estructura.

Robertson et al. (1995) presentó la primera evidencia de que el ON participa también en el aprendizaje de invertebrados. Las inyecciones intramusculares del inhibidor de la ONS bloquea el aprendizaje táctil en *Octopus vulgaris*. Los pulpos controles aprendieron el paradigma táctil, pero ninguno de los ocho aprendió al inhibir la enzima. Otra evidencia de que el ON es necesario en el aprendizaje de invertebrados lo presenta Jaffe y Blanco (1992). Utilizo grillos sedientos entrenados para elegir un lado en un laberinto simétrico en “y” usando como reforzador el agua. Estos insectos retienen el aprendizaje de la prueba por 24 horas. Al prepararlos en un modelo de anoxia aplicada inmediatamente después produce amnesia retrograda. Inyecciones de aminoácidos seleccionados y NMDA; o morfina; e inhibidores a NMDA, ON y opioides antes del aprendizaje espacial en el laberinto espacial. alanina, arginina, glutamina, morfina o NMDA antes del entrenamiento bloquean la acción amnésica de la anoxia. La naloxona un antagonista opioide, bloque la formación de la memoria a largo plazo, pero no el aprendizaje mientras que la hemoglobina o el APV, el ON y los antagonistas NMDA respectivamente, bloquean ambos procesos. El

antiamnésico de la morfina o la arginina, pero no de la alanina o el NMDA fue bloqueado por naloxona. Los resultados sugieren el involucramiento de los receptores a NMDA y el ON en el fenómeno de la LTP en la consolidación de la memoria y el aprendizaje, mientras que otros sistemas neuromodulatorios relacionados a la arginina y receptores opioides, son solo involucrados en la consolidación de la memoria. Müller 1996 demostró que el ON esta implicado en la plasticidad neural remarcadamente en procesos de aprendizaje y memoria de las abejas.

JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de los trabajos citados se han centrado en el estudio del ON en la fase de adquisición del condicionamiento, ya que la evidencia indica que éste parece tener mayor relevancia en los momentos iniciales de la formación de la memoria; esto implica la adición de grupos control para descartar efectos sobre procesos no mnemónicos que conciernen a la tarea y que pudieran afectar indirectamente la memoria, como procesos preceptuales, motivacionales, atentos, estresantes, motores, etc. Esto sucede con todas aquellas tareas que requieren múltiples ensayos para su adquisición (aprendizaje) tales como en la memoria de trabajo (discriminación de objetos Cobb et al. 1995), la resolución de laberintos, el reflejo vestibulo-ocular en peces (Li et al 1995), el condicionamiento de la respuesta de extensión de la probóscide en abejas (Müller 1996); lo mismo sucede en pruebas de un sólo ensayo cuando los tratamientos se administran antes del entrenamiento; tal es el caso de los estudios hechos con pruebas de administración de choques eléctricos como la prevención pasiva (Fin et al. 1995, Bernabeu et al. 1995), o en la evitación de sustancias aversivas (Hölscher y Rose 1993). Consecuentemente, en este estudio se eligió una forma de aprendizaje de un solo ensayo de entrenamiento y los

tratamientos farmacológicos se hicieron después de éste. De tal manera, en el presente trabajo se plantea lo siguiente.

OBJETIVO

Evaluar el papel del óxido nítrico en el cuerpo estriado durante los procesos de consolidación y evocación en la memoria de prevención pasiva de la rata, mediante la administración *in situ* de nitro-L-arginina-metilester (L-NAME).

HIPÓTESIS.

Si el óxido nítrico producido en el cuerpo estriado es un elemento esencial para la formación y evocación de la memoria de prevención pasiva; al bloquear su formación por la inactivación de la óxido nítrico sintetasa, se observará un déficit en la ejecución de la prueba.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 300 a 350 gramos del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM; los animales fueron alojados individualmente en cajas de acrílico con libre acceso a comida y agua.

Cirugía

Se anestesiaron con ketamina 100 mg/kg., y se implantaron cánulas bilaterales de acero inoxidable (calibre 23) utilizando un estereotáxico "Stoelting" mediante las

técnicas estereotaxicas convencionales, dirigidas al cuadrante anterodorsal del cuerpo estriado (A-P= 0.0 L= ± 3 DV= 4.5, de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson, 1982) fijándolas al cráneo con un tornillo de acero inoxidable y acrílico dental. Los sujetos se inyectaron con antibiótico y se mantuvieron en recuperación por un período de siete días después de la operación.

Modelo de prevención pasiva

Aparatos

Se utilizó una cámara de condicionamiento dividida en dos compartimentos del mismo tamaño (30 x 30 x 30 cm) construida de madera; dichos compartimentos se encuentran separados por una puerta deslizable. Las tapaderas de los compartimentos y la puerta es de acrílico anaranjado transparente. Uno de los compartimentos (de seguridad), está iluminado con un foco de 15 watts, su piso está formado por barras de acero inoxidable. El piso del compartimiento oscuro (de castigo) está compuesto por dos placas de acero inoxidable conectadas a un generador de choques eléctricos (LVE / BRS modelo PG-901); cada placa se continúa en forma de “v” con las paredes del compartimiento, lo cual permite que los sujetos se encuentren en contacto con ellas todo el tiempo y pueda recibir el choque eléctrico. La cámara de condicionamiento se localiza dentro de un cuarto oscuro y sonoamortiguado provisto de ruido de fondo.

Procedimiento

Entrenamiento y Prueba

Durante la única sesión de entrenamiento o de adquisición, cada sujeto se introdujo al compartimiento iluminado durante diez segundos; transcurrido este tiempo se abrió la puerta y se midió el tiempo que tardaba en cruzar al compartimiento de castigo (latencia de adquisición). En ese momento se cerró la

puerta y se aplicó un choque de 2.5 mA durante cinco segundos inescapables. Posteriormente, se abrió la puerta y se registro el tiempo que tardó en regresar al compartimiento iluminado (latencia de escape), en donde se mantuvo al sujeto durante treinta segundos más para después ser retirado y devuelto a su caja hogar. Veinticuatro horas después, en la sesión de prueba o retención, se volvió a introducir a cada sujeto al compartimiento iluminado de la misma manera que en la sesión de adquisición, sólo que sin aplicar el choque y se midió la latencia que tardó en pasar al compartimiento oscuro (latencia de retención). Si el sujeto no cruzaba en 600 segundos se daba por terminada la sesión y se asignaba una latencia de retención de 600 lo que indicaba una optima resolución de la prueba.

Tratamientos y Grupos

El inhibidor selectivo de la ONS, el L-NAME y el precursor del ON, la L-arginina fueron administrados intracerebralmente disueltos en solución salina (NaCl 0.9%). La inyección se aplicó por medio de las cánulas guía con una aguja dental (calibre 30) conectada por un tubo de polietileno a una microjeringa Hamilton de 50- μ l. Cada fármaco fue cargado en el tubo de polietileno y se inyectó 1 μ l por hemisferio con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de 1 μ l/min; después de la inyección se dejaron las agujas un minuto más antes de retirarlas para facilitar la difusión libre de los fármacos en el cerebro. La distribución de los animales en los grupos para cada serie experimental fue como se describe a continuación:

En el Primer experimento se evaluó el bloqueo de la ONS por el L-NAME a diferentes dosis :

GRUPO	DOSIS L-NAME μ M	N° DE RATAS
SALINA	0	11
50	50	11
100	100	11
200	200	9
400	400	8

Segundo experimento se evaluó la especificidad del bloqueo provocado por el L-NAME al antagonizar por desplazamiento con L-Arginina :

GRUPO	DOSIS	N° DE RATAS
CONTROL	SOL. SALINA	11
200	L-NAME 200 μ M	9
L-ARG+L-NAME	L-ARGININA 8mM L-NAME 200 μ M	9
L-ARG	L-ARGININA 8mM	8

Tercer experimento se diseñó para determinar el periodo de tiempo crítico en el que es necesario el ON en la fase de consolidación :

GRUPO	DOSES L-NAME μ M	Nº DE RATAS
SALINA	0	11
0'	200	9
10'	200	8
20'	200	10
30'	200	8

Cuarto experimento. Se evaluó el efecto del L-NAME en la fase de evocación para esto se utilizó el mismo grupo de ratas desde un inicio siendo su propio control, el número de ratas utilizadas fue de 9, todas concluyeron el experimento.

Histología

Una vez terminados los experimentos conductuales los animales fueron anestesiados y perfundidos intracardialmente con una solución isotónica de NaCl seguida de formol al 10%; los cerebros se removieron y se guardaron en formol, durante una semana. Se realizaron cortes coronales de 100 μ m que fueron teñidos con el método de Nissl para determinar la localización de las cánulas y comprobar que las inyecciones se realizaron en el cuerpo estriado, los animales en los que no se encontraban las cánulas en el cuerpo estriado fueron desechados y no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico de los resultados.

Estadística

Los resultados de las latencias se analizaron comparando las latencias de adquisición y retención de los distintos grupos. Debido a que las distribuciones de los

registros fueron cortados a 600 segundos, se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de U de Mann-Whitney para realizar comparaciones entre los grupos (Siegel 1995), utilizando el programa de análisis estadístico desarrollado por el Dr. Miguel Ángel Guevara de la Facultad de Psicología UNAM (versión 1.0).

EXPERIMENTO 1. Efecto del L-NAME sobre la consolidación de la memoria de prevención pasiva.

