

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO 14

NUOVO MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELLA
WORKING MEMORY: VALIDAZIONE
FARMACOLOGICA E APPLICAZIONI.

Presentata da: Dott.ssa Federica Locchi

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli-Forti
Dall'Olio

Chiar.ma Prof.ssa Rossella

Esame finale anno 2008

Ai miei due piccoli grandi uomini...

INDICE

INTRODUZIONE	3
Apprendimento.....	3
Memoria	14
Principali sistemi recettoriali coinvolti nell'apprendimento e nella memoria	18
Ruolo dell'ippocampo nei processi mnemonici	27
Ruolo della corteccia peririnale nei processi mnemonici	35
Lesioni nell'area paraippocampale	39
Espressione di Immediate Early Genes nei processi mnemonici.....	41
Modelli comportamentali per la valutazione della memoria di lavoro	43
Water T-maze	49
Scopo della tesi.....	51
MATERIALI E METODI	53
RISULTATI.....	60
DISCUSSIONE.....	64
BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUZIONE

Apprendimento e memoria

L'apprendimento e la memoria costituiscono due delle funzioni più importanti del sistema nervoso: permettono, infatti, di adattarsi all'ambiente, ampliare il proprio bagaglio culturale, creare la propria storia individuale.

Gli esseri umani hanno qualcosa di prezioso: la capacità di apprendere dall'esperienza, di modificare pensieri e comportamenti in funzione di ciò che è accaduto loro in passato.

L'apprendimento, infatti, è il processo attraverso il quale l'esperienza modifica il sistema nervoso ed il successivo comportamento dell'individuo. La memoria è, invece, il processo attraverso il quale l'informazione precedentemente appresa viene immagazzinata e custodita.

Apprendimento

Si possono distinguere due classi di apprendimento: l'apprendimento non associativo e l'apprendimento associativo.

Apprendimento non associativo

L'apprendimento non associativo si verifica in seguito all'esposizione ad un singolo stimolo e consiste nella capacità di riconoscere, identificare e caratterizzare oggetti e situazioni, precedentemente vissute. Due esempi di apprendimento non associativo sono l'abitudine e la sensibilizzazione. Nell'abitudine, la presentazione ripetuta di uno stimolo provoca risposte che diminuiscono gradualmente di intensità, presumibilmente perché

l'individuo impara che quello stimolo non è importante. La sensibilizzazione, d'altra parte, è l'aumento della risposta ad uno stimolo, che sia risultato intenso o doloroso durante la prima esposizione.

Apprendimento associativo

L'apprendimento associativo, invece, è dovuto ad una stretta relazione tra gli stimoli a cui si è sottoposti. Ciò che viene appreso quando si fa un'associazione di idee può venir analizzato nei suoi aspetti più elementari studiando l'associazione di stimoli. Molti tipi di apprendimento associativo possono essere distinti in base alle tecniche sperimentali usate per determinare l'apprendimento stesso. Due paradigmi sperimentali sono stati largamente studiati: il condizionamento classico e il condizionamento strumentale.

Condizionamento classico

Il condizionamento classico fu introdotto nello studio del comportamento verso l'inizio del Novecento dal fisiologo russo Ivan Pavlov (Pavlov, 1927). Egli riconobbe che spesso l'apprendimento consiste in risposte a stimoli che sono inizialmente insignificanti. La sua geniale intuizione fu quella di formulare l'ipotesi, verificabile sperimentalmente, che l'apprendimento avviene con un meccanismo di associazione. L'essenza del condizionamento classico risiede nell'accoppiamento di due o più stimoli (Pavlov, 1927). Il ricercatore russo si accorse che i cani presentavano un aumento di salivazione senza la presenza di cibo, quando si creavano delle condizioni tipiche che anticipavano l'arrivo del nutrimento. Quando ad un cane viene presentato del cibo, questi ha una riflesso automatico di aumento della salivazione. Il cibo viene definito "stimolo incondizionato", in quanto è in grado di provocare una risposta automatica, ovvero un "riflesso incondizionato". Nella sperimentazione di Pavlov, ai cani veniva presentato uno stimolo neutro artificiale (ad esempio

