

EFFECTO EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL
DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO EN RATAS:
ESTUDIO PRELIMINAR

R. Oyuela*, L. Lareo, L. Muñoz, L. Morales, S. Echeverry,
A. Uribe, O. Santos y A. Acuña
Laboratorio de Psicología & Bioquímica Computacional y Estructural
Pontificia Universidad Javeriana

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo la indagación de los efectos de un nuevo péptido, diseñado con base en las conantoquinas, como posible agente sensible al receptor NMDA en el aprendizaje y la memoria espacial en ratas. Por medio del laberinto de agua de Morris, y el protocolo adaptado de Magnusson, mediante un diseño de medidas repetidas con un grupo control y tres experimentales –Péptido, NMDA y MK-801– se evaluó en 24 ratas macho Wistar entre 8 y 9 meses de edad, asignadas aleatoriamente a cada grupo. Los datos sugieren que el péptido diseñado mejora los procesos de memoria espacial y aprendizaje vs. el grupo control y el grupo MK-801 con un nivel de significancia $p < .05$. En comparación con el grupo NMDA esta mejoría se observó en el 50% de los sujetos. Se discuten las implicaciones

Fecha de recepción: Febrero de 2004

* Psicólogo, director del Laboratorio de Psicología de la Pontificia Universidad Javeriana.
raul.oyuela@javeriana.edu.co

de estos hallazgos, y posibles extensiones de esta investigación con el objetivo de validar los resultados de este estudio preliminar.

Palabras claves: Memoria espacial (48877), aprendizaje (28030), aprendizaje espacial (48876), péptido (37330), aprendizaje en ratas (42860).

Abstract

This paper investigated the effects of a new peptide, designed from conantokinins, as a possible pharmacophore of the NMDA receptor in learning and spatial memory in rats. The Morris Watermaze (1981) and Magnusson's protocol (1998) were adapted and used. The methodology was repeated measures with one control and three experimental groups: Peptide, NMDA and MK-801. Subjects were 24 male Wistar rats between 8 and 9 months old, randomly assigned to groups, having free access to food and water, kept in a controlled temperature environment of $20 \pm 25^\circ \text{C}$, and 12/12 light-darkness cycles, before and during the experiment. Results suggest that the designed peptide improves spatial memory and learning, compared to control and MK-801 ($p < 0.05$). 50% of subjects showed improvement in the NMDA group. Implications of these findings and possible extensions of this research are discussed, tending to validate the results of this preliminary study.

Key words: Spatial Memory (48877), Learning (28030), Spatial Learning (48876), Peptides (37330), Rat Learning (42860).

Los procesos de aprendizaje y memoria han sido un permanente reto a la investigación en fisiología, neurología, psicología y en general todas las ciencias que tienen que ver con el hombre. El aprendizaje no es un tipo específico de actividad, es un cambio que ocurre en el organismo durante muchos tipos de actividad y se muestra más tarde como postefecto de ésta (Woodworth & Schlosberg, 1964). En un sentido amplio, la memoria y el aprendizaje son dos procesos que se llevan de manera conjunta. En efecto, cuando una rata ha aprendido, por ejemplo, su camino por un laberinto hacia la comida y sigue recorriendo el camino correcto después de un intervalo de tiempo, demuestra, ciertamente, memoria de lo que ha aprendido. La unión de estos dos procesos es lo que permite a los organismos vivientes su adaptación de manera flexible al ambiente que los rodea.

Los estudios fisiológicos hechos en 1900 por Müller y Pilzicker (citados por West, 1999) determinaron que el establecimiento de la memoria

ocurre en dos estadios diferentes: uno es de forma lábil o memoria a corto plazo, y el otro es más avanzado y consiste en la permanencia de la memoria, denominado memoria a largo plazo. Squire publicó en 1987 una revisión autorizada y juiciosa de las perspectivas actuales sobre el proceso de memoria y aprendizaje. Squire (1987) presume que la memoria depende de la participación de un conjunto de neuronas, encargadas del procesamiento de diferentes tipos de información, formando sistemas especializados en cada tipo de información y que guardan el producto de éste. La memoria a largo plazo depende de un cambio a nivel sináptico de un conjunto de neuronas repartidas que pertenecen a un conjunto diferente de procesamientos, el fortalecimiento de algunas conexiones neuronales se lleva a cabo por las reflexiones sinápticas del ensayo, reaprendizaje y olvido normal, dando como resultado un remodelado de los circuitos nerviosos que originalmente representaban la información almacenada.

