

## EFFECTOS DE LA LIDOCAÍNA (LESIÓN CORTICAL REVERSIBLE) SOBRE LOS ERRORES DE MEMORIA DE CORTO Y LARGO PLAZO EN RATAS

JORGE BRICEÑO F.<sup>1</sup>, ANA DÍAZ F.<sup>1</sup>, ESTEBAN FUENTES G.<sup>1</sup>, DRA. TERESA PINTO H.<sup>2</sup>

### EFFECTS OF LIDOCAINE USE ON SHORT AND LONG TERM MEMORY MISTAKES IN RATS

**Background.** Spatial memory in rats has been widely studied in Olton octagonal maze (OM) and Morris water maze to investigate its structure in working and long term memory. Previous studies, with a non reversible lesion, show the magnitude of the extrastriated-anteromedial visual cortex (EAVC) in long term memory (LTM). Our goal is to elucidate, by means of reversible cortical lesion (lidocaína), this area's function within LTM and working memory (WM) using the modified (OM).

**Methods.** We trained n experimental group of 6 and a control group of 4 Hooded Machos rats in modified OM during 20 sessions. We injected lidocaine in the experimental group with microdialysis probes implanted with stereotaxic surgery.

**Results.** Comparing WM and LTM mistakes under the effect of lidocaine, we found significant differences in the experimental group only such as WM and LTM.

**Conclusions.** EAVC is relevant in both types of memory.

**Key Words:** memory, lidocaine, rats, visual cortex, octagonal maze.

### INTRODUCCIÓN

El comportamiento espacial de los roedores en su medio natural, muestra que algunas especies utilizan una estrategia de gana-cambia (win shift) para obtener su alimento, es decir, no vuelven al sitio donde se han alimentado previamente. Este tipo de estrategia les permite protegerse del medio, de los predadores, ahorrar tiempo y energía.

Los hábitos espaciales tienen gran importancia biológica para los seres vivos, permiten encontrar la fuente de alimentación y por lo tanto aseguran su supervivencia. Es sabido que los predadores esconden bajo tierra parte de la presa y más tarde pueden ubicar el lugar con precisión. La posibilidades de lograrlo en el ambiente natural, que es complejo y cambiante, no sería posible usando claves proximales o kinestésicas. Muchos autores coinciden en que es necesario integrar señales distales en un mapa representacional y cognitivo. En la ontogenia aparecerían primero las estrategias con claves proximales (egocéntricas) olfatorias, táctiles y kinestésicas; y posteriormente las que utilizan estímulos distales (alocéntricas) como las visuales

y auditivas. Las situaciones experimentales más usadas en el estudio de la memoria espacial han sido los laberintos, especialmente el de Morris y el de Olton.

El laberinto octogonal de Olton (1, 2) exige del animal para su solución la estrategia gana-cambia. El animal debe recorrer los ocho brazos sin repetir ninguno. Todos los autores coinciden que está involucrada una memoria de corta huella pues debe recordar las vías ya recorridas y cuales les falta por recorrer. La huella mnémica debe permanecer activa hasta terminar la tarea, esta se denomina Memoria de Trabajo (MT), que es un tipo de memoria de corta huella. Posteriormente otros autores modificaron el Laberinto Olton de 8 brazos por uno llamado de Olton 4 x 4 (3). Este último permite medir tanto la Memoria de Corto (MCP) como la de Largo Plazo (MLP) (4, 5).

En cuanto a las estructuras neurológicas involucradas, el hipocampo (5) y las áreas corticales extraestriadas antero-medial (CVEAM) son relevantes en los hábitos visuoespaciales y tendrían un rol en la Memoria de Largo Plazo. En este laboratorio se ha demostrado, que lesiones irreversibles de CVEAM con ácido iboténico, en ratas experimentales en el Laberinto de Agua de

<sup>1</sup> Estudiante 3º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>2</sup> Profesora Titular de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Morris, provocarían en estas ratas, un déficit significativo en la latencia para encontrar la plataforma de escape (6).