il suono di una campanella oppure una luce), ovvero uno stimolo non in grado di produrre di per sé un aumento della salivazione. Successivamente alla presentazione di tale stimolo veniva presentato il cibo (stimolo incondizionato). Dopo un certo numero di sequenze "stimolo neutro" - "stimolo incondizionato", si verificò nei cani un aumento di salivazione alla sola presentazione dello stimolo neutro. Tale stimolo venne definito "stimolo condizionato" e la risposta da esso provocata "riflesso condizionato" o "reazione condizionata". Nello studio sperimentale elaborato da Pavlov è stato dimostrato, quindi, che due stimoli contigui producono un fenomeno associativo, attraverso il quale uno stimolo neutro, non in grado di produrre la risposta automatica prodotta dallo stimolo adeguato, può produrre gli stessi effetti di uno stimolo incondizionato. Il fenomeno per il quale uno stimolo neutro diventa "condizionato", in grado da solo di produrre quella che abbiamo definito una "reazione condizionata", è definito "acquisizione".

Un altro importante fenomeno emerso da tali osservazioni, è quello della generalizzazione dello stimolo, per il quale stimoli simili per alcune costanti, ma non identici, allo stimolo condizionato possono produrre lo stesso effetto di quest'ultimo.

Studi sperimentali hanno poi dimostrato come sia possibile l'estinzione del comportamento appreso (riflesso condizionato) dopo un certo numero di presentazioni dello stimolo condizionato non associato alla presentazione di cibo. Tale fenomeno, denominato appunto *estinzione*, è un importante meccanismo di adattamento, in quanto la risposta a stimoli ambientali che non hanno più importanza per la vita non può avere interesse per l'animale. Esso non equivale alla dimenticanza, ma piuttosto all'apprendimento di qualcosa di nuovo. Quando però, dopo l'estinzione, si ripresenta il nesso associativo tra lo stimolo condizionato e lo stimolo incondizionato,

l'acquisizione della reazione condizionata è molto più rapida rispetto alla prima volta. Si parla quindi di riacquisizione. Tale fenomeno dimostra appunto come l'estinzione sia un processo attivo, in grado di inibire la risposta appresa e non di eliminarla.

Il paradigma teorico del condizionamento classico e lo schema Stimolo-Risposta (S-R) nascono da studi sperimentali, ma i fenomeni studiati emergono, più complessi, in tutti i contesti ambientali. Pavlov distingue, quindi, i "riflessi condizionati" in riflessi acquisiti, cioè legati ad un addestramento specifico, e in "riflessi naturali", la cui acquisizione è spontanea ed avviene in contesti meno strutturati (Morgan C.T. and King, 1966; Atkinson et al., 1987; Rosenhan and Seligman, 1984). Il condizionamento classico si sviluppa al meglio quando, oltre alla contiguità temporale, è presente anche un nesso di causalità fra lo stimolo condizionato e quello incondizionato. Il condizionamento classico non è un tipo di apprendimento meramente associativo, ma coinvolge processi cognitivi di rappresentazioni degli stimoli, relazioni tra stimoli, situazioni ed eventi (Rescorla, 1988).

Il condizionamento classico causa modificazioni nel sistema nervoso, dovute al rafforzamento di connessioni sinaptiche. Per semplicità, si può assumere che nel modello di Pavlov, per esempio, lo stimolo incondizionato sia captato da un singolo neurone del sistema somato-sensoriale, mentre lo stimolo condizionato da un neurone del sistema uditivo o visivo. La risposta incondizionata è controllata dal neurone del sistema motorio. Quando presentiamo lo stimolo condizionato, non c'è risposta, perché la sinapsi che connette il neurone del sistema uditivo con il neurone del sistema motorio è debole. Quando viene presentato lo stimolo incondizionato, c'è una immediata reazione, perché la connessione tra il neurone somato-sensoriale ed il neurone motore che causa la risposta è

forte. Con il condizionamento classico, accoppiando gli stimoli dapprima, ed in seguito presentando soltanto lo stimolo condizionato, si ottiene la risposta: ad esempio, il suono di una campanella causerà la salivazione. Questo accade perché, secondo il postulato di Hebb (Hebb D.O., 1949), avviene un rafforzamento delle connessioni sinaptiche, ed in questo caso la debole connessione tra il neurone del sistema uditivo ed il neurone che causa la risposta diviene forte.

Tra i modelli di condizionamento classico è importante considerare il condizionamento classico della paura (fear conditioning).