En otras palabras, el aprendizaje se logra por la experiencia, se perfecciona con la práctica y las cosas aprendidas dejan huellas que se relacionan entre sí. Estas huellas no sólo son a nivel cognoscitivo sino que están correlacionadas con cambios a nivel neuronal, por tanto, el aprendizaje no sólo procede del exterior sino que se configura también entre conexiones sinápticas, por lo cual el proceso de aprendizaje puede ser abordado desde la bioquímica (Rosenwieig & Leiman, 1992).

En efecto, la supremacía de la sinapsis en las teorías sobre el aprendizaje no es nada nueva. Durante años, los neurobiólogos han sospechado que el cerebro absorbe nueva información simplemente ajustando la fuerza de los enlaces entre las neuronas. Uno de los aminoácidos más importantes a nivel excitatorio del encéfalo es el glutamato. La mayor parte de este aminoácido es tomado por la glía, convertido a glutamina y trasladado nuevamente a las células glutamatérgicas. La mayoría de los receptores que median las acciones del glutamato son diferentes, pero los que se encuentran en mayor cantidad son los receptores denominados canales catiónicos que promueven la despolarización neuronal. Se encuentra, sin embargo, dos tipos de receptores denominados metabotrópicos, porque actúan con la proteína G (Roskoski, 1997).

El receptor del glutamato más estudiado es el receptor NMDA, cuyo nombre surgió debido a su activación por el N-metil-D aspartato, un agente farmacológico. El receptor de NMDA es particular debido a que para su activación se requiere tanto de glutamato como de glicina. El sitio de unión de la glicina es diferente al que tiene el receptor inhibitor de glicina. La conductancia del calcio por el canal de NMDA es mayor que la de otros receptores de glutamato. Se supone que este receptor participa activamente en los procesos de memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica, y que el calcio tiene un papel clave en estos procesos (Roskoski, 1997; Gallagher, Burwell, Burchinal, 1993; Magnusson, 1995; Shimizu, 2000; Dracheva, 2001).

En las últimas décadas se ha realizado una serie de investigaciones que identificaron el glutamato como el neurotransmisor más importante en los organismos superiores, y uno de sus receptores, el receptor de glutamato activado por N-metil-D-aspartato (iGluR-NMDA), como la molécula central en estos procesos de aprendizaje y memoria (Tang, Shimizu, Dube, Rampon, Kerchner, Zhuo, Liu & Tsien, 1999; Zama-millo, 1999; Shimizu, 2000; Tsien, 2000; Berman, 2001). En 1999 Tsien logró generar un ratón genéticamente modificado en el que había cambiado la composición y estructura del receptor iGluR-NMDA y logró demostrar, en estos ratones, la relación directa entre dicho receptor y el aprendizaje y la memoria (Tsien, 2000). Desde este momento se generó abiertamente la posibilidad de intervenir en el desarrollo de dichos procesos a través de medicamentos.

Estudios posteriores sobre mutaciones en los dominios intracelulares han demostrado que los procesos de fosforilación son esenciales para los mismos procesos de aprendizaje y memoria, ya que en aquellos en los que estos procesos se inhibieron por mutaciones puntuales, los animales resultantes fueron significativamente inferiores en sus capacidades a los no mutados (Cheng, Steinberg, Haganir & Linden, 2003). Esto confirmó las hipótesis de trabajo sobre la sobreactivación del receptor como fundamento para incrementar la memoria y el aprendizaje.