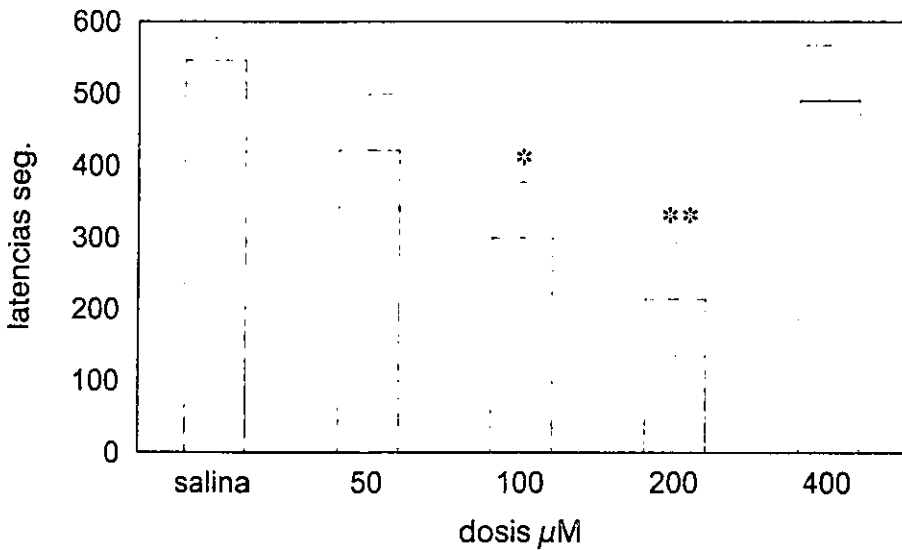
Procedimiento

En el primer experimento, se construyó una curva dosis respuesta para observar el efecto del L-NAME sobre la consolidación de la prevención pasiva. Se entrenaron 5 grupos independientes de ratas en la prueba de prevención pasiva de acuerdo al protocolo descrito en el método; al concluir la sesión de adquisición a cada grupo se le inyectó el inhibidor de la ONS (L-NAME) inmediatamente después, en dosis de 0, 50, 100, 200 y 400 μM . El volumen inyectado en cada rata fue de 1 μl por hemisferio para todos los grupos, a una velocidad constante de 1 μl /min. Al terminar la inyección se mantuvieron insertadas las cánulas inyectoras durante un minuto más en el cerebro. Al día siguiente, libre del efecto del L-NAME, se efectuó la prueba de retención como se describió anteriormente.

Resultados

No se encontraron diferencias estadísticas en las latencias de adquisición entre los grupos. En cuanto a las latencias de retención, en la Gráfica 1, se observan los promedios de los grupos a las diferentes dosis de L-NAME inyectadas inmediatamente después del entrenamiento de la tarea de prevención pasiva. Existen efectos amnésicos que describen una curva dosis-repuesta y que se perciben como

una caída de la latencia de retención durante la ejecución de la prueba, alcanzando diferencias significativas $H= 12.39$, $p < 0.02$ (ANOVA de Kruskal Wallis). En el análisis de post-hoc entre los grupos, la U de Mann-Whitney reveló una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos inyectados con $100 \mu\text{M}$ ($p < 0.04$) y $200 \mu\text{M}$ ($p < 0.009$); para la dosis de $50 \mu\text{M}$ y $400 \mu\text{M}$ no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). Concluimos que el ON estriatal participa en la consolidación de la memoria de prevención pasiva.



Gráfica 1. Efecto del L-NAME sobre la consolidación de la memoria de prevención pasiva. * $p < 0.04$ ** $p < 0.009$

EXPERIMENTO 2. La L-Arginina revierte el efecto amnésico del L-NAME.

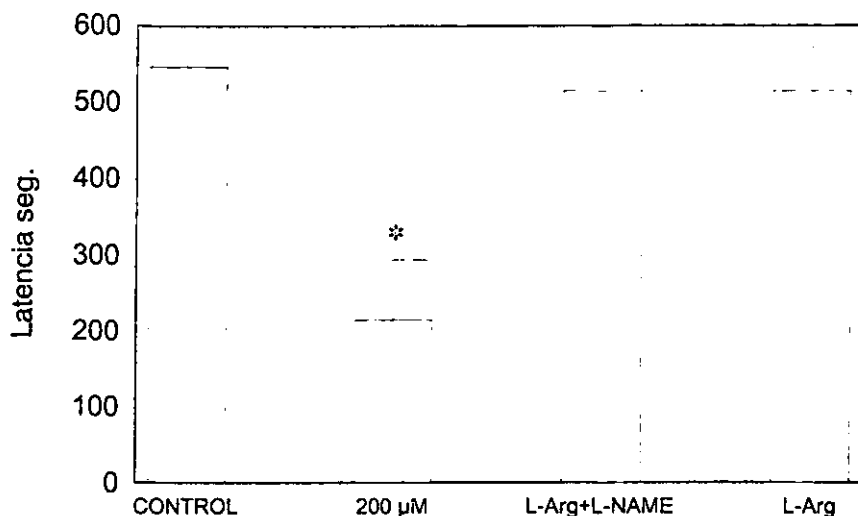
El L-NAME es un bloqueador reversible de la ONS. Una manera de comprobar que su efecto es selectivo sobre la enzima es mediante un ensayo de competencia por el sustrato (L-Arginina). Este experimento se realizó para comprobar la reversibilidad del L-NAME mediante un ensayo de competencia por sustrato.

Procedimiento

Se entrenaron dos grupos en la tarea de prevención pasiva; al término de la sesión de adquisición a un grupo se le inyectó 1 μ l del precursor del ON (L-Arginina) en dosis de 8 mM más 1 μ l L-NAME (200 μ M); el otro grupo fue inyectado sólo con L-Arginina. Al día siguiente se realizó la prueba de retención, libre de fármacos.

Resultados

Los resultados de la administración de 8 mM del precursor del ON L-Arginina un minuto antes de aplicar el L-NAME 200 μ M se observa en la Gráfica 2. La actividad amnésica de la dosis de 200 μ M que obtuvimos en la curva dosis-respuesta fue atenuado por la acción de la L-Arginina al competir con el inhibidor, ya que no hubo diferencias significativas con respecto al control. Estos datos confirman la especificidad del L-NAME, ya que no se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$ entre el grupo control y el inyectado con L-Arginina más L-NAME (Gráfica 2). La administración de L-Arginina únicamente no provocó ninguna alteración sobre la respuesta de prevención pasiva. Por lo que concluimos El efecto amnésico provocado por el L-NAME es específico, ya que puede revertirse al coadministrar el inhibidor de ONS con el precursor L-Arginina, se logrando revertir el deterioro en la consolidación de la memoria.



Gráfica 2. Antagonismo por competencia del L-NAME (200 µM) y L-Arginina (8 mM) durante la consolidación de la memoria de prevención pasiva. *p < 0.009

Experimento 3. Efecto del L-NAME a distintos tiempos post-adquisición.

Debido a que se ha observado que el ON interviene en las etapas iniciales de la PLP proceso conocido como inducción, pero no en etapas tardías (mantenimiento), se ha postulado, por analogía, que participa igualmente en la adquisición y la formación temprana de la memoria (Chapman et al. 1992). Por lo tanto en el tercer experimento se decidió comprobar la influencia del tiempo, durante el período de consolidación sobre el efecto amnésico provocado por el bloqueo de la ONS.

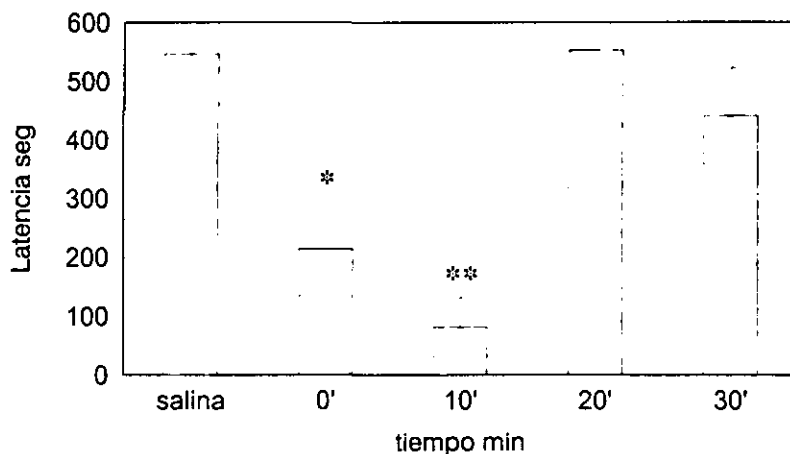
Procedimiento

Se entrenaron 4 grupos de ratas como se describió anteriormente en el Método y se inyectó 1µl L-NAME (200 µM) por lado a diferentes intervalos de tiempo, 10,

20 y 30 minutos contados a partir de la finalización de la adquisición. Al día siguiente se realizó la prueba de retención como en todos los experimentos anteriores.

Resultados

La falta de producción de ON durante los primeros 30 minutos de la etapa de consolidación provocó un efecto significativo entre los grupos (ANOVA de Kruskal Wallis $H= 24.14$ $p < 0.0001$), observando diferencias significativas en el grupo de diez minutos post-entrenamiento ($p < 0.0005$), el cual se recupera rápidamente en los grupos de veinte y treinta minutos posteriores al entrenamiento (Gráfica 3). Por lo tanto concluimos que el ON interviene en la etapa inicial (0 y 10 minutos) de la consolidación de la memoria de prevención pasiva.



Gráfica 3. Efecto del L-NAME (200 μ M) durante el período crítico de consolidación de la memoria de prevención pasiva.
* $p < 0.009$ *** $p < 0.0005$

EXPERIMENTO 4. Efecto del L-NAME sobre la evocación de la tarea de prevención pasiva.

A la fecha, no se ha comprobado el papel del ON en el proceso de evocación de la memoria, es decir el acceso y uso de la información almacenada. Este experimento lo realizamos para evaluar los datos de la literatura que afirman que el ON no participa en tal fase de evocación. Por ello, se diseñó este experimento.

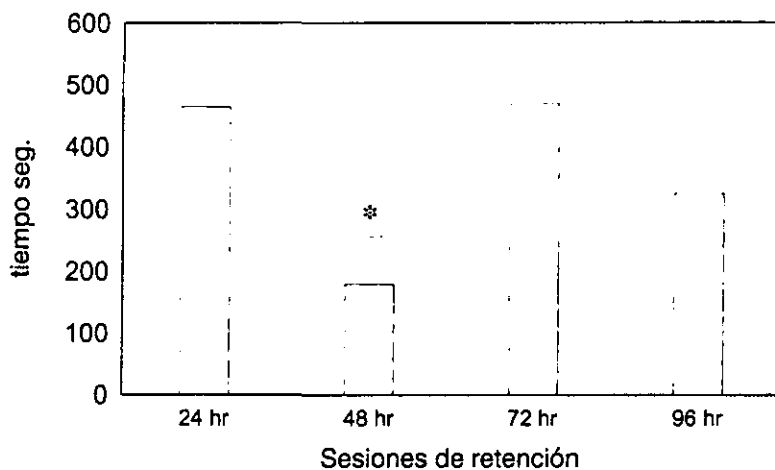
Procedimiento

Para evaluar el efecto del L-NAME en la evocación se utilizaron como antecedentes directos los resultados obtenidos en la fase de consolidación; así, se entrenaron nueve ratas como se describió anteriormente y se probaron en una primera sesión, comprobando que las ratas hubieran aprendido (i.e. tuvieran una latencia de retención >500 segundos). En la siguiente sesión es decir 48 horas después del entrenamiento de prevención pasiva, se les administró la dosis de L-NAME más efectiva (200 μ M) que obtuvimos en el Experimento 1 en el intervalo de tiempo más significativo que obtuvimos en el Experimento 3 (diez minutos de latencia entre el fármaco y la prueba). Para evaluar la evocación se aplicó el inhibidor de la ONS cuarenta y ocho horas después del entrenamiento y diez minutos antes de que las ratas entraran a la sesión de prueba; seguimos el desarrollo de la prueba en dos sesiones posteriores a la inyección libres de cualquier influencia farmacológica.

Resultados

En los resultados se puede observar un bloqueo de la evocación de la memoria de acuerdo al análisis de varianza de Kruskal-Wallis $H= 10.49$ $p<0.02$; en análisis post-hoc utilizando la U de Mann Whitney encontramos diferencias significativas entre la sesión en que aplicamos el L-NAME contra la primera $p<0.02$ y tercera

sesión $p < 0.02$ que se probaron a los animales libres de la influencia del fármaco (Gráfica 4). Estos resultados nos permiten concluir que el ON sintetizado en el cuerpo estriado es necesario para evocar la memoria de prevención pasiva.