Fear conditioning

La paura condizionata si sviluppa quando l'animale viene ripetutamente esposto ad uno stimolo neutro accoppiato ad un altro stimolo, di natura ostile. In seguito a tali esposizioni, l'animale comincia a rispondere allo stimolo neutro con comportamenti simili a quelli indotti dallo stimolo minaccioso: lo stimolo neutro, presentato da solo, potrà suscitare lo stato di paura nell'animale. Il fear conditioning è il metodo attraverso il quale l'animale impara ad aver paura di nuovi stimoli. E' una forma di apprendimento nella quale la paura, dovuta ad uno stimolo minaccioso, come uno shock elettrico, un forte rumore o un odore spiacevole, è associata ad un particolare contesto o a stimoli neutri, ad esempio un determinato ambiente, una luce o un suono (Balsam and Tomie, 1985). Un modello animale di fear conditioning prevede che i ratti vengano esposti ad un suono, al quale viene fatta seguire una scarica elettrica alle zampe (LeDoux et al., 1990). Per valutare le risposte degli animali, viene misurata la pressione del sangue o il periodo di tempo durante il quale gli animali rimangono immobili, comportamento detto "freezing" (Blanchard and Blanchard, 1969; Bolles R.C. and Fanselow M.S., 1980; Rosen and Schulkin, 1998; Fanselow M.S. and Lester L.S., 1988a; Marks I.M., 1987).

L'atteggiamento di freezing, spesso misura della paura (Blanchard and Blanchard, 1969), è un' intensa reazione che il ratto sviluppa di fronte al pericolo o alla minaccia: esso si mette immobile in posizione rannicchiata, in modo da poter rispondere prontamente al pericolo quando questo si manifesta (Blanchard and Blanchard, 1969; Fanselow M.S. and Lester L.S., 1988). Il sobbalzo ed il freezing sono reazioni comuni in molti animali e negli uomini (Marks I.M., 1987) e possono essere condizionate da luce, suoni, contesto, usando modelli sperimentali di condizionamento classico di paura.

L'uso del fear conditioning nei roditori è stato fondamentale per l'approccio a sistemi neuro-comportamentali tesi a stabilire il ruolo dell'amigdala nella paura (Davis, 1997). Si ritiene, infatti, che la paura condizionata dipenda da tale area cerebrale (Maren, 1999). Si è formulata l'ipotesi secondo la quale l'amigdala contribuirebbe a stabilire le associazioni tra stimoli sensoriali neutri, come un suono di media ampiezza o la vista di un oggetto presente nell'ambiente, e altri stimoli che hanno un rilevante valore di rinforzo negativo, cioè gli stimoli nocivi, come un rumore assordante o stimolazioni dolorose. Il meccanismo di apprendimento associativo, anche in questo caso, è probabilmente dovuto ad un rafforzamento delle connessioni che trasmettono le informazioni relative agli stimoli neutri. Ciò si verifica se tali connessioni attivano i neuroni postsinaptici nell'amigdala simultaneamente con le afferenze relative agli stimoli di rinforzo primario, come richiesto dal postulato di Hebb (Rolls, 2000). Le risposte dell'amigdala influenzano, inoltre, una varietà di centri di integrazione, responsabili delle manifestazioni motorie, delle emozioni e delle modificazioni comportamentali finalizzate ad ottenere gratificazioni o ad evitare punizioni (Rolls, 2000).

Alcuni tipi di condizionamento della paura, come ad esempio quello contestuale (contextual fear conditioning) coinvolgono l'ippocampo, zona del cervello che riceve gli impulsi dall'amigdala e li integra con le informazioni già esistenti (Philips RG. and Ledoux JE, 1992). Il contextual fear conditioning è un importante paradigma comportamentale per lo studio della neurobiologia dell'apprendimento, della memoria e delle funzioni cognitive dell'ippocampo (Rudy et al., 2004).