De hecho, se han realizado grandes esfuerzos para comprender los procesos celulares y subcelulares que subyacen en el aprendizaje y la

memoria en los seres humanos. Se sabe que durante la potenciación a largo plazo (LPT) se hace una intervención sobre cómo la memoria es almacenada. Sólo recientemente se identificó el receptor iGluR-NMDA como la molécula clave para este proceso (Ohno, Frankland, Chen, Costa & Silva, 2001). La sobreactivación del receptor se ha asociado con mejores capacidades de aprendizaje y memoria, así como su hipofunción con la reducción de dichas capacidades (Roberson & Sweatt, 1999).

En consecuencia, muchos investigadores en el mundo han sintetizado un gran número de compuestos similares, probando cada uno de ellos tanto en animales de laboratorio como en secciones de cerebro (Giurgea, 1973). Esto ha brindado la oportunidad de estudiar los efectos de la sobreactivación del receptor por medio de medicamentos (v. gr. Piracetam, Vimocetine, Donepezil, Remynil, Hidergine, etc.) como posibles mecanismos para incrementar temporalmente los procesos de memoria y aprendizaje (Newcomer, 1999; Dossey, 2002). Sin embargo, no se ha desarrollado un péptido que cumpla con el propósito de mejorar los procesos de memoria y aprendizaje. No obstante, se ha reconocido que las conantoquinas y conotoxinas producidas por los caracoles del género *Conos spp* son específicas para interactuar con la subunidad NR2B del iGluR-NMDA (Williams, Dave, Philips, Lin, McCabe & Tortella, 2000).

Bajo esta perspectiva, el grupo de Bioquímica Computacional y Estructural de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana ha sintetizado un nuevo péptido, con base en las moléculas de las conantoquinas; un péptido que se predice como estimulador del receptor y, en consecuencia, de los procesos de aprendizaje y memoria. Esta investigación es un estudio preliminar que aborda cuáles son los efectos sobre los procesos de memoria espacial y aprendizaje en ratas del nuevo péptido en comparación con un agonista -NMDA- y un antagonista -MK801-.

El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de un péptido sintético diseñado con base en las conantoquinas, como posible agente sensible al receptor NMDA en el aprendizaje y la memoria espacial en ratas.

MÉTODO

Diseño

Se usó un diseño experimental de medidas repetidas con un grupo control y tres grupos experimentales; un grupo que se probaba con el péptido, otro con NMDA, el otro con un antagonista al NMDA MK-801 y Sol. Sal.

Sujetos

24 ratas Wistar macho divididas aleatoriamente en 4 grupos iguales –grupo control (GC) y grupos experimentales_{1,2,3} (GE₁, GE₂, y GE₃)–, de ocho y nueve meses de edad. Se mantuvieron a una temperatura entre $20 \pm 25^\circ \text{C}$, se distribuyeron en cajas individuales de policarbonato (29 x 25 x 20 cm), con libre acceso a comida y agua, en un ciclo luz/oscuridad 12/12 horas durante todo el tiempo de la realización del experimento.

Instrumentos y sustancias

Instrumentos

Se utilizó el laberinto de agua –descrito por Morris, 1981–, el cual consiste en un tanque circular con un diámetro de 150 cm y 64 cm de profundidad. Este fue llenado de agua hasta alcanzar 26 cm, con una temperatura de 27°C y coloreada con azul de metileno. Una plataforma de escape de 10 cm de diámetro y 25 cm de altura; es decir, a 1 cm por debajo del nivel del agua. Los datos fueron registrados mediante una cámara de video Sony *Handycamp*, referencia 450X (video 8), con visión nocturna, y posteriormente proyectados para su análisis en un televisor Panasonic de 21". Además, se utilizaron dos contadores de tiempo multifunción, referencia 54035A, y una llave de respuesta, referencia 58026, marca Lafayette.

Sustancias

Para diseñar el péptido, la secuencia de la conantoquina G obtenida del *Conos geographus* fue modificada en algunos de sus aminoácidos, para generar lo que de ahora en adelante se denominará como BLMP-101, por métodos computacionales empleando los programas *InsightII* y *spdbViewer* 3.7. El concepto fundamental radica en la remoción del efecto tóxico natural de la molécula conservando su especificidad, sensibilidad y direccionalidad farmacéutica. El péptido nativo presenta una serie de aminoácidos derivatizados que no se conservan en el diseñado. Además se realizaron otras mutaciones puntuales para modificar las características de óxido-reducción del péptido en su interacción con el iGluR-NMDA. La síntesis fue contratada con la casa *Abgent* (San Diego, CA, USA).

El péptido diseñado fue diluido con solución salina (0.9mg/ml) y los sujetos de este grupo recibieron 0.640 mg/Kg de una solución 4.0 µg/µl, El MK-801 fue comprado a *Sigma-Aldrich, Inc.* (USA) y diluido con solución salina (0.9mg/ml); los sujetos de este grupo recibieron 0.080 mg/Kg de una solución 0.5 mg/ml. El NMDA fue adquirido a *Sigma-Aldrich, Inc.* y diluido con solución salina (0.9mg/ml). Los sujetos de este grupo recibieron 0.016 mg/Kg de una solución 0.1 µg/µl. Todos los grupos tuvieron como grupo control al que se le inyectó únicamente solución salina (0.9mg/ml). La administración de todas estas sustancias fue intraperitoneal (i.p.)

Procedimiento

El protocolo utilizado para esta investigación fue adaptado de Magnusson (1998). El diseño experimental tuvo una duración de 16 días, en los que se llevaron a cabo tres fases. En la fase I, la plataforma se ubicó en el centro de uno de los cuadrantes del laberinto, denominados arbitrariamente A, B, C y D, y en el cuadrante A en las fases II y III del experimento, como se muestra en la siguiente figura.

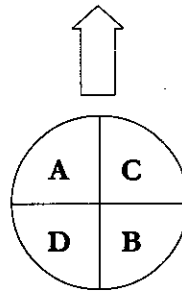


Figura 1. Laberinto de agua. En el esquema representado se observa la división de los cuadrantes y la posición en que se ubicaba la plataforma en las diferentes fases del experimento. La flecha representa el punto de inmersión de la rata en el momento de iniciar cada ensayo.

- Fase I.* En la primera fase o fase de *adaptación*, con una duración de 4 días, se realizaron tres ensayos consecutivos diariamente con cada rata. En esta fase, los sujetos de los cuatro grupos fueron inyectados con solución salina. La posición de la plataforma fue cambiada a un cuadrante diferente. Las ubicaciones de la plataforma para los ensayos fueron las siguientes: día 1, A; día 2, B; día 3, C; y día 4, D. Para cada ensayo, el animal fue ubicado dentro del laberinto desde un punto fijo de colocación, a partir del cual comenzaba a buscar libremente la plataforma en un tiempo predeterminado de 90 s. Si la rata llegaba dentro de este período, era dejada en la plataforma durante 30 s, mas si el animal no encontraba la plataforma al cabo de los 90 s, el experimentador procedía a ubicarla en ella, en la cual permanecía por 30 s. Al finalizar este tiempo, el animal era retirado de la plataforma y era sostenido por el investigador durante 30 s, para luego iniciar el segundo ensayo siguiendo el mismo procedimiento para este y el tercer ensayo. El tiempo empleado por la rata para llegar a la plataforma fue medido con un cronómetro.

- Fase II y III.* La fase II o de *entrenamiento* se llevó a cabo intercaladamente con la fase III o de *reconocimiento*, las cuales tuvieron lugar los siguientes 12 días, durante los cuales cada rata fue inyectada 30 minutos antes de ser puesta en el laberinto con las sustancias correspondientes a cada uno de sus grupos: GC, solución salina; GE₁, péptido; GE₂, NMDA; y GE₁, MK-801.

Sustancias

Para diseñar el péptido, la secuencia de la conantoquina G obtenida del *Conos geographus* fue modificada en algunos de sus aminoácidos, para generar lo que de ahora en adelante se denominará como BLMP-101, por métodos computacionales empleando los programas *InsightII* y *spdbViewer* 3.7. El concepto fundamental radica en la remoción del efecto tóxico natural de la molécula conservando su especificidad, sensibilidad y direccionalidad farmacéutica. El péptido nativo presenta una serie de aminoácidos derivatizados que no se conservan en el diseño. Además se realizaron otras mutaciones puntuales para modificar las características de óxido-reducción del péptido en su interacción con el iGluR-NMDA. La síntesis fue contratada con la casa *Abgent* (San Diego, CA, USA).

El péptido diseñado fue diluido con solución salina (0.9mg/ml) y los sujetos de este grupo recibieron 0.640 mg/Kg de una solución 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, El MK-801 fue comprado a *Sigma-Aldrich, Inc.* (USA) y diluido con solución salina (0.9mg/ml); los sujetos de este grupo recibieron 0.080 mg/Kg de una solución 0.5 mg/ml. El NMDA fue adquirido a *Sigma-Aldrich, Inc.* y diluido con solución salina (0.9mg/ml). Los sujetos de este grupo recibieron 0.016 mg/Kg de una solución 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Todos los grupos tuvieron como grupo control al que se le inyectó únicamente solución salina (0.9mg/ml). La administración de todas estas sustancias fue intraperitoneal (i.p.)

Procedimiento

El protocolo utilizado para esta investigación fue adaptado de Magnusson (1998). El diseño experimental tuvo una duración de 16 días, en los que se llevaron a cabo tres fases. En la fase I, la plataforma se ubicó en el centro de uno de los cuadrantes del laberinto, denominados arbitrariamente A, B, C y D, y en el cuadrante A en las fases II y III del experimento, como se muestra en la siguiente figura.

Durante estas fases, las ratas fueron ubicadas en el laberinto como se describió en la fase I, teniendo en cuenta que la plataforma fue ubicada únicamente en el cuadrante A. En los días impares correspondientes a la fase II se efectuaron los tres ensayos como se describieron anteriormente. En la fase III o de reconocimiento, los dos primeros ensayos seguían el mismo procedimiento, y en el tercer ensayo la plataforma era extraída del laberinto con el objetivo de medir la memoria espacial de las ratas, en términos de la sumatoria del tiempo que empleaba cada rata en permanecer dentro del cuadrante realizando búsquedas repetitivas de la plataforma, durante las seis sesiones. La latencia de búsqueda de la plataforma se registró con un cronómetro, observando la proyección del video en una pantalla de televisión en la cual se había demarcado los cuadrantes.

RESULTADOS

Los resultados se analizaron por medio de una ANOVA, y posterior con la prueba de diferencia de medias I-J. Todos estos datos se realizaron mediante el programa SSPS versión 11.0 A continuación se presenta un resumen de los datos encontrados.

Tabla 1
Análisis de varianza del tiempo empleado en llegar al cuadrante A

Fuente	gl	F	p
Entre sujetos			
Sustancia	3	3.527*	.034
		(276.840)	
Error intragrupo (sujetos)	20	(78.497)	
Intrasujetos			
Secuencia	5	3.302**	.008
		(186.507)	
Secuencia x sustancia	15	.965	.497
		(54.498)	
Error (secuencia)	100	56.475	

Nota: Los valores encerrados entre paréntesis representan los errores de medias cuadráticas.

* $p < .05$. ** $p < .01$.

Como se aprecia en la tabla 1, alguna de las sustancias utilizadas ejerce una influencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) sobre la realización de la prueba de la memoria espacial; de la misma manera, la secuencia de los ensayos produjo efectos significativos sobre el aprendizaje de la localización de la plataforma con un nivel de significación en el 99 por mil de los casos. Para identificar cuál o cuáles fueron las sustancias que generaron los efectos significativos sobre la memoria espacial, se hizo el análisis por pares basado en la media marginal, tal y como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 2
Comparación de medias entre cada par de grupos

(I) Sustancia	(J) Sustancia	Diferencia entre medias * (I-J)	Significación
Salina	Péptido	-4.457	.045
Péptido	MK-801	6.085	.009
NMDA	MK-801	4.644	.038

*Basadas en las medias marginales estimadas.