Gráfica 4. Todos los animales fueron evaluados previamente (24 hr) en la tarea de prevención pasiva. Se inyectó L-NAME (200 μM) diez minutos antes de la evocación (48 hr), en las retenciones siguientes no se aplicó el inhibidor. * $p < 0.02$

DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el objeto de elucidar el papel que tiene el ON en el CE durante dos fases del aprendizaje que han sido poco estudiados: la consolidación y la evocación de la memoria. Debido probablemente a la estrecha asociación que se ha hecho entre los fenómenos de PLP y DLP con el aprendizaje en animales íntegros, la zona estudiada con mas frecuencia ha sido el hipocampo, dejándose de lado otros núcleos cerebrales típicamente implicados en procesos mnémicos, como la amígdala, la corteza cerebral, los núcleos basales del cerebro anterior y el cuerpo estriado. Este último núcleo ha sido implicado en diversas formas de aprendizaje y en particular, se tiene suficiente información respecto a su participación en la respuesta de prevención pasiva (Quirarte et al. 1993, Cruz-Morales et al. 1992, Solana et al. 1990, Giordano et al. 1986). Por esta razón decidimos utilizar este modelo para evaluar la forma en que interviene el ON en dicha estructura

A continuación se discuten los hallazgos del presente trabajo a la luz de las evidencias disponibles con el fin de proporcionar un panorama completo de cómo podría el ON modular el aprendizaje.

Los resultados indican que el ON en el cuerpo estriado participa en la formación de la memoria de prevención pasiva, de manera similar a lo encontrado en otros laboratorios que han trabajado en otras estructuras (Huang et al. 1994, Fin et al 1995). Dado que se entrenaron a las ratas en condiciones óptimas, esto es, libres de fármacos, lo cual nos permitió asegurarnos que todas las manipulaciones realizadas en el SNC no interfirieran con el proceso de adquisición, podemos decir con certeza que la falta de ON afectó exclusivamente la fase de consolidación de la memoria. Esta afirmación está basada en dos series de experimentos: primero, el efecto dosis-respuesta sobre las latencias de retención en la cual dos dosis efectivas de 100 y 200

μM provocaron amnesia; es importante resaltar que el choque eléctrico que aplicamos fue de 2.5 mA y la duración fue de 5 segundos, logrando obtener resultados significativos, a diferencia de otros trabajos que reportan el bloqueo de la memoria en prevención pasiva utilizando choques eléctricos de menor intensidad y menor duración (Bernabeu et al 1995, Huang et al. 1995). La ausencia de efecto de 400 μM en la curva dosis-respuesta no la esperábamos; ésta puede ser causada por que la dosis de L-NAME es muy alta para el cuerpo estriado. Existen reportes de que la inhibición de la ONS o la captura del ON que se encuentra libre en el cerebelo puede actuar sobre el sistema motor de los gatos (Yanagihara y Kondo 1996); ciertamente, se tuvo que realizar un control de actividad motora para discriminar si la aplicación de dosis altas de L-NAME en el estriado causa perturbaciones en el sistema motor de la rata específicamente un aumento de la actividad locomotora. Por otra parte también sería apropiado realizar grupos intermedios entre las dosis de 200 y 400 μM para descartar un probable efecto tóxico.

El segundo fue la aplicación del precursor de ON L-Arginina que revirtió la amnesia provocada por el L-NAME, por lo que tenemos un efecto específico en la caída de la respuesta de prevención de pasiva causada por el inhibidor de la ONS.

Los resultados de la dependencia del tiempo para el efecto del L-NAME son interesantes por que la idea de que el ON actúa solo en la fase de adquisición es actualmente muy difundida (Chapman et al. 1992, Holscher y Rose 1993); sin embargo al administrar L-NAME 10 minutos post-entrenamiento no solo se bloquea efectivamente la memoria de prevención pasiva, sino que esta tendencia es aún más clara que al inyectar L-NAME inmediatamente después del entrenamiento. Resultados similares fueron descritos por Rickard et al. (1998) al administrar N^{G} -nitroarginina en pollos hasta 30 minutos después. Utilizando como modelo experimental en la rata en la tarea de prevención pasiva no existían reportes de que afectara la fase de consolidación, solo se había observado efecto sobre la adquisición

e inmediatamente después de la prueba aplicando nitroarginina en el hipocampo (Bernabeu 1995); la L-N-monometilarginina en el hipocampo, inmediatamente después de la prueba también bloquea la memoria (Huang et al 1995).

Prácticamente no existen reportes de que el ON intervenga en la fase de retención o evocación de algún aprendizaje, en varios experimentos conductuales han explorado esta posibilidad sin resultados alentadores; particularmente en las pruebas de aprendizaje espacial (Bannerman et al., 1994, Noda et al., 1997, Yamada et al., 1995), y en la tarea de prevención pasiva (Fin et al., 1995.). El que no se haya abundando en esta fase del aprendizaje reside principalmente en la asociación que tiene el modelo celular de la PLP y el aprendizaje; ya que en la PLP el ON es requerido solo para la fase de inducción de la PLP estableciendo la analogía con el aprendizaje correspondería a la fase de adquisición, al quitar el ON en la fase de mantenimiento de la PLP no repercute en la PLP si recurrimos nuevamente a la analogía esta sería la fase de evocación del aprendizaje. Los datos que encontramos en el Experimento 4 son especialmente importantes por que es la primera evidencia de que el ON tiene efectos en la evocación. La administración del inhibidor de la ONS L-NAME diez minutos antes de la sesión de evocación en animales entrenados y probados previamente, bloquea la ejecución de la prueba, lo que indica que en la evocación es importante la presencia de ON bien para tener acceso a la información almacenada o para procesarla correctamente para ejecutar la prueba con éxito; también es posible que pueda afectar en ambos procesos.

CONCLUSIONES

- ↘ La intervención quirúrgica y la administración intraestriatal de 1µl de vehículo es inocua lo que permite afirmar que el deterioro del aprendizaje se debe al efecto del inhibidor de la ONS.
- ↘ El ON estriatal es necesario para la consolidación de la tarea de prevención pasiva.
- ↘ El efecto amnésico es específico ya que presenta una dependencia de la dosis y es revertido por L- Arg, el precursor del ON.
- ↘ Los resultados demuestran que las dosis de 100 y 200 µM de L-NAME, diez minutos antes de la prueba, provoca un déficit de óxido nítrico importante que impide la ejecución de la prueba.
- ↘ La dosis de 200 µM de L-NAME es igualmente efectiva en un intervalo de 10 minutos post-adquisición, pero se pierde completamente su efecto a los 20 minutos.
- ↘ El ON participa en la etapa de evocación de la memoria de prevención pasiva.

REFERENCIAS

1. Adrian E. D. (1932) Double representation of the feet in the sensory cortex of the cat. *J. Physiol.*, 98: 16-18.
2. Albin R., Young A. B., and Penney J. B. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience* 12 (10): 366-375.
3. Alexander G. E., DeLong M. R., and Strick P. L. 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review of neuroscience* 9:357-381.
4. Atkinson R. C. and Shiffrin R. M. 1968. Human memory: a proposed system and its control processes. In *the psychology of learning and motivation: advances in research and theory vol. 2*. K. W. Spence and J. T. Spence editors. New York: Academic Press, 89-195.
5. Bannerman D.M., Chapman P.F., Kelly P.A.T., Butcher S.P., and Morris R.G.M. 1994. Inhibition of nitric oxide synthase does not impair spatial learning. *The journal of Neuroscience* 14 (12) 7404 7414
6. Bernabeu R., Levi M. de S., Fin C., Izquierdo I., and Medina J. 1995. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 6:1498-1500.
7. Bliss, T.V. P. and Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39.
8. Bolam J. P., Somogyi P., Takagi H., Fodor I., and Smith A. D. 1983. Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *Journal of cytology* 12: 325-344.
9. Bolam J. P., Powell J.F., Wu J-Y and Smith A. D. 1985. Glutamate decarboxylase-immunoreactive structures in the rat neostriatum: a correlated

- light and electron microscopic study including a combination of golgi impregnation with immunocytochemistry. *Journal of comparative Neurology* 237: 1-20.
10. Bollman R. and Pearse A. G. (1974) Calcitonin secretion and APUD characteristics of naturally occurring medullary thyroid carcinomas rats. *Virchows Arch B Cell Pathol* 19 (15): 95-105.
 11. Böhme G.A., Bon C., Lemaire M. Reibaud M., Piot O., Stutzmann J.-M. Doble A., and Blanchard J.-C. 1993. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:9191-9194.
 12. Bredt, D. S., Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8:3-11.
 13. Bruhwiler J., Chleide E., Liégeois J.F., and Carrer F. 1993. Nitric oxide: A new messenger in the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17:373-384.
 14. Buytenhuijs E. L., Berger H. J. C., Van Speandock K. P., Horstink M.W., Borm G. F., Cools A. R. 1994. Memory and learning strategies in patients with Parkinson's. *Neuropsychology* 32:335-342.
 15. Carlsson M. and Carlsson A. 1990. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson disease. *Trends in Neuroscience* 13 (7): 272-276.
 16. Carpenter M. B. 1981. *Handbook of Physiology (Sect. 1: the nervous System II)*. V. B. Brooks editor. American Physiological Society p. 947-995.
 17. Carpenter M. B., Carleton S. C., Keller J. T., and Conte P. 1981. *Brain Research* 224: 1-29.
 18. Chorover S. L., y Gross C. G. 1963. Caudate nucleus lesions: behavioral effects in the rat. *Science* 141: 826-827.

19. Cobb B. L., Ryan K. L., Melvin R. F., Guel-Gomez V., and Mickley G. A. 1995. Chronic administration of L-NAME in drinking water alters working memory in rats. *Brain Research Bulletin* 38 (2) : 203-207.
20. Cobos-Zapalaín G.G., Salado-Castillo R, Sánchez-Alavez M., Quirarte G.L., Roldán-Roldán G., Díaz del Guante M.A., and Prado-Alcalá R.A. 1996 High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonist. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65: 202-206.
21. Crosby E. C., Humprey T., and Leaver E. 1962. *Correlative of the nervous system*. New York: Mcmillan Co.
22. Cruz-Morales S. E., Duran-Arevalo M., Díaz del Guante M. A., Quirarte G., and Prado-Alcalá R. A. 1992 *Behavioral and Neural Biology*.
23. Chapman, P. F. Atkins C.M., Allen M.T., Haley J.E., and Steinmetz J.E. 1992. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport*, 3:567-570.
24. Chávez M. E., Salado-Castillo R., Sánchez-Alavez M., Quirarte G. L., and Prado-Alcala R. A. 1995. Post-training injection of GABAergic antagonists into striatum produces retrograde amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63:296-300.
25. Deguchi T., Yoshioka M., (1982) L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 257 (17): 10147-51.
26. DiFligia M., Pasik P., and Pasik T. 1976. A golgi study of neural types in the neostriatum of monkeys. *Brain Research* 114: 245-256.
27. DiFligia M. 1987. Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *Journal of Comparative Neurology* 255: 245-258.

28. Du Bois Reymond E. (1843) Untersuchungen über thierische elektricität. G.E. Reimer, Berlin.
29. Dudai Y. 1989. The neurobiology of memory. Oxford University Press.
30. Estall L.B., Grant J.S. and Cicala G.A. 1993. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 46: 959-962.
31. Fin C., Cunha C., Bromberg E., Schmitz P. Bianchin M., Medina J., and Izquierdo I. (1995) Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory Processes. *Neurobiology of learning and memory* 63: 113-115.
32. Freund T. F., Powell J., and Smith A. D. 1984 *Neuroscience* 13:1189-1215.
33. Furchgott R. F. Jothianandan D. 1991 Endothelium-dependt and independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28:52-61
34. Furchgott R. F. Zawadzki J.V. 1980 The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetilcholine. *Nature* 288:373-376.
35. Garthwaite, J. 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neuroscience*, 14:60-67.
36. Garthwaite, J., Charles S., and Chess-Williams R. 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 336:385-388.
37. Giordano M., and Prado-Alcalá R.A. 1986 Retrogrde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology Biochemistry Beahavior*, 24:905-909.
38. Graybiel A. M., 1990. Neutransmitters and neuromodolators in the basal ganglia. *Trends in Neuroscience* 13 (7): 244-253.

39. Grofova I. 1979. The neostriatum. Divac and R. G. E. Oberg editors. Pergamon p. 37-51.
40. Haber S. 1985. *Journal of Comparative Neurology*. 235: 322-335.
41. Harrington Ch. A., Mobley S., Wenk G. L. 1994. Nitric oxide formation does not underlie the memory deficits produced by ibotenate injections into the nucleus basalis of rats. 108(2): 277-283.
42. Hebb D. O. 1949. *The organization of behavior: A neurophysiological theory*. Waley, New York
43. Hölscher, C.; Rose, S. P. R. 1992. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents formation in the chick. *Neurosci. Lett.*, 145:165-167.
44. Hölscher, C.; Rose, S. P. R. 1993. Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick. 619:189-194.
45. Huang A-M. and Lee E.H.Y. 1995. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 50:327-332.
46. Ito M., 1989. Long-term depression. *Annu. Rev. Neurosci.*, 12: 85-102.
47. Jaffe K., Blanco M. E. 1994. Involvement of amino acids, opioids, nitric oxide, and NMDA receptors in learning and memory consolidation in crickets. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 47: (3) 493-496.
48. Kirkby R. J. 1978. Exploratory behavior in rats following bilateral lesions of the anterodorsal caudate nuclei. *Percept Mot Skills* 47 (2): 623-628.
49. Knowlton B. J., Mangels J. A. Squire L. R. 1996. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 273: 1399-1402.
50. Li J., Smith S.S., and Mcelligott 1995. Cerebellar nitric oxide is necessary for vestibulo-ocular reflex adaptation, a sensorimotor model of learning. *Journal of neurophysiology* 74:489-494.

51. Linden D.J., and Connor J. A. 1992. Long-term depression of glutamate currents in cultured cerebellar purkinje neurons does not require nitric oxide signalling. *European Journal of Neuroscience*, 4: 10-15.
52. Loopjuit L. D., and Van der Kooy D. 1985. Organization of the striatum: collateralization of its efferent axons. *Brain Research* 348: 86-99.
53. Lovinger M.D. and Tyler E. 1996. Synaptic Transmission and modulation in the neostriatum. *International Review of Neurobiology*, 39: 77-111.
54. Marletta M.A., Yoon P.s., Iyengar R., Leaf C.D., and Wishnok J.S. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-8711.
55. McGaugh J. L. 1966. Time-dependent processes in the memory storage. *Science* 153: 1351-1358.
56. Mishikin M., Malamut B., Bachevalier J. 1987 Memories and habits: two neural systems. En : *Neurobiology of learning and memory*, Lynch G., McGaugh J. L., Weinberg N. M. (Eds.) Guilford press, New York 65-77.
57. Moncada S., et al., Palmer, R. M. J. And Gryglewski R. J. E.A. (1986) Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9164-9168.
58. Moncada S., Palmer, R. M. J. And Higgs E.A. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38 :1709-1715
59. Mogensen J., Wörtwein G., Hasman A., Nielssen P. and Wang Q. 1995. Functional and neurochemical profile of place learning after l-nitro-arginine in the rat. *Neurobiology of learning and memory* 63: 54-65.
60. Morris R. G. M., Kandel E. R., and Squire L. R. 1988. The neuroscience of learning and memory: cells, neural circuits and behavior. *Trends in the Neuroscience* 11 (4): 125-127.