Condizionamento strumentale

Un'altra forma di apprendimento associativo è il condizionamento strumentale, che riguarda l'associazione tra uno stimolo ed un comportamento. In questo caso, quando la risposta ad uno stimolo è associata ad un rinforzo, cambia la probabilità della risposta. In altre parole, il condizionamento strumentale permette all'animale di adattare il suo comportamento rispetto alle conseguenze che esso avrà: la risposta, infatti, varierà a seconda che il suo comportamento sia seguito da conseguenze favorevoli o sfavorevoli. Il modello Stimolo-Risposta di Pavlov non riusciva a chiarire i vari aspetti dell'apprendimento, soprattutto per quanto riguarda il ruolo attivo dell'essere vivente nei confronti dell'ambiente circostante. Ogni comportamento causa un effetto che a sua volta è in grado di produrre diverse conseguenze sull'individuo. L'effetto del comportamento sull'ambiente fu studiato per primo da Thorndike (Thorndike, 1932), tramite l'utilizzo di un noto studio sperimentale: un gatto veniva posto in una situazione spiacevole da cui poteva sottrarsi, risolvendo un problema. L'animale veniva chiuso in una gabbia dotata di un meccanismo (un chiavistello) che ne permetteva l'apertura. Quando il gatto riusciva, in seguito a tentativi ed errori, a risolvere il problema "uscire dalla gabbia", si notò un incremento delle azioni finalizzate allo scopo e una riduzione esponenziale delle attività inutili. Questo tipo di

apprendimento venne definito "strumentale", in quanto il comportamento dell'animale poteva essere considerato strumentale alla risoluzione del problema e alla ricerca di una ricompensa.

Si ipotizzarono quindi due leggi legate all'apprendimento:

1) *la legge dell'effetto*, secondo la quale l'organismo tende a ripetere i comportamenti che producono effetti benefici mentre tende ad abbandonare i comportamenti inutili o che producono effetti deleteri.

2) *la legge dell'esercizio*, secondo la quale una risposta si verifica maggiormente se è stata ripetuta più volte.

Una lettura integrata delle due leggi permette di prevedere, ad esempio, che comportamenti in grado di produrre maggiori risposte benefiche hanno una maggiore probabilità di essere appresi.

Gli studi di Thorndike hanno permesso a Skinner di sviluppare il modello del condizionamento operante. La situazione sperimentale è la seguente: un ratto viene messo in una gabbia, la cosiddetta gabbia di Skinner, dotata di un dispositivo erogatore di cibo collegato ad una leva che ne permette l'attivazione. L'animale è lasciato "libero" di muoversi all'interno della gabbia senza "condizionamenti sperimentali". Esso preme la leva casualmente e vede che l'effetto prodotto da questa azione è la comparsa del cibo. Si nota che il ratto aumenta esponenzialmente le pressioni della leva e finalizza sempre di più le proprie azioni verso l'erogazione di cibo.

Il rinforzo è quella specifica condizione in grado di aumentare la probabilità che una risposta si verifichi. Esso è definibile in termini di valenza come rinforzo positivo, cioè che produce una risposta la cui conseguenza sarà la ricompensa, oppure come rinforzo negativo, in grado cioè di produrre una risposta che avrà come conseguenza l'eliminazione dello stimolo nocivo (uno shock).

Come nel condizionamento classico anche nel condizionamento strumentale entrano in gioco modificazioni del SNC: il rinforzo, infatti, causa il rafforzamento delle connessioni sinaptiche tra i circuiti neuronali che ricevono lo stimolo, la vista della leva, ed i circuiti che controllano la risposta, l'abbassamento della leva per ottenere il cibo.

Evitamento attivo e passivo

I modelli di evitamento sono largamente utilizzati per studiare l'acquisizione, ovvero l'apprendimento, la ritenzione, ovvero la memoria e l'estinzione delle risposte condizionate (Iversen L.L. et al., 1987; Martinez J.L. and Kesner R.P., 1991). Nell'evitamento passivo l'animale impara a non rispondere allo stimolo per evitare la punizione. Le tecniche di evitamento passivo sono largamente utilizzate per misurare le alterazioni della memoria e dell'apprendimento in seguito alla somministrazione di farmaci, oppure a lesioni, o a manipolazioni comportamentali. Un paradigma sperimentale molto usato in neurobiologia è il seguente: l'animale viene introdotto in una camera piccola ed illuminata dotata di una porta che conduce ad una grande camera e attraverso il cui pavimento a griglia può essere erogato uno shock elettrico. Quando il ratto entra nella camera buia, nella quale si sente più al sicuro e protetto, riceve ai piedi lo shock come punizione. Stando invece all'esterno, nella zona illuminata, non gli succederà nulla di spiacevole. Il ratto dovrà quindi imparare a non entrare nella camera buia, che predilige, per evitare lo stimolo doloroso. Viene registrato il tempo di latenza nella zona illuminata. La logica di tale test comportamentale è che gli animali ricordino che una certa risposta termina in un evento spiacevole, in modo che esiteranno a ripeterla in futuro (Bures J et al., 1983). Il conseguente aumento della latenza nella risposta è riflesso del rafforzamento della memoria per l'evento spiacevole. I metodi di evitamento passivo presentano molti vantaggi: essi, infatti, sono