* $p < .05$.

El análisis estadístico expuesto en la tabla 2 sugiere que el péptido mejoró la memoria espacial, en comparación con el grupo control y con el grupo MK con un nivel de significancia $p < .05$. Y en comparación con el NMDA mejoró también la memoria espacial, aunque no significativamente.

Si se observa el número de sujetos de los cuales el péptido mejoró la memoria en comparación con los sujetos del NMDA, esta mejoría se observó en el 50% de los sujetos. Lo que sugiere que tanto el péptido como el NMDA se comportan de manera similar en el aprendizaje espacial.

Tabla 3

Estimaciones de la media y porcentaje de latencia de búsqueda

Sustancia	Media (min)	Latencia de búsqueda
		%
	17.958 ^a	
Salina	16.497	34.36
Péptido	20.954	43.65
NMDA	19.513	40.65
MK-801	14.869	30.97

^aMedia global.

Porcentaje (%) calculado para el tiempo de latencia de búsqueda de cada grupo en el cuadrante A. Hay que aclarar que el tiempo máximo que podían estar los animales en el laberinto fue de 48 minutos.

El análisis descriptivo que muestran los datos de la tabla 3 indica que a mayor permanencia de la ratas, analizando la conducta en grupos, en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, mayor recuerdo de la ubicación de la plataforma.

En otras palabras, si la ratas demoraban menos tiempo en el cuadrante demarcado con la letra A, estaban haciendo la búsqueda de la plataforma en el lugar equivocado. Los tiempos utilizados por cada uno de los grupos se representan en la figura 2.

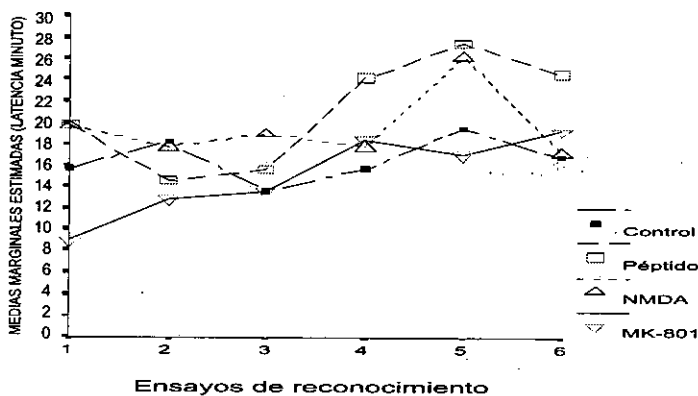


Figura 2. Medias marginales estimadas en la latencia de búsqueda de la plataforma en el cuadrante A, para cada uno de los grupos.

DISCUSIÓN

El análisis estadístico expuesto en la tabla 2 sugiere que el péptido mejoró la memoria espacial, en comparación con el grupo control y con el grupo MK, con un nivel de significancia $p < .05$. Y en comparación con el NMDA mejoró también la memoria espacial, aunque no significativamente. Con base en los datos obtenidos en este estudio es evidente que las premisas propuestas se cumplieron, hasta donde se puede concluir, a saber: a) al péptido diseñado a partir de la conantoquina G como molde se le logró remover completamente su característica de neurotoxina, b) el péptido diseñado conservó las células del sistema nervioso, particularmente corteza cerebral, como su blanco preferido, c) el péptido diseñado conservó su capacidad y selectividad por la interacción con la subunidad NR2B del receptor iGluR-NMDA, y d) la función derivada de la actividad química de dicha interacción fue la de mejorar los procesos de aprendizaje y memoria en ratas.

Dado el potencial que tiene el péptido, en función de los resultados, éste debe ser determinado con investigaciones subsecuentes. Por tanto, se recomienda para la continuación de este estudio: a) validar los resultados obtenidos, b) evaluar otros sistemas de aplicación del péptido, c) realizar estudios de farmacocinética del mismo, d) validar los procesos de aprendizaje y memoria espacial con una batería tipo de pruebas psicológicas, e) realizar evaluaciones de otros aprendizajes tanto simple como complejos, y f) evaluar la influencia de este péptido en hembras y machos y en diferentes edades.

Finalmente, si se tiene en cuenta que cualquier droga o sustancia puede tener un efecto extraordinario en una situación conductual, y el hecho de que esta situación se presente ocasionalmente, puede ser suficiente para mantener la conducta de búsqueda de los investigadores. De hecho, el uso de sustancias farmacológicas en el tratamiento de seres humanos enfermos representa probablemente la aplicación más valiosa de la ciencia farmacológica desde el punto de vista social.

Referencias

- Berman, D.E. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291(5512), 2417-2420.
- Cheng, H.J., Steinberg, J.P., Huganir, R.L. & Linden, D.J. (2003). Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science*, 300, 1751-1755.
- Dossey, L. (2002). Forgetting. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 8 (1), 12-21.
- Dracheva, S. (2001). N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 158 (9), 1400-1410.
- Gallagher, M., Burwell, R. & Burchinal, M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, 107, 618-626.
- Giurgea, C.E. (1973). The inotropic approach to the pharmacology of the integrative activity of the brain. *Condiciona reflex*, 8, 108-115.
- Magnusson, K.R. (1995). Differential effects of aging on binding sites of the activated NMDA receptor complex in mice. *Mech. Aging Dev.*, 84, 227-243.
- Magnusson, K.R. (1998). Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Elsevier: mechanism of aging and development*, 104, 227-248.
- Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not depend on the presences of local cue. *Learning Motivation*, 12, 239-260.
- Newcomer, J. (1999). Glucose-induced increase in memory performance in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, Washington, 25(2), 321-336.
- Ohno, M., Frankland, P.W., Chen, A.P., Costa, R.M. & Silva, A.J. (2001). Inducible, pharmacogenetic approaches to the study of learning and memory. *Nature Neuroscience*, 4, 238-1243.
- Roberson, E.D. & Sweatt, J.D. (1999). A biochemical blueprint for long-term memory. *Learning & Memory*, 6, 381-388.
- Rosenweig, M. R. & Leiman, A. I. (1992). *Psicología fisiológica*. (M. Pérez Pamies & M. Escobar Aliaga, Trads. de la 2ª edición en inglés). España: McGraw-Hill. (Trabajo original publicado en 1989).
- Roskoski, R, Jr. (1998). *Bioquímica*. México: McGraw-Hill - Interamericana.
- Savage, L.M. (2001). In search of the neurobiological underpinnings of the differential outcomes effect. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 36 (3), 182-196.
- Squire, L.R. (1987). *Memory and Brain*. New York: Oxford University Press.
- Shimizu, E. (2000). NMDA-receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290(5494), 1170-1175.

- Tang, Y., Shimizu, E., Dube, G., Rampon, G., Kerchner, G., Zhuo, M., Liu, G. & Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401, 63-69.
- Tsien, J.Z. (2000). Building brainier mouse. *Scientific American*, 282(4), 62-69, recuperado el 23 de octubre de 2002 en <http://www.sciam.com/2000/0400issue/0400tsien.html>
- West, J. (1993). *Bases fisiológicas de la práctica médica*. Buenos Aires: Editorial médica panamericana.
- Williams, A.J., Dave, J.R., Philips, J.B., Lin, Y., McCabe, T. & Tortella, F.C., (2000). Neuroprotective efficacy and therapeutic window of the high-affinity N-methyl-D-aspartate antagonist Conantokin-G: In vitro (Primary cerebellar neurons) and in vivo (Rat model of transient focal brain ischemia) studies. *J. Pharma. Exp. Ther.*, 294, 378-386.
- Woodworth, R. & Schlosberg, H. (1964). *Psicología experimental* (Cortada de Kohan, N., Trad. de la 3ª edición). Argentina: Eudeba. (Trabajo original publicado en 1954).
- Zamamillo, D. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science*, 284(5421), 1805-1812.