Objetivos:

El papel de la corteza cerebral en memoria de corto plazo en roedores ha sido escasamente estudiado, por esto nos propusimos investigar el rol que jugaría la corteza extraestriada antero-medial tanto en la Memoria de Corto plazo (MCP) como en la Memoria de Largo plazo (MLP) en la resolución de una tarea visuoespacial, en el Laberinto Octogonal de Olton Modificado (4 X 4). Se aplicó localmente lidocaína en CVEAM, (lesión reversible (3)), tratando de confirmar nuestra hipótesis de que esta área juega un rol importante tanto en la MLP como en la MCP.

## MATERIAL Y MÉTODO

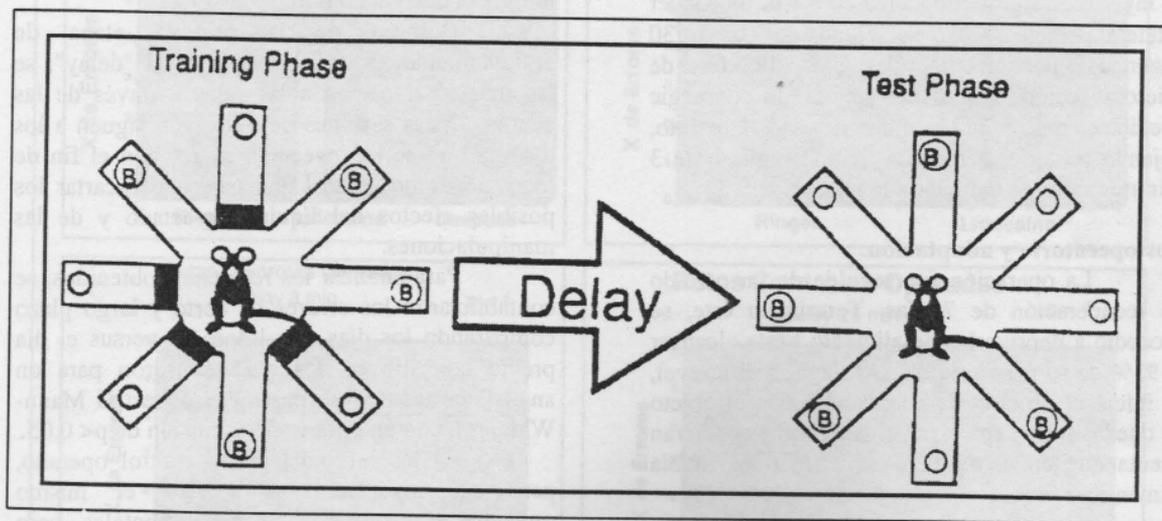
### Aparato:

Laberinto de Olton modificado (4 x 4) (Figura 1), tiene una plataforma central octogonal de 34 cm de diámetro de la que salen 8 brazos, con dimensiones de 71 cm de largo por 7,5 de ancho cada uno. Los brazos en su extremo distal presentan un depósito circular para el alimento (recompensa) que está oculto a la vista de la rata. El laberinto tiene una elevación de 96 cm desde el suelo (Figura 1).

### Sujetos:

Se utilizaron 10 ratas Hooded (Long-Evans) machos, entre 265-280 g, criadas en vivero bajo un ciclo de luz-oscuridad invertido de 12:12 horas. Las ratas fueron privadas de comida hasta tener el 95% de su peso inicial.

Se formaron 2 grupos: un grupo control (n = 4) que fue operado pero no fue inyectado y un grupo experimental (n = 6).