semplici da mettere in pratica e danno velocemente risultati. Tale tecnica, tuttavia, presenta anche alcuni svantaggi: la variabilità tra gli animali che determina tempi di latenza differenti e la diversa resistenza allo shock applicato, che si traduce nella necessità di utilizzare un numero elevato di animali. Un altro punto sfavorevole è che oltre alla memoria, anche altri fattori cognitivi e non cognitivi sono sicuramente coinvolti e vanno a confondere l'interpretazione dei risultati (Heise, 1975). L'ora del giorno sembra influire sui risultati, suggerendo che i ritmi fisiologici influenzano la performance dell'animale (Holloway and Wansley, 1973).

L'evitamento attivo consiste nel compiere, da parte dell'animale, una azione per evitare la punizione. La punizione nell'animale suscita un comportamento emotivo e di fuga, che può essere modificato grazie al condizionamento di una specifica risposta. Ci sono molte varianti del condizionamento dell'evitamento attivo, ed in tutti questi modelli l'animale deve dare una risposta misurabile, quantificabile, nel fuggire o nell'evitare uno stimolo fastidioso. L'animale ad esempio dovrà correre da un compartimento all'altro dell'apparato, oppure saltare su un panchetto, o salire su una pertica per evitare lo shock alle zampe. I vantaggi sono la semplicità del metodo ed il fatto che i roditori imparano dopo un numero piuttosto basso di prove, meno di trenta. La risposta richiesta è, infatti, il fuggire o l'evitare lo shock e questo è molto semplice e naturale per un animale, che possiede un repertorio di risposte innate di fronte a situazioni dolorose e pericolose (Bolles R.C. and Fanselow M.S., 1980).

Nei paradigmi comportamentali di evitamento attivo non deve necessariamente essere presente uno stimolo condizionato come una luce o un suono; può esser sufficiente porre l'animale nel compartimento dove riceverà lo shock, e l'azione di aprire la porta, nel compartimento dove non gli succederà nulla, serve come segnale per mettere in moto l'evitamento.

Un esempio di modello comportamentale è una gabbia, come la gabbia di Skinner: attraverso il pavimento, costituito da barrette metalliche, viene erogato lo shock. Nel centro della gabbia vi è un'asta alla quale l'animale può arrampicarsi saltando, evitando in questo modo la scarica elettrica (De Wied, 1966). Sul soffitto della gabbia vi è una luce che è lo stimolo condizionato, che viene accesa cinque secondi prima dello shock.

Come nel caso dell'evitamento passivo, anche nell'evitamento attivo ci sono degli svantaggi: i trattamenti farmacologici che vengono effettuati prima del test possono alterare la performance di evitamento, senza tuttavia agire specificamente sui processi di apprendimento, quanto piuttosto sui processi motori o sensoriali necessari per metter in atto l'evitamento attivo. Se la risposta di evitamento richiede l'azione, un farmaco che accresce l'attività locomotoria aumenta la probabilità che si verifichi la giusta risposta (Schulteis and Martinez, Jr., 1990). Allo stesso modo, un farmaco che induce freezing o comportamenti stereotipati, come ad esempio un eccessivo sniffing, può alterare l'espressione dell'evitamento attivo. Infine un farmaco, come ad esempio un potente analgesico, può ridurre l'apprendimento, poichè riduce notevolmente la percezione del dolore dato dallo stimolo avverso.

Un altro modello di evitamento attivo, frequentemente utilizzato per studiare l'apprendimento e la memoria, è il labirinto a Y. Il labirinto ad Y consiste in un percorso a tre bracci, con uno più lungo degli altri due, la cui forma è proprio quella di una Y. Il braccio più lungo serve come punto di partenza mentre uno dei bracci più corti rappresenta il compartimento della salvezza e lo shock può essere evitato soltanto entrando in questo braccio. L'animale dovrà fare una discriminazione tra le due strade da prendere, e questa scelta rende più complesso questo modello rispetto a quelli visti precedentemente (Martinez J.L. and Kesner R.P., 1991).

Memoria

La memoria è tra le funzioni cerebrali complesse più affascinanti.

Prime ipotesi sulla memoria

Le prime ipotesi sulla memoria sono strettamente connesse alle teorie sull'apprendimento. Platone paragonò la memoria umana a una tavoletta di cera sulla quale le esperienze lasciano impronte o tracce; l'oblio ha luogo man mano che nuove tracce cancellano gradualmente quelle vecchie. La concezione platonica della memoria venne raffinata con l'introduzione da parte di Aristotele delle "associazioni": due idee sono associate se il ricordo dell'una è un buon indice di richiamo dell'altra. Aristotele sostenne che recuperare una traccia di memoria può farne riaffiorare altre, grazie all'esistenza di una rete organizzata di associazioni.

Alcuni studiosi consideravano le associazioni fra tracce mnestiche come delle vie neurali. Essi ritenevano che queste vie, al pari dei sentieri che attraversano un prato, diventassero più distinte a forza di essere usate e che, se non più usate, si deteriorassero e si cancellassero. La nozione di tracce neurali associate veniva raffinata nella teoria del consolidamento. Secondo questa teoria, le vie neurali riverberano, ovvero restano attive per qualche tempo dopo essersi formate, e tale attività è necessaria affinché esse si consolidino, ovvero diventino permanenti.

In neuroscienza e in psicologia, la memoria è la capacità del cervello di conservare informazioni.

Come è importante la capacità di ricordare, altrettanto importante ed affascinante è la normale perdita di certe informazioni. A volte la dimenticanza può assumere anche un carattere patologico, una condizione detta amnesia. L'incapacità di stabilire nuovi ricordi è detta amnesia

anterograda, mentre la difficoltà di richiamare alla mente informazioni precedentemente memorizzate è detta amnesia retrograda.

Le fasi principali nell'elaborazione della memoria sono:

- La codifica: l'elaborazione delle informazioni ricevute.
- L'immagazzinamento: la creazione di registrazioni permanenti delle informazioni codificate.
- Il richiamo: il recupero delle informazioni immagazzinate, in risposta a qualche sollecitazione.

Si possono classificare i tipi di memoria in base ad almeno due criteri:

- La persistenza del ricordo.
- Il tipo di informazioni memorizzate

Il criterio di classificazione più diffuso si basa sulla durata della ritenzione del ricordo e identifica tre tipi distinti di memoria: la memoria sensoriale o immediata, la memoria a breve termine e la memoria a lungo termine. Tra la memoria a breve termine e quella a lungo termine si colloca anche una memoria intermedia, in cui facciamo rientrare la memoria di lavoro (working memory), sulla quale è basato il lavoro di ricerca riportato in questa tesi.

Si ritiene che la memoria sensoriale e la memoria a breve termine si realizzino tramite modifiche transitorie nella comunicazione neuronale, mentre la memoria a lungo termine si realizzi tramite modifiche più stabili nella struttura neuronale.

I diversi tipi di memoria coinvolgono aree cerebrali diverse; tra queste l'ippocampo è la struttura indispensabile alla fissazione della traccia della

memoria, non è la sede dell'immagazzinamento, ma partecipa alla codificazione delle informazioni che provengono dalla corteccia associativa cerebrale.

Memoria sensoriale

La memoria sensoriale conserva le informazioni appena percepite: è la capacità di tenere in mente per qualche secondo l'esperienza che si sta facendo. La capacità di questo archivio è molto ampia, coinvolge tutte le modalità sensoriali e ci fornisce costantemente la consapevolezza del presente.

L'informazione sensoriale può venire parzialmente ricodificata nella memoria a breve termine e, in certi casi, viene ricodificata o trasferita nella memoria a lungo termine (Atkinson et al., 1987).

Memoria a breve termine

E' un tipo di memoria immediata per gli eventi, i quali in seguito potranno o meno essere trasferiti nella memoria a lungo termine. La prima caratteristica importante è la sua durata: questo tipo di memoria può ritenere le informazioni soltanto per un periodo di tempo limitato. Alcune definizioni riportano come durata di immagazzinamento meno di un minuto, altre non più di trenta secondi, altre ancora circa due secondi. Per poter superare questa durata ed avere un aumento del tempo di ritenzione, l'informazione va periodicamente ripetuta. