
EL ESTRÉS AGUDO INTERFIERE CON LA EVOCACIÓN Y PROMUEVE LA EXTINCIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO DE BARNES

Acute Stress Impairs Evocation and Promotes Extinction of Spatial Memory in the Barnes Maze

JULIETA TRONCOSO^{1,2}, Ph. D.; MARISOL LAMPREA¹, M.Sc., Ph. D.;
DIANA MARCELA CUESTAS¹, Bióloga; ALEJANDRO MÚNERA¹, M.D.,
M.Sc., Ph. D.

¹ Laboratorio de Neurofisiología Comportamental, Universidad
Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

² Correspondencia: Carrera 30 # 45-03, Departamento de Biología
(Edificio 421), Oficina 225, Ciudad Universitaria. Bogotá, Colombia.
jtrancoso@unal.edu.co

Presentado 8 de junio de 2009, aceptado 20 de octubre de 2009, correcciones 28 de enero de 2010.

RESUMEN

Para evaluar los efectos del estrés agudo sobre la recuperación y la extinción de la memoria espacial, se utilizaron ratas entrenadas en el laberinto circular de Barnes. El entrenamiento consistió de 8 ensayos de adquisición (intervalo entre ensayos, IEE, de 5 min) en donde los animales debían aprender a encontrar una caja meta, ubicada en uno de los 18 agujeros del laberinto. Todos los animales adquirieron el aprendizaje espacial, ya que invirtieron menos tiempo en encontrar la caja meta y cometieron menos errores a medida que se sucedían los ensayos de entrenamiento. Veinticuatro horas después del entrenamiento se evaluó la retención y extinción del aprendizaje espacial mediante una prueba con caja meta (PCC) seguida de siete pruebas sin caja (PSC), con un IEE de 5 min. Una hora y media antes de la sesión de evaluación de la memoria un grupo de animales fue sometido a estrés por restricción de movimientos durante una hora, permitiéndoles un período de recuperación de 30 min y otro grupo permaneció en su caja hogar sin manipulación (control). Los resultados indican que el estrés deteriora el proceso de evocación de la memoria espacial, ya que los animales estresados cometieron un mayor número de errores y demoraron más tiempo en encontrar la caja meta durante la PCC, respecto de los controles. Además, el estrés facilita el proceso de extinción, ya que, durante las PSCs los animales estresados no mostraron una persistencia en la exploración del agujero que, en el entrenamiento, conducía a la caja meta.

Palabras clave: Laberinto de Barnes; memoria espacial; recuperación; extinción; estrés agudo.

ABSTRACT

To evaluate the effects of acute stress on evocation and extinction of a spatial memory task, we used rats trained in the Barnes circular maze. The training protocol consisted of eight acquisition trials (intertrial interval, ITI; 5 min) where animals must learn to find an escape box placed under one of these eighteen holes of the maze. All animals learned the spatial memory task as indicated by diminished escape latency and weighted errors along the eight acquisition trials. Twenty four hours after training spatial memory evocation and extinction were tested (one trial with escape box, and seven consecutive trials without escape box, ITI: 5 min). One hour and a half before memory evaluation session half of the animals underwent movement restriction during one hour (one hour stress, 1H) and were allowed 30 min to recover, while the other half stayed in their home cage without manipulation (control, C). Stressed animals displayed a significant increase both in escape latency and in weighted errors during the trial with scape box. These results indicate that movement restriction-induced stress deteriorates the spatial memory evocation. Moreover, movement restriction-induced stress during one hour facilitates extinction, showed by the non-persistence in the exploration of the escape hole during the trials without escape box.

Key words: Barnes maze; spatial memory; evocation; extinction; acute stress.

INTRODUCCIÓN

La memoria espacial es un tipo de memoria declarativa cuyo objetivo final es el almacenamiento de la representación espacio-perceptual de los lugares a los que se expone un animal. Uno de los paradigmas utilizados en la evaluación de la memoria espacial de roedores es el laberinto circular de Barnes (Barnes, 1979). Éste consiste en una plataforma circular elevada a un metro del suelo, con orificios de escape en periferia. Sólo uno de los orificios está comunicado con una caja de escape. El laberinto se encuentra ubicado en una habitación iluminada con luz brillante y está basado en la tendencia natural de los roedores a buscar espacios oscuros y cerrados. Los animales deben aprender, mediante claves espaciales externas al laberinto, una trayectoria determinada que los llevará a la caja de escape logrando huir del ambiente abierto e iluminado (McLay, 1998).

La memoria espacial puede verse afectada por diferentes factores externos e internos, entre ellos el estrés. Se ha demostrado que el estrés puede mejorar o deteriorar la memoria relacionada con tareas diversas (p.ej.: reconocimiento de objetos, condicionamiento clásico o navegación espacial). La dirección de estos efectos depende de la intensidad de la respuesta de estrés, del tipo de agente estresante utilizado, del tipo de memoria evaluada y de la fase de la memoria durante la cual se induce el estrés (Luine *et al.*, 1996; Lupien y McEwen, 1997; De Quervain *et al.*, 1998; Morrow *et al.*, 2000; Kim y Diamond, 2002; Roozendaal, 2002; Bowman *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2009; Walesiuk y Braszko, 2009). Por ejemplo, la exposición a estrés crónico puede deteriorar o mejorar la memoria dependiendo del momento del desarrollo en que sea inducido, de la edad y del sexo del animal (Mueller y Bale, 2007). Asimismo, el estrés

agudo puede tener un efecto positivo o negativo sobre la memoria espacial dependiendo del momento en que sea inducido. De esta forma, la inducción de estrés agudo por restricción motora en ratas, antes de la adquisición de una tarea espacial, evaluada en el laberinto radial de ocho brazos, mejora la ejecución de dicha tarea (Luine *et al.*, 1996). Por el contrario, si el estrés agudo ocurre después de la consolidación y antes de la recuperación, deteriora la evocación de la memoria. Más aún, estos efectos están relacionados con el aumento de los niveles de corticosterona en sangre (De Quervain *et al.*, 1998; Roozendaal, 2002). La intensidad del estrés y los niveles de glucocorticoides tienen un efecto sobre la memoria que sigue un patrón de U invertida, así: el rendimiento de la memoria con estrés de intensidad media o niveles intermedios de glucocorticoides se asocian con mejor rendimiento de la memoria cuando se compara con niveles altos o bajos de estrés o glucocorticoides (Lupien y McEwen, 1997; Mello *et al.*, 2008). Estudios en los cuales se evalúa el efecto del estrés sobre la recuperación de memoria espacial en el laberinto radial acuático, muestran que los animales estresados cometen una mayor cantidad de errores que aquellos no estresados (Sandi *et al.*, 2005). También se ha evaluado el efecto de la privación del sueño REM, como agente estresante, en la ejecución de tareas espaciales en laberinto acuático de Morris. En estos experimentos se demostró que los animales sometidos a privación del sueño REM sufren un deterioro de la recuperación de la memoria espacial (Youngblood *et al.*, 1997). Además, se demostró la relación existente entre niveles de corticosterona, estrés y memoria, con un estudio en el cual los animales recibieron tres tratamientos diferentes (estrés agudo, dosis bajas o dosis altas de corticosterona) y se evaluó su memoria espacial en laberinto acuático de Morris. Dicho estudio mostró que tanto el estrés agudo como los niveles de corticosterona afectan la evocación de la memoria espacial y que los niveles de corticosterona en sangre son directamente proporcionales al grado de deterioro de la memoria (Youngblood *et al.*, 1997).

Estudios llevados a cabo en el laboratorio de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia han evaluado los efectos del estrés sobre la recuperación de la memoria espacial, utilizando el laberinto circular de Barnes. Los resultados de estos estudios han demostrado que ni la inducción de estrés agudo por restricción de movimientos ni la inyección de 1 o 3 mg/kg de corticosterona, alteran la recuperación de la tarea espacial en este laberinto cuando se entrena a los animales con 16 ensayos de adquisición (ocho ensayos por día, durante dos días consecutivos; Torres, 2006; Carvajal, 2006). En el presente trabajo experimental el entrenamiento de los animales se llevó a cabo en un solo día (ocho ensayos de adquisición) y se indujo estrés agudo por restricción motora antes de las sesiones de evaluación y extinción de la memoria espacial, que se realizaron 24 horas después del entrenamiento. Los resultados indican que el estrés agudo por restricción de movimientos durante una hora perjudica la evocación de la memoria espacial y facilita su extinción, cuando el entrenamiento es corto.

MATERIALES Y MÉTODOS

SUJETOS

En este estudio se utilizaron como sujetos 14 ratas Wistar macho, de 260 ± 20 gramos de peso, con una edad promedio de 16 semanas, que fueron suministradas por el

Bioterio de Producción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Los animales fueron trasladados al Laboratorio de Aprendizaje y Comportamiento Animal del Departamento de Psicología, Universidad Nacional de Colombia y alojados en cajas de policarbonato (38 x 32 x 18 cm, cuatro animales por caja). Durante el experimento, los animales permanecieron en un cuarto con temperatura controlada (18 ± 2 °C), un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas (las luces se encendían a las 7:00 a.m.) y libre acceso a agua y comida. Las cajas de policarbonato contenían una capa de aserrín en el fondo que era cambiada cada tercer día. Antes de los procedimientos experimentales se permitió la aclimatación de los animales a las condiciones del bioterio durante un período cuatro días. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados entre las 7:00 a.m. y las 12:30 p.m., con el objeto de eludir el pico de corticosterona endógena de los animales (que se presenta después de las 3:00 p.m.).

La totalidad de los procedimientos experimentales, las condiciones de alojamiento, y la disposición de los residuos biológicos y químicos fue realizada observando las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Resolución N.º 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989; también se observaron los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América.

INDUCCIÓN DE ESTRÉS

El estrés se indujo mediante la restricción de movimientos. De acuerdo con el ciclo circadiano de secreción de corticosterona, la inducción de estrés de cada animal se programó de modo tal que empezara después de las 7:00 a.m. y finalizara antes de las 11:30 a.m. Para ello, en una cabina separada de la sala experimental y el bioterio, cada animal fue introducido suavemente en un cilindro de PVC (base: 6 cm, altura: 20 cm), cuyas bases fueron cerradas con tapas con perforaciones. Dentro de este cilindro el animal puede respirar y mover sus extremidades, pero no puede girar sobre su eje dorsoventral. Cada animal permaneció durante un período de una hora dentro del cilindro con su eje mayor dispuesto horizontalmente.

ENTRENAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA TAREA DE MEMORIA ESPACIAL

Se realizaron en el laberinto circular de Barnes (Barnes, 1979; McLay, 1998; Coburn-Litvak *et al.*, 2003; Torres, 2006; Carvajal, 2006). Este laberinto consiste de una plataforma circular de acrílico negro de 122 cm de diámetro, con 18 agujeros (cada uno de 9,5 cm de diámetro) distribuidos en la periferia (con el centro a 10 cm del borde de la plataforma) y espaciados de manera regular (cada 20° de arco, Fig. 1A). Solo uno de los agujeros (elegido aleatoriamente para cada sujeto experimental) da acceso a una caja de escape o caja meta en forma de prisma rectangular (24 cm de largo x 10 cm de alto x 8,5 cm de ancho). En el centro del laberinto se ubica un cilindro (base: 25 cm, altura: 15 cm) con solo la base superior (caja de salida), el cual puede ser elevado por el experimentador mediante un sistema de poleas (Fig. 1B).

En la sala de experimentación hay señales visuales (claves espaciales extralaberínticas) que se mantuvieron fijas en las paredes durante todo el experimento (Fig. 1B). Además,

en el techo están instaladas dos lámparas de luz blanca de 300 W (dirigidas al centro del laberinto), una fuente de ruido blanco de 90 dB y una lámpara de luz roja de 60 W, las cuales pueden ser controladas de forma alternativa por el experimentador. Antes de iniciar el entrenamiento, los animales fueron habituados a la sala de experimentación iluminada con luz roja y a las cajas del laberinto (caja de salida y caja meta).

Veinticuatro horas después de la habituación se realizó la sesión de adquisición, que consistió de ocho ensayos (E1 a E8), separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 5 min. Antes de cada ensayo, estando iluminada la sala de experimentación con la luz roja, el sujeto se introdujo en la caja de salida durante 30 segundos (Fig. 1B). Cada ensayo comenzaba cuando de manera simultánea se elevaba la caja de salida y se encendían las luces blancas y la fuente de sonido (Fig. 1C). En cada ensayo se permitía al animal explorar el laberinto por un intervalo máximo de 4 minutos. El ensayo finalizaba cuando el animal se introducía en la caja meta, momento en el cual las luces blancas y la fuente de sonido se apagaban y se volvía a encender la luz roja. Cuando, transcurridos 4 minutos, el animal no había encontrado la caja meta, el experimentador lo introducía suavemente en ella a través del agujero correspondiente, apagaba las luces blancas y la fuente de sonido y encendía la luz roja. En cualquiera de los casos anteriores, se dejaba al animal en la caja meta durante 1 minuto. En el tiempo entre ensayos el animal permanecía aislado en una caja idéntica a su alojamiento habitual.

Veinticuatro horas después del entrenamiento, se evaluó el aprendizaje. Para ello se realizaron dos ensayos: 1) en el primer ensayo, idéntico a los ensayos de la sesión de adquisición (prueba con caja, PCC, Fig. 1C), se evaluó la ejecución de la tarea espacial; en el segundo ensayo, semejante a los ensayos de adquisición pero retirando la caja meta (prueba sin caja, PSC1, Fig. 1D), se evaluó si el sujeto retenía la ubicación espacial de la caja (indicado por persistencia en la exploración del agujero meta). Puesto que la exposición al laberinto sin caja meta da inicio al proceso de extinción y dado que se pretendía evaluar también dicho proceso, en la misma sesión se llevaron a cabo otras seis pruebas sin caja (PSC2 a PSC7, Fig. 1D). En esta sesión de evaluación y extinción el IEE fue de 5 minutos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Aleatoriamente, los 14 animales fueron asignados a dos grupos experimentales: 1) control ($n = 6$), conformado por animales que no eran sometidos a estrés por restricción motora y 2) estrés una hora ($n = 8$), conformado por animales que eran sometidos a una hora de restricción de sus movimientos. A los animales sometidos a restricción motora se les permitió un período de recuperación de 30 minutos antes de iniciar la sesión de evaluación y extinción en el laberinto de Barnes.

ADQUISICIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

A partir de las grabaciones en video del desempeño de cada rata en el laberinto de Barnes se obtuvo la secuencia de agujeros explorados y tiempo en que ocurrió la exploración, tomando como inicio de un ensayo el momento en que se levantó la caja de salida. Se definió una exploración como un evento de deflexión de la cabeza y cuello de la rata o tocada de nariz dentro de un agujero. Los agujeros fueron numerados en sentido contrario a las manecillas del reloj de -8 a 9, donde 0 corresponde al agujero meta (Fig. 1A).

En cada uno de los ensayos de adquisición y la PCC se contó el número de errores cometidos por el sujeto (exploraciones de agujeros distintos a aquel que conduce a la caja meta) y se determinó la latencia de escape (tiempo, expresado en segundos, entre el inicio del ensayo y la entrada en la caja meta). Para modelar la trayectoria recorrida por cada rata, se tomó la secuencia de agujeros explorados, se transformó usando coordenadas polares originadas en el centro del laberinto y, con base en ello, se calculó la distancia total recorrida en cada ensayo (sumatoria de la distancia entre los agujeros explorados secuencialmente) y la velocidad media de ejecución (distancia total recorrida dividida por la latencia de escape). Para ponderar los errores de exploración, teniendo en cuenta su cercanía al agujero meta, se computó la sumatoria de la distancia entre cada agujero explorado y el agujero meta.

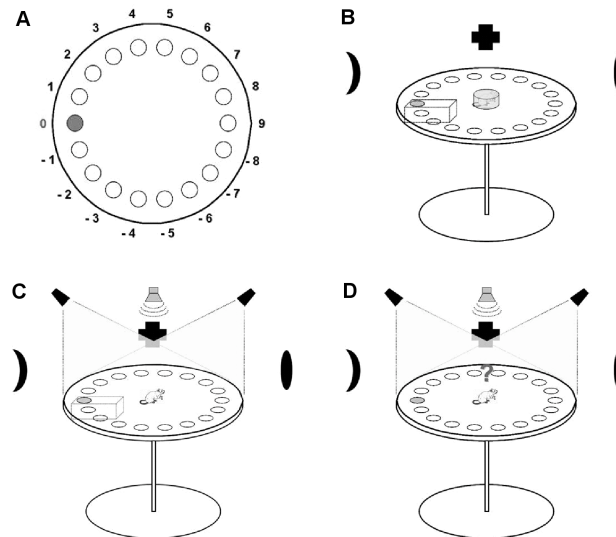


Fig. 1. Laberinto circular de Barnes. A. Vista superior del Laberinto circular de Barnes, en donde se observa la ubicación de los dieciocho agujeros del laberinto (0 a 17). Se destaca la ubicación del agujero meta (agujero 0, en gris oscuro) por debajo del cual se ubica la caja meta o caja de escape. B. Antes de comenzar los ensayos de la sesión de adquisición (E1 a E8) y el primer ensayo de la sesión de evaluación del aprendizaje (prueba con caja, PCC), los animales se ubican en la caja de salida (caja gris clara), en el centro del laberinto. El agujero meta (gris oscuro) tiene por debajo la caja meta (en línea punteada). C. Al inicio de E1 a E8 y PCC, la caja de salida se levanta y, simultáneamente, se encienden las luces y la fuente de sonido, ubicadas en el techo del recinto experimental. D. Durante el segundo ensayo de la evaluación del aprendizaje (prueba sin caja 1, PSC1) y en la fase de extinción (pruebas sin caja 2 a 7, PSC 2 a PSC7), se evalúa la retención del aprendizaje espacial en el laberinto habiendo retirado la caja meta. En B, C y D: cruz, media luna, círculo corresponden a las claves extra-laberínticas en las paredes del cuarto de experimentación.

En la PSC1 y en cada ensayo de extinción se calculó la frecuencia de exploración de cada agujero (número de exploraciones del agujero durante el ensayo), el número total de exploraciones (sumatoria de las exploraciones de todos los agujeros durante el ensayo), la distancia total recorrida y la distancia media entre cada uno de los agujeros

explorados y el agujero meta. Para caracterizar en detalle la evolución de la conducta exploratoria durante la PSC1, se dividió este ensayo en cuatro intervalos (INT 1 a 4) de un minuto cada uno y en cada uno de ellos se contó la frecuencia de exploración de cada uno de los agujeros del laberinto.

Las comparaciones entre grupos y sesiones se realizaron con el paquete estadístico SIGMASTAT 3.5 aplicando ANDEVA de una vía y ANDEVA de medidas repetidas con uno o dos factores. Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó, como prueba *post hoc*, el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak (excepto cuando se indique lo contrario). Las tablas y gráficas fueron realizadas en Microsoft® Office Excel 2003 y SIGMAPLOT 10.0 y están representadas en todos los casos como media + SEM (error estándar de la media). Para todas las pruebas se tomó como nivel de significatividad un $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

ADQUISICIÓN

La figura 2A muestra la latencia de llegada a la caja meta a lo largo de los ocho ensayos de adquisición (E1 a E8) y la prueba con caja (PCC). Conforme avanzaron los ensayos de adquisición, los animales de ambos grupos (control y estrés una hora) emplearon significativamente menos tiempo en encontrar la caja meta ($F_{(1,12)} = 6,381$; $p < 0,001$). Además, no se encontraron diferencias significativas en la disminución de la latencia en función de los ensayos para los distintos grupos ($F_{(1,12)} = 1,978$; $p = 0,185$). Las comparaciones planeadas *a posteriori* mostraron diferencias significativas en la latencia de llegada al agujero meta entre E1 y E8 y entre E1 y PCC para cada uno de los grupos, según se muestra en la tabla 1.

Grupo	E1 vs. E8			E1 vs. PCC		
	g.l.	t	p	g.l.	t	p
Control	10	5,475	<0,001	10	3,890	<0,05
Estrés una hora	14	5,216	<0,001	14	3,350	<0,05

Tabla 1. Comparaciones planeadas de la latencia de llegada al agujero meta durante la adquisición y primer ensayo de la evaluación. Abreviaturas: E1, primer ensayo de la sesión de adquisición; E8, octavo ensayo de la sesión de adquisición; PCC, prueba con caja (primer ensayo de recuperación o evaluación); g.l., grados de libertad; t, estadístico de la prueba t de Student; p, probabilidad.

La figura 2B muestra el número de errores ponderados que cometieron los animales de cada grupo a lo largo de los ocho ensayos de adquisición y la PCC. El análisis estadístico evidenció una disminución significativa en los errores cometidos por los sujetos de ambos grupos a lo largo de los ocho ensayos de entrenamiento ($F_{(1,12)} = 5,848$; $p < 0,001$). Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre los dos grupos con respecto a los errores cometidos ($F_{(1,12)} = 0,979$; $p = 0,342$). Las comparaciones planeadas *a posteriori* evidenciaron diferencias significativas en los errores ponderados entre E1 y E8 y entre E1 y PCC para cada uno de los grupos, según se muestra en la tabla 2.

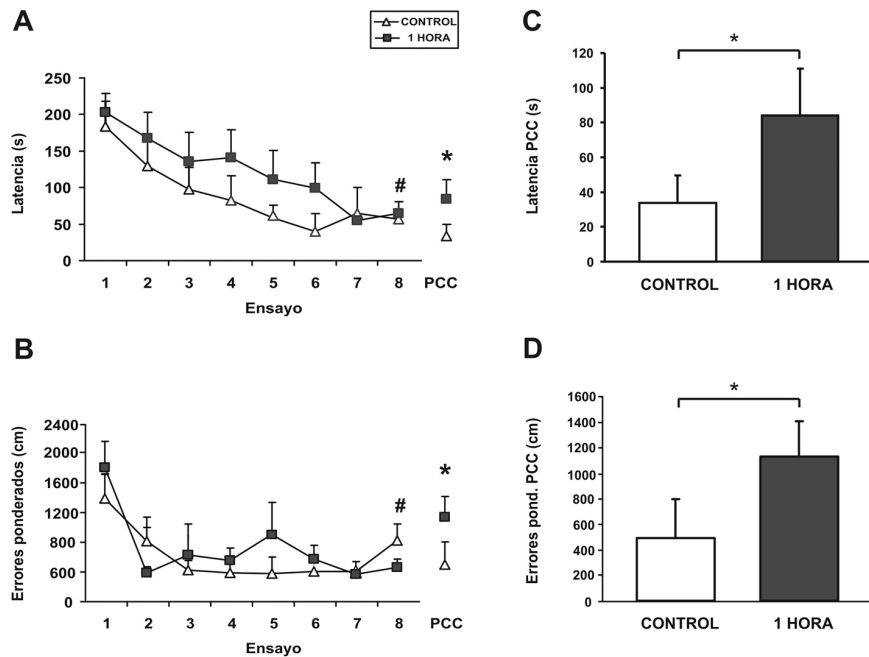


Fig. 2. Evolución temporal de la latencia y errores de agujero durante la sesión de adquisición y primer ensayo de la sesión de evaluación o prueba con caja (PCC). A. Latencia de llegada al agujero meta a lo largo de los ocho ensayos de adquisición (1 a 8) y la prueba de recuperación con caja (PCC), para los grupos: control (triángulos blancos; $n = 6$) y estrés una hora (cuadrados negros; $n = 8$). B. Errores ponderados a lo largo de los ocho ensayos de adquisición (1 a 8) y la PCC, para los grupos: control y estrés una hora. C. Latencia de llegada al agujero meta durante la PCC de los grupos: control y estrés una hora. D. Errores ponderados cometidos por los animales control y estrés una hora durante la PCC. En todas las gráficas cada punto o barra ilustra el promedio + el error estándar de la media. Símbolos: #, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ensayos 8 y 1 de la sesión de adquisición; *, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos control y estrés una hora durante la PCC.