**Figura 1.** En la fase de entrenamiento (training phase), se bloquean 4 brazos al azar. Una vez dentro del laberinto la rata debe explorar los 4 brazos restantes, y debe comer el alimento (refuerzo) que hay en su extremo distal. En la exploración la rata no debe entrar a un brazo ya visitado, esto constituye un error en la MCP. Una vez terminada la tarea, la rata es retirada. Luego de un delay (de 8 o 25 min), la rata es devuelta al laberinto (test phase), esta vez sin bloqueos. En este caso la rata debe explorar solo los brazos que anteriormente estaban bloqueados (estrategia win-shift), en los cuales hay refuerzo. Si la rata vuelve a un brazo en el que ya había estado en la fase de entrenamiento, se considera como error en la MLP.

### Cirugía Estereotáxica:

Se realizó una pre-anestesia con 0,5 ml de una solución de hidrato de cloral 7% con el

objeto de ubicarlas adecuadamente en el equipo estereotáxico de Knof; una vez posicionadas se les administró Halotano 1,5-2%, durante todo el

procedimiento. Luego se aplicó lidocaína 2% sobre la piel. Se hizo una pequeña incisión en la línea media del cráneo, una vez expuesto el hueso se determinaron las coordenadas del área a canular utilizando Bregma como punto de referencia. Los parámetros estereotáxicos fueron -4,2 mm eje AP, +3,4 mm ML y 0,5 mm eje DV. Mediante una pequeña perforación en el cráneo se tuvo acceso a la duramadre. En ésta se hizo una incisión tangencial que permitió la implantación de la cánula guía CMA/7, a una profundidad de 0,07 mm desde la duramadre. Estas se fijaron al cráneo por medio de cemento dental que se "ancló" a dos tornillos, previamente instalados a cada lado del Bregma, para evitar el desplazamiento de la estructura.

#### **Método de inyección:**

Las sondas de microdiálisis CMA/12 (cat n° 8309561 marca CMA/microdiálisis AB) fueron modificadas, cortando su porción dializante para transformarla en cánula de inyección, ésta fue introducida en la cánula guía (VCMA 17) 0,2 mm más allá de la punta.

En una sala vecina a la del entrenamiento se inyectó 20 µgr de lidocaína en 0,5 µl de Ringer bilateralmente, a una velocidad de 0,5 µl/30 segundos por medio de una Bomba de microinyección CMA/100 n° 1 de Carnegie Medicine antes de introducirlos al laberinto, dejando posteriormente un tiempo mínimo de 3 minutos antes de entrenar a la rata.

#### **Postoperatorio y adaptación:**

La operación fue seguida de un período de recuperación de 7 días. Terminado éste, se procedió a privarlas de alimento hasta alcanzar el 95% de su peso original. Al llegar a este nivel, se inició el proceso de adaptación, con el objeto de que las ratas exploraran el laberinto y se dieran cuenta que en el extremo de cada brazo había alimento.

#### **Entrenamiento:**

Este consiste en 20 sesiones consecutivas, 1 diaria. Cada sesión consta de 2 etapas:

- Primera Etapa de entrenamiento: Se bloquea la entrada de 4 brazos elegidos al azar y en los 4 brazos libres se coloca el alimento. Las ratas son puestas dentro del laberinto por un período máximo de 10 minutos. Si las ratas se comen el alimento en los 4 brazos antes del tiempo máximo, son sacadas del laberinto.

- Segunda Etapa de prueba o Test: Se quita el bloqueo de los 4 brazos y se coloca el alimento en

los brazos bloqueados en la etapa control. Las ratas son puestas en el laberinto, esta vez no deben visitar los cuatro brazos ya recorridos. El tiempo que una rata puede permanecer en el laberinto es de 10 minutos, concluido éste, la rata es retirada aunque no haya completado la tarea.

Entre ambas etapas del entrenamiento hay un retardo (delay) de 8 minutos, exceptuando las dos últimas sesiones que tuvieron un delay de 25 min.

Los errores cometidos por las ratas pueden ser de 2 tipos:

- Error A o de MLP: Se produce cuando la rata vuelve a entrar a un brazo en el que ya había comido en la primera etapa.

- Error B o de MCP: Se produce cuando durante el test (segunda etapa), la rata entra a un brazo que ya había visitado.

El criterio de aprendizaje se definió como el momento en que los errores promedio de las ratas no sobrepasaban un error en la Etapa de Test. El número total de sesiones depende por lo tanto, del tiempo que demoren en alcanzar este promedio, una vez alcanzado, se comprueba que la rata realmente emplea MLP, para lo cual se amplía el delay a 25 min.

Después de la primera etapa de entrenamiento, específicamente en el "delay", se les inyectó lidocaína a las ratas a través de las cánulas. Estas sesiones de inyección siguen a los días en que se ha inyectado suero, con el fin de tener un grupo control que permita descartar los posibles efectos del líquido inyectado y de las manipulaciones.

Para analizar los resultados obtenidos, se contabilizaron los errores de corto y largo plazo comparando los días con lidocaína versus el día previo con Ringer, los que se usaron para un análisis estadístico no paramétrico (test U Mann-Whitney), con un criterio de exclusión de  $p < 0,05$ .

En las ratas del grupo control operado, pero no inyectado, se realizó el mismo procedimiento que con las experimentales, pero estas se utilizarán solo para evaluar los efectos de la cirugía e implantación de cánulas, en el comportamiento de las ratas.

Finalmente, después de sacrificar a las ratas, se realizaron cortes histológicos del cerebro, para controlar el lugar de implantación de las cánulas.

## RESULTADOS

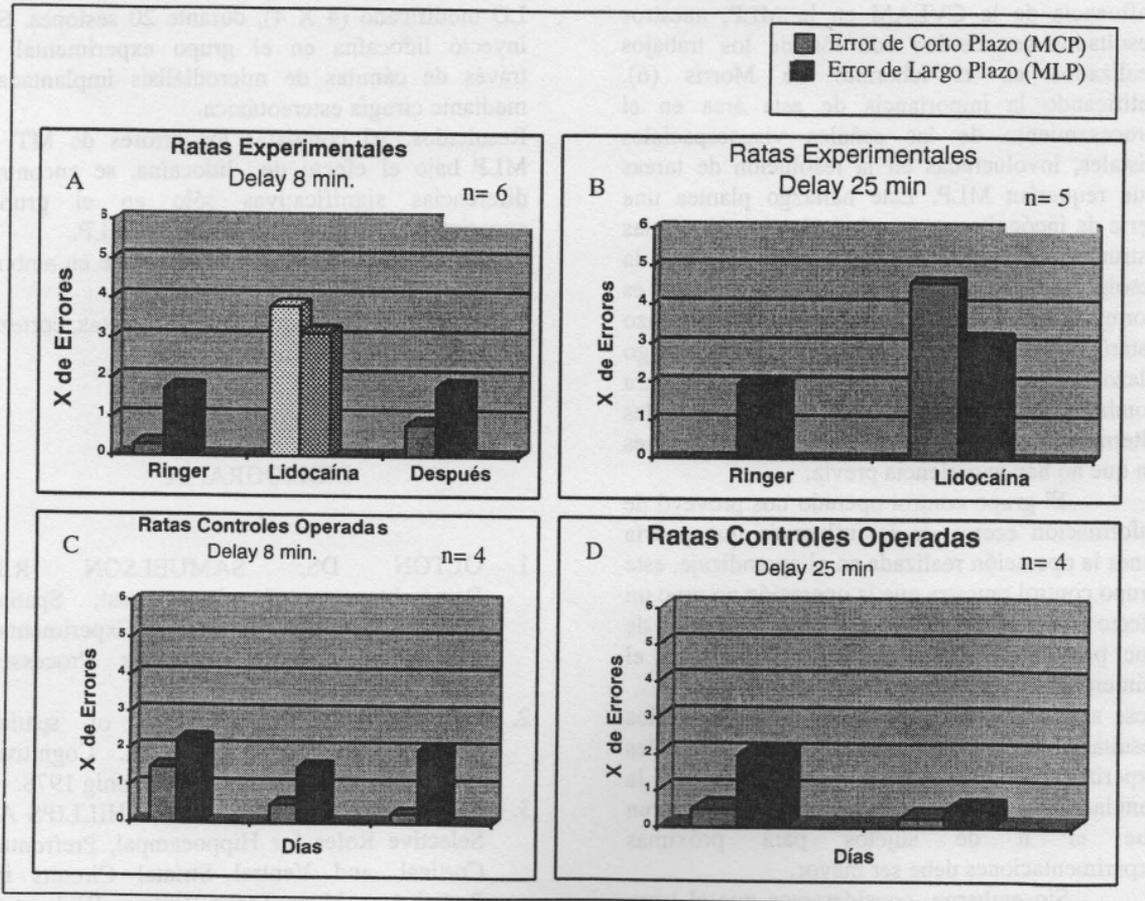
Una vez terminado el entrenamiento, se procedió a comparar los errores cometidos por el Grupo Experimental de ratas en dos de las sesiones con lidocaína, con respecto a los cometidos el día anterior y posterior a esta. Los resultados (Figura 2A) evidencian un significativo aumento de los errores que involucran tanto MCP como MLP en los días de inyección, con respecto al día anterior (Ringer) y al día post-inyección. Este estudio se hizo a nivel de la octava sesión (Figura 2A) y en la última (Figura 2B), con retardo de 8 min. y 25 min. respectivamente.

Para las ratas experimentales los resultados de las sesiones con delay de 8 minutos fueron de  $p = 0,016$  para MCP y de  $p = 0,008$  para

MLP; y los de las sesiones con delay de 25 minutos fueron de  $p = 0,016$  para MCP y de  $p = 0,048$  para MLP.

En la figura 2C se muestra el comportamiento del grupo control operado y no inyectado en los mismos días en que se evaluó el efecto de la lidocaína en el comportamiento del grupo experimental. No hay cambios significativos en los errores de MLP, pero se ve un descenso progresivo de los errores de corto plazo.

La última sesión de entrenamiento se realizó con un delay de 25 min. con el propósito de comprobar que los sujetos realmente estaban ocupando MLP en la solución de la tarea (Figuras 2B y 2D), esta arrojó resultados positivos, confirmando la utilización de esta.



**Figura 2.** Efectos de la lidocaína sobre los errores de MCP y MLP. En la parte superior se muestra el comportamiento de las ratas experimentales en dos etapas del entrenamiento. En A y B se compara el promedio de errores de MCP (■) y MLP (■) en tres días consecutivos: ringer – lidocaína – día después de la inyección con lidocaína, con un retardo de 8 min. en A y 25 min. en B. En esta última, aparecen sólo dos días: ringer y lidocaína. En los gráficos inferiores, C y D, se muestra el comportamiento del grupo control operado pero no inyectado, en las sesiones de los días correspondientes a la de los grupos experimentales representados en A y B. Nótese el descenso progresivo en los errores MCP en los gráficos C y D.

## DISCUSIÓN

En nuestro estudio, inhibiciones transientes bilaterales con lidocaína en la CVEAM mostraron el rol de esta área en la resolución de tareas que involucraban memorias tanto de corto como largo plazo. Esto constituye un hallazgo, ya que se había considerado que la resolución de tareas que involucraban MCP dependía fundamentalmente del lóbulo frontal y estructuras subcorticales (3). En estudios realizados en este laboratorio en los cuales se lesionaba esta área en forma irreversible con ácido iboténico, no se encontraron cambios significativos en los errores que cometían las ratas dentro del laberinto (comunicación personal T.P.). Con respecto a la influencia de la CVEAM en la MLP, nuestros resultados concuerdan con los de los trabajos realizados en el laberinto de Morris (6), ratificando la importancia de esta área en el procesamiento de las señales visuoespaciales distales, involucradas en la resolución de tareas que requerían MLP. Este hallazgo plantea una serie de incógnitas acerca de la interacción de las estructuras cognitivas involucradas en la resolución de este tipo de tareas. Una de éstas es por ejemplo, conocer si la memoria de corto plazo estaría siendo "corticalizada" por la de Largo plazo, cuando ambas actúan de manera combinada. O bien, que otros circuitos neurales alternativos estarían involucrados en situaciones en que no hay experiencia previa.

El grupo control operado nos proveyó de información acerca de la influencia que podría tener la operación realizada en el aprendizaje, este grupo control muestra que la operación no tuvo un efecto observable, ya que las ratas a medida de que progresaba el entrenamiento disminuían el número de errores cometidos.

Pese a que el estudio estadístico mostró que los resultados son significativos, dificultades experimentales, como la exactitud de la canulación y la permanencia de estas, sugieren que el n de sujetos para próximas experimentaciones debe ser mayor.

Sin embargo, consideramos que el tema no esta agotado y que futuras investigaciones podrían, dilucidar cómo y cuando la CVEAM se involucra en memoria de corto plazo.

## RESUMEN

Antecedentes. La memoria espacial en ratas ha sido ampliamente estudiada en el laberinto octogonal de Olton (LO) y el de agua de Morris, lo que ha permitido conocer mejor la estructura de esta, tanto en la de trabajo (MT) como en la de largo plazo (MLP). Estudios previos, mediante lesión no reversible, demuestran la importancia de la Corteza visual extraestriada-anteromedial (CVEAM) en MLP (5). Nos propusimos dilucidar mediante lesiones corticales reversibles (lidocaína), la función de esta área en la MLP y MT empleando el LO modificado (4 x 4).

Métodos. Se entrenó un grupo experimental (n=6) y uno control (n=4), de ratas Hooded Maches, en LO modificado (4 X 4), durante 20 sesiones. Se inyectó lidocaína en el grupo experimental a través de cánulas de microdiálisis implantadas mediante cirugía estereotáxica.

Resultados. Al comparar los errores de MT y MLP bajo el efecto de lidocaína, se encontró diferencias significativas sólo en el grupo experimental, tanto en MT como en MLP.

Conclusiones. La CVEAM es relevante en ambos tipos de memoria.

Palabras claves: memoria, lidocaína, ratas, corteza visual, laberinto octogonal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. OLTON DS, SAMUELSON R.J. Remembrances of places past: Spatial memory in the rat. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 1976; 2: 97-116.
2. OLTON DS. Characteristics of spatial memory. En: Hulse S et al. *Cognitive Processes in Animal Behavior*. Honig 1978.
3. FLORESCO S, SEAMANS J, PHILLIPS A. Selective Roles for Hippocampal, Prefrontal Cortical, and Ventral Striatal Circuits in Radial-Arm Maze Tasks With or Without a Delay. *The Journal of Neuroscience* 1997; 17(5): 1880-1890.
4. SEAMANS J, PHILLIPS A. Selective Memory Impairments Produced by Transient Lidocaine-Induced Lesions of Nucleus Accumbens in Rats. *Behavioral Neuroscience* 1994; 108 (3): 456-468.

5. O'KEEFE J, NADEL L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford University Press 1978.
6. ESPINOZA S, PINTO T, PASSING C, CARREÑO F, MARCHANT F, URZÚA C. Deficit in the Anteromedial Extrastriate Cortex in Rats. *Physiology & Behavior* 1999; 66 (3); 493-496.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a la Dra. Teresa Pinto quien nos dirigió, por su paciencia y dedicación y a su asistente el Sr. Aníbal Martínez. También debemos nuestro agradecimiento a los doctores Mario Herrera- Marschitz y Diego Bustamante gracias a los cuales fue posible implantar las cánulas de microdiálisis.

### Correspondencia:

Jorge Briceño F.  
 jacobri@hotmail.com