61. Müller U., 1996. Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*, 16: 541-549.
62. Nauta H. J. And Cuenod M. 1982. *Neuroscience* 7: 2725-2734.
63. Noda Y., Yamada K., Nabeshima T., 1997. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research*. 83: 153-158.
64. O'Dell, T. J.; Hawkins, R. D.; Kandel, E. R.; Arancio, O. 1991. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11285-11289.
65. O'Dell, T. J.; Huang P. L.; Dawson, T. M.; Dinerman, J. L.; Snyder S. H.; Kandel, E. R.; Fishman, M. C. 1994. Endothelial NOS and the Blockade of LTD by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*, 265:542-546.
66. Ohno M., Yamamoto T., Watanabe S., 1993. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Research*, 632: 36-40.
67. Parent A., Mackey A. and De Bellefeuille L. 1983. The subcortical afferents to caudate nucleus and putamen in primate: a fluorescence retrograde double labeling study. *Neuroscience* 10: 1137-1150.
68. Parent A. 1986. *Comparative Neurobiology of the basal ganglia*. Wiley-Interscience.
69. Parent A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends in the Neuroscience* 13 (7): 254-258.
70. Pasik P., Pasik T. and DiFlagia M. 1979. *The neostriatum*. I. Divac and R. G. E. Oberg editors. Pergamon Press p. 5-36.
71. Phillips A. G. and Carr G. D. 1987. Cognition and the basal ganglia: a possible substrate for procedural knowledge. *Can Journal Neurol Sci* 14: 381-385.

72. Prado-Alcalá R. A., Grinberg J., Arditti L., Garcia M., Prieto G., Brust-Carmona. 1975. Learning deficits produced by chronic and reversible lesions of the corpus striatum in rats. *Physiology and Behavior*, 15:283-287.
73. Prado-Alcalá R. A., Patricia Kaufmann and Renee Moscona 1980. Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12: 249-253
74. Prendergast M.A., Buccafusco J.J., Terry, jr A.V. 1997. Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 57 (12): 347-352.
75. Price, H.R. Mayer, B. and Beitz, J.A. 1993. Nitric oxide synthase neurons in rat brain express more NMDA receptor mRNA than non-NOS neurons. *Neuroreport*, 4: 807-810.
76. Quirate G. L., Cruz-Morales S. E., Díaz del Guante M. A., Garcia M., and Prado-Alcalá R. A. 1993. Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Brain Res. Bull.*, 32:521-524.
77. Ramón y Cajal S. (1906). The structure and connections of neurons. In: *Nobel Lectures in Physiology or Medicine, 1901-1921*. Elsevier, New York, 1967.
78. Rickard N. S., Ng K. M., Gibbs M. E., 1998. Further support for nitric oxide-dependent memory processing in the day-old chick. *Neurobiology of Learning and Memory* 69: 79-86.
79. Rickard N. S., Gibbs M. E., Ng K. M. 1999. inhibition of the endothelial isoform of nitric oxide synthase impairs long-term memory formation in the chick. *Learning and Memory* 6: 458-466.
80. Robertson J.D., Bonaventura J., Kohm A. 1995 Nitric oxide synthase inhibition blocks octopus touch learning without producing sensory or motor dysfunction. *Proc. R. Soc Lond. B.* 261:167-172

81. Sherrington C. (1906) The integrative action of the nervous system. New Haven, Yale University Press
82. Siegel S. y Castellan N. J. 1995. Estadística no paramétrica. Editorial trillas. 4ª edición México
83. Smith A. D. and Parent A. 1988. Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity. *Brain Research* 453: 353-356.
84. Smith A. D. and Bolam J. P. 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Trends in the neuroscience* 13 (7): 259-265.
85. Solana-Figueroa and Prado-Alcalá R. A. 1990. Retrograde amnesia produced by intrastriatal atropine and its reversal by choline. *Life Sciences*, 46:679-686.
86. Squire L. R. 1986. Mechanisms of memory. *Science* 232: 1612-1919.
87. Squire L. R. and Zola-Morgan S. 1988. Memory: Brain systems and behavior. *Trends in Neuroscience* 11: 170-175.
88. Suzuki Y., Ikari H., Hayashi T., Iguchi A. 1996. Central Administration of a nitric oxide synthase inhibitor impairs spatial memory in spontaneous hypertensive rats. 207:105-108.
89. Truex R. C. Carpenter M. B. and Mosovich A. 1971. *Neuroanatomia Humana* 4ª edición. Editorial El ateneo, Buenos Aires, Argentina.
90. Van der Kooy D. and Carter D. A. 1981. *Brain Reserach* 211: 15-36.
91. Vincent S. R. and Johansson O. 1983. Striatal neurons containing both somatostatin and avian pancreatic polypeptide (APP)- like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology* 217: 264-270.
92. Vincent S.R. and Hope B.T. 1992. Neurons that say NO. *Trends Neurosci.*, 15 (3): 108-113.

93. Vincent S.R., Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46 (4):755-784.
94. Wyres E. J. Peeke H. U. S., Williston J. S. and Herz M. J. 1968. Retroactive impairment of passive avoidance learning by stimulation of the caudate nucleus. *Exp Neurol* 22: 350-366.
95. Wyers E. J. and Deadwyler A. S. 1971. Duration and nature of retrograde amnesia produced by stimulation of caudate nucleus. *Physiol Behav.* 6: 97-103.
96. Yamada K., Hiramatsu M., Noda Y., Mamiya T., Murai M., Kameyama T., Komori Y., Nikai T., Sugihara H., Nabeshima T. 1996. *Neuroscience*. 74 (2): 365-374.
97. Yamada K., Noda Y., Nakayama S. Komori Y., Sugihara H., Hasegawa T., Nabeshima T. 1995. Role of nitric oxide in the learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *British Journal Pharmacology* 115:852-858.
98. Yanigihara D., and Kiondo I. (1996) Nitric oxide plays a key role in adaptive control of locomotion in cat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 13292-13297.
99. Yelnik J., Francois C., Percheron G., Heyner S. 1987. *Journal of Comparative Neurology* 265: 455-472.