Grupo	E1 vs. E8			E1 vs. PCC		
	g.l.	t	p	g.l.	t	p
Control	10	4,182	<0,01	10	5,710	<0,001
Estrés una hora	14	6,053	<0,001	14	3,380	<0,01

Tabla 2. Comparaciones planeadas de errores ponderados durante la adquisición y el primer ensayo de evaluación. Abreviaturas: Como en la tabla 1.

EVOCACIÓN

Durante la PCC los animales del grupo estrés una hora, emplearon mayor tiempo para hallar caja meta ($F_{(1,12)} = 16,316$; $p < 0,01$; Fig. 2C) y cometieron un mayor número de errores de agujero ($F_{(1,12)} = 16,259$; $p < 0,001$; Fig. 2D; Fig. 6, PCC) que los animales del grupo control.

Durante la PSC1 los animales del grupo control exploraron con mayor frecuencia el agujero meta respecto de los demás; mientras que los animales del grupo estrés una

hora exploraron con frecuencias similares todos los agujeros (Fig. 3A; Fig. 6, PSC1). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la exploración de los diferentes agujeros ($F_{(1,16)} = 8,030$; $p < 0,001$). Pruebas *post-hoc* mostraron que los sujetos del grupo control persistieron de modo significativo en la exploración del agujero meta ($p < 0,001$), en tanto que esta persistencia no se observó en los sujetos del grupo estrés una hora. Además, la frecuencia de exploración del agujero meta de los sujetos del grupo control fue significativamente mayor que la de los sujetos del grupo estrés una hora ($t_{(12)} = 2.80$; $p < 0,05$; Fig. 3A, inserto).

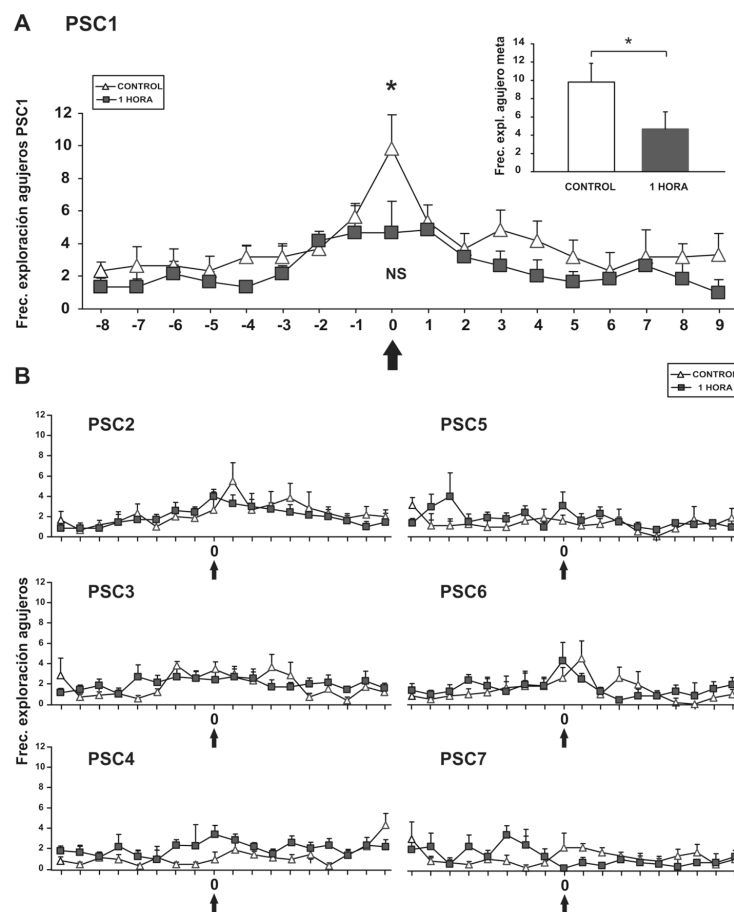


Fig. 3. Exploración de cada uno de los agujeros del laberinto durante los ensayos sin caja de escape (PSC). A. Frecuencia de exploración de cada uno de los dieciocho agujeros del laberinto para los grupos: control (triángulos blancos; $n = 6$) y estrés una hora (cuadrados negros; $n = 8$) durante la prueba sin caja 1 (PSC 1). Inserto: Comparación de la frecuencia de exploración del agujero meta (agujero 0) para los grupos control (barra blanca) y estrés una hora (barra negra). B. Frecuencia de exploración de cada uno de los dieciocho agujeros del laberinto, durante las PSC 2 a PSC 7. En cada gráfica se ilustra la media + el error estándar de la media (SEM). Símbolos: *, diferencias significativas ($p < 0,05$); flecha, indica el agujero meta (agujero 0).

EXTINCIÓN

En la PSC2, los animales del grupo control continuaron explorando con frecuencia significativamente mayor que el azar el agujero meta y los agujeros adyacentes ($F_{(1,16)} = 4,098$; $p < 0,001$). En contraste, la exploración de los animales del grupo estrés una hora no superó el nivel de azar para ninguno de los agujeros ($F_{(1,16)} = 2,15$; $p = 0,195$; Fig. 3B, PSC2). A partir de la PSC3 y hasta la PSC7 los animales de ambos grupos no exploraron agujero alguno por encima del nivel de azar ($F_{(1,16)} = 1,020$; $p = 0,430$). Tampoco hubo diferencias significativas entre ambos grupos en la frecuencia de exploración de agujeros ($F_{(1,12)} = 0,220$; $p = 0,790$; Fig. 3B, PSC3 a PSC7).

La frecuencia con la que los animales controles exploraron todos los agujeros del laberinto disminuyó a lo largo de los siete ensayos sin caja de escape ($F_{(1,12)} = 7,642$; $p < 0,001$; Fig. 4A). No obstante, no hubo diferencias significativas en términos de la frecuencia total de exploración para los animales del grupo estrés una hora ($F_{(1,12)} = 0,224$; $p = 0,644$).

La frecuencia con la que los animales exploraron el agujero meta disminuyó a lo largo de los siete ensayos sin caja de escape ($F_{(1,12)} = 4,380$; $p < 0,05$; Fig. 4B). También se evidenció que durante la PSC1 la exploración del agujero meta fue significativamente mayor en los animales del grupo control que en los animales del grupo estrés una hora ($t_{(12)} = 2,80$; $p < 0,05$; Fig. 3A, inserto, Fig. 4B).

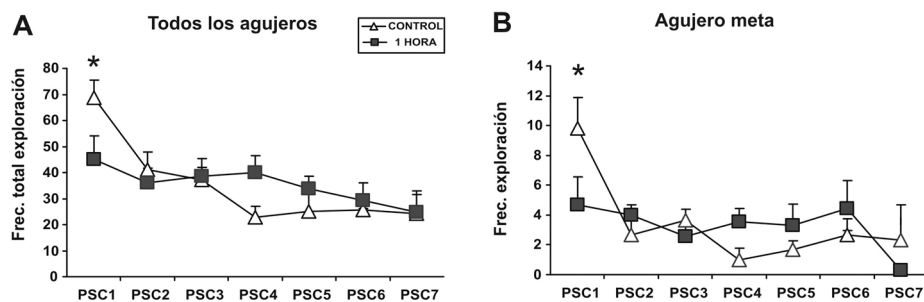


Fig. 4. Exploración de los agujeros durante la extinción. A. Frecuencia de exploración de todos los agujeros a lo largo de los siete ensayos sin caja de escape (PSC 1 a PSC 7), para los grupos control (triángulos blancos, $n = 6$) y estrés una hora (cuadrados negros, $n = 8$). B. Frecuencia de exploración del agujero meta a lo largo de los siete ensayos sin caja de escape para los grupos control y estrés una hora. En cada gráfica se ilustra la media + el error estándar de la media (SEM). Símbolo*: diferencias significativas ($p < 0,01$) entre PSC1 y PSC7 para el grupo control (en A); diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la PSC1 del grupo control vs el grupo estrés una hora (en B).

A lo largo de las siete PSCs los animales tardaron más tiempo para explorar por primera vez el agujero meta ($F_{(1,12)} = 3,160$; $p < 0,05$; Fig. 5A). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,12)} = 2,907$; $p = 0,086$; Fig. 5A).

Puesto que desde el primer ensayo sin caja de escape se evidenció que los sujetos del grupo estrés una hora persistían menos en la exploración del agujero meta, y con el propósito de evaluar la posibilidad de una mayor velocidad del proceso de extinción,

se analizó el desempeño de los sujetos de ambos grupos en cada minuto de dicho ensayo. Durante el primer minuto (INT1) los animales de ambos grupos no persistieron en la exploración del agujero meta (Fig. 5B, INT1) y exploraron por igual todos los agujeros del laberinto (Fig. 5C, INT 1). Durante el segundo minuto (INT2), los animales del grupo control exploraron el agujero meta por encima del nivel de azar ($p < 0,05$) mientras que los animales del estrés una hora exploraron con frecuencia similar todos los agujeros del laberinto (Fig. 5B y Fig. 5C, INT2). Durante el tercer (INT3) y el cuarto (INT4) minutos los animales de ambos grupos no persistieron en la exploración del agujero meta (Fig. 5B, INT 3 e INT 4) y exploraron por igual todos los agujeros del laberinto (Fig. 5C, INT 3 e INT 4).

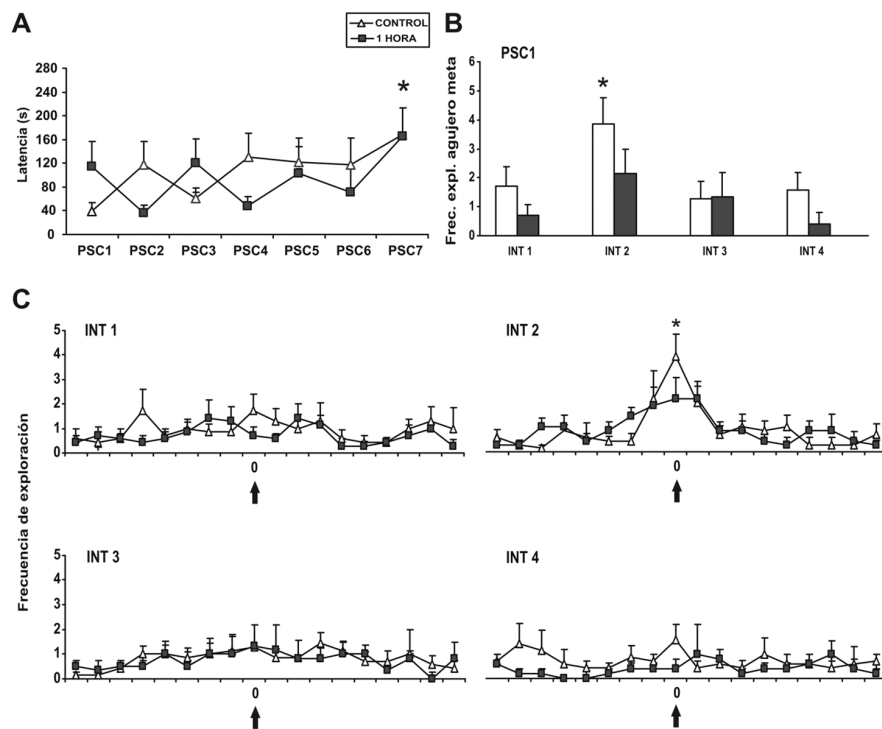


Fig. 5. Evolución de la latencia de escape durante la fase de extinción y análisis por intervalos de la frecuencia de exploración de los agujeros durante el primer ensayo sin caja de escape (PSC1). A. Latencia de llegada al agujero meta (0) a lo largo de los siete ensayos sin caja de escape (PSC1 a PSC7), para los grupos: control (triángulos blancos, $n = 6$), y estrés una hora (cuadrados negros, $n = 8$). B. Frecuencia de exploración del agujero meta durante el primer ensayo sin caja de escape (PSC1) discriminada en intervalos de un minuto (INT 1 a INT 4) para los grupos: control (barras blancas) y estrés una hora (barras negras). C. Frecuencia de exploración de cada uno de los dieciocho agujeros del laberinto durante el primer ensayo sin caja de escape (PSC1) discriminada en intervalos de un minuto (INT 1 a INT 4) para los grupos: control (triángulos blancos) y estrés una hora (cuadrados negros). En cada gráfica se ilustra la media + el error estándar de la media (SEM). Símbolos: *, $p < 0,05$; flecha, indica el agujero meta (0).

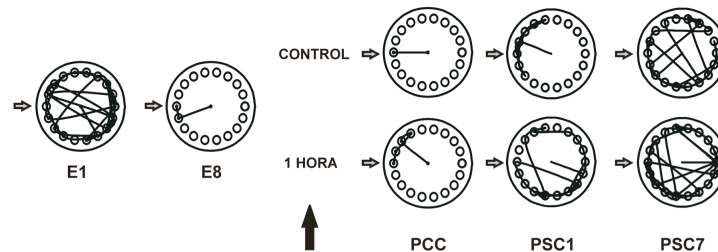


Fig. 6. Diagramas polares de la trayectoria aproximada en el laberinto de Barnes durante ensayos representativos de las fases de adquisición, recuperación y extinción. Flechas horizontales: ubicación del agujero meta; flecha vertical: tratamiento (control, estrés una hora); E1: Ensayo 1 de adquisición; E8: ensayo 8 de adquisición; PCC: prueba con caja; PSC1: prueba sin caja 1; PSC7: prueba sin caja 7.

DISCUSIÓN

Los sujetos de ambos grupos lograron adquirir satisfactoriamente la tarea espacial, como lo indica que la latencia de escape y los errores de agujero durante el octavo ensayo de entrenamiento fueron significativamente menores que durante el primer ensayo de entrenamiento (Fig. 2A; Fig. 2B; Tabla 1 y Tabla 2). Este resultado indica que una sola sesión de entrenamiento con ocho ensayos es suficiente para lograr un aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes.

De modo similar, los sujetos de ambos grupos evocaron adecuadamente la memoria espacial durante la PCC, como lo indica que la latencia de escape y los errores de agujero fueron significativamente menores que durante el primer ensayo de entrenamiento (Fig. 2A; Fig. 2B; Tabla 1 y Tabla 2). No obstante, el estrés provocado por restricción de movimientos durante una hora antes de la evaluación deterioró la evocación de la memoria espacial, como lo indica que tanto la latencia de escape, como los errores de agujero de los sujetos del grupo estrés una hora fueron significativamente mayores que los de los sujetos del grupo control (Fig. 2C; Fig. 2D; Fig. 6, PCC).

Durante el primer ensayo sin caja de escape (PSC1) solo los sujetos del grupo control exploraron con persistencia el agujero meta (Fig. 3A; Fig. 4B; Fig. 6, PSC1). No obstante, esta persistencia solo se manifestó durante el segundo minuto de la PSC 1 (Fig. 5B y Fig. 5C). En los restantes ensayos sin caja de escape (PSC2 a PSC7) ninguno de los grupos manifestó persistencia en la exploración del agujero meta (Fig. 3C). Tomados en conjunto con el rendimiento durante la fase de adquisición y la PCC, los datos de las PSC sugieren una extinción del aprendizaje espacial en ambos grupos. No obstante, dada la recuperación espontánea observada en los sujetos del grupo control durante el segundo minuto de la PSC1, se puede inferir que el proceso de extinción fue más rápido en los sujetos del grupo estrés una hora que en los del grupo control.

La exitosa adquisición y evocación de la memoria espacial con un entrenamiento de ocho ensayos en el laberinto circular de Barnes sugiere que en el protocolo de entrenamiento usado inicialmente en el Laboratorio de Neurofisiología Comportamental (LNfC) se

producía un sobreentrenamiento de la tarea espacial (Angueyra y Arcos, 2006; Carvajal, 2006; Torres, 2006). Este protocolo constaba de dos sesiones de entrenamiento, cada una de ocho ensayos (16 ensayos en total), realizadas en días consecutivos. De hecho, en los experimentos en que se usó este protocolo, no se observaron diferencias significativas en la latencia de escape ni en los errores de agujero ponderados entre los ensayos ocho y 16 (Angueyra y Arcos, 2006; Carvajal, 2006; Torres, 2006).

El deterioro de la evocación de la memoria espacial en los sujetos sometidos a estrés antes de la sesión de evaluación concuerda con estudios previos, en los que la exposición a diferentes eventos estresantes (choque eléctrico en las patas, privación de sueño y olor sintético de predador) antes de la evaluación de un aprendizaje, deteriora el proceso de recuperación (De Quervain *et al.*, 1998; Youngblood *et al.*, 1997; Morrow *et al.*, 2000; Sandi *et al.*, 2005). No obstante, este resultado difiere parcialmente de los hallazgos de experimentos anteriores del LNFc en los cuales no se encontró efecto del estrés por restricción de movimientos (durante una hora o cuatro horas), ni de la inyección sistémica de corticosterona (en dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg) sobre la ejecución en la PCC. En dichos experimentos, aunque todos los grupos desplegaron persistencia significativa en la exploración del agujero meta en la PSC1, ésta fue significativamente menor en los animales que recibieron estrés durante cuatro horas o 3 mg/kg de corticosterona antes de la evaluación (Torres, 2006; Carvajal, 2006). Esto sugiere que los efectos del estrés sobre la retención de la memoria espacial son diferentes dependiendo del número de ensayos de entrenamiento recibidos por los sujetos y motiva el desarrollo de experimentos diseñados para evaluar tal posibilidad.

El haber encontrado evidencia de que la extinción de la memoria espacial empieza desde el primer ensayo sin caja de escape sugiere una reinterpretación de los resultados obtenidos por otros grupos. Así, en estudios realizados en el laberinto acuático de Morris, como el publicado por De Quervain *et al.*, 1998, se observó que los animales sometidos a estrés 30 min antes de la evaluación no persistían en la exploración del cuadrante en el cual se encontraba la plataforma de escape durante los ensayos de entrenamiento. Esta perturbación en la ejecución de la tarea espacial estaba directamente relacionada con el perfil temporal de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal durante la respuesta de estrés. En efecto, la retención no se veía afectada cuando el animal era expuesto al mismo evento estresante dos minutos o cuatro horas antes de la prueba. Estos resultados han sido interpretados en términos de que el estrés impide la recuperación de la memoria espacial. No obstante, esta interpretación podría estar sesgada por la forma en que se evalúa la memoria espacial en el laberinto de Morris (por la persistencia en la exploración del cuadrante meta durante un ensayo en el que se ha retirado la plataforma de escape) y por el carácter intrínsecamente estresante del nado forzado durante la evaluación (Harrison *et al.*, 2009).

En contraste, en el LNFc se evalúa la retención de la memoria espacial en el laberinto de Barnes, mediante dos ensayos separados: uno con caja de escape (que muestra retención de la ejecución tras un período de retardo una vez finalizado el entrenamiento) y uno sin caja de escape (que indica la retención de la ubicación espacial de la meta a través de la persistencia en la exploración del agujero meta). Mediante esta estrategia se ha establecido que el estrés agudo (Torres, 2006), el estrés crónico (Usme, 2005) o la corticosterona administrada sistémicamente (Carvajal, 2006) no afectan significati-

vamente la retención en cuanto a la ejecución de la tarea espacial, pero sí en términos de la persistencia en la exploración del agujero meta en animales que han recibido 16 ensayos de entrenamiento distribuidos en dos sesiones (Torres, 2006). Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que el efecto del estrés consistiera en hacer más lábil la memoria espacial al proceso de extinción.

Kawasaki e Iwasaki, 1997, encontraron que la concentración de glucocorticoides, y por tanto la actividad de el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, aumenta durante la extinción de una tarea en la cual el animal debía recorrer un camino recto para obtener un reforzador alimenticio al final. Más aún, Barrett y González-Lima, 2004, describieron que la administración de un antagonista de glucocorticoides deteriora la extinción de una tarea de aprendizaje asociativo. Estos hallazgos sugieren también que la extinción podría ser facilitada por el estrés. En este sentido, los hallazgos en el laberinto de Morris podrían ser reinterpretados como el resultado de una extinción acelerada por el estrés previo a la evaluación y por el carácter intrínsecamente estresante de la prueba. Los resultados del presente experimento dan apoyo empírico a esta interpretación, mostrando que niveles intermedios de estrés facilitan la extinción de la memoria espacial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de COLCIENCIAS (Código de Proyecto: 1101-408-20494) y la Dirección de Investigación, Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia (Código de Proyecto: 203010011921).

BIBLIOGRAFÍA

ANGUEYRA JM, ARCOS D. La extinción facilita la nueva adquisición de la memoria espacial en ratas en el laberinto de Barnes [Trabajo de grado]. Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2006.

BARNES CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psych*. 1979;93(1):74-104.

BARRETT D, GONZÁLEZ-LIMA F. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. *Neurosci Lett*. 2004;371:91-96.

BOWMAN R, BECK K, LUINE V. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav*. 2003;43(1):48-59.

CARVAJAL A. Efectos de la inyección sistémica de corticosterona, como modelo de estrés agudo, sobre la recuperación de la memoria espacial en ratas. [Tesis de Maestría]. Bogotá: Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia; 2006.

COBURN-LITVAK PS, POTHAKOS K, TATA DA, MCCLOSKEY DP, ANDERSON BJ. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2003;80(1):11-23.

DE QUERVAIN DJF, ROOZENDAL B, MCGAUGH JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*. 1998;394:787-790.

HARRISON FE, HOSSEINI AH, MC DONALD MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*. 2009;198(1):247-251.

KAWASAKI K, IWASAKI T. Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sci.* 1997;61(17):1721-1728.

KIM J, DIAMOND D. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(6):453-462.

LUINE V, MARTINEZ C, VILLEGAS M, MAGARINOS AM, MCEWEN B.S, Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol Behav.* 1996;59(1):27-32.

LUPIEN SJ, MCEWEN BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev.* 1997;24(1):1-27.

MCLAY R, FREEMAN S, ZADINA J. Chronic corticosterone: Impairs Memory Performance in the Barnes Maze. *Physiol Behav.* 1998;63(5):933-937.

MELLO PB, BENETTI F, CAMMAROTA M, IZQUIERDO IE. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc.* 2008;80(2):301-309.

MORROW BA, ROTH RH, ELSWORTH JD. TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat. *Brain Res Bull.* 2000;52(6):519-523.

MUELLER BR, BALE TL. Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. *Physiol Behav.* 2007; 91(1):55-65.

ROOZENDAAL B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;78(3):578-95.

SANDI C, WOODSON J, HAYNES V, PARK C, TOUYAROT K, *et al.* Acute Stress-Induced Impairment of Spatial Memory is Associated with Decreased Expression of Neural Cell Adhesion Molecule in the Hippocampus and Prefrontal Cortex. *Biol Psychiat.* 2005;57(1):856-864.

TORRES A. Efectos del estrés agudo por restricción motora sobre la recuperación y la extinción de una tarea espacial en ratas [Trabajo de grado]. Bogotá: Facultad de Ciencias Humanas, Universidad Nacional de Colombia; 2006.

USME C. Efecto del estrés crónico por restricción de movimientos sobre el aprendizaje espacial en ratas [Trabajo de grado]. Bogotá: Facultad de Ciencias Humanas, Universidad Nacional de Colombia; 2005.

WALESIUK A, BRASZKO JJ. Preventive action of Ginkgo biloba in stress- and corticosterone-induced impairment of spatial memory in rats. *Phytomedicine.* 2009;16(1):40-46.

YOUNGBLOOD B, ZHOU J, SMAGIN G, RYAN D, HARRIS R. Sleep Deprivation by the "Flower Pot" Technique and Spatial Reference Memory. *Physiol Behav.* 1997;61(2):249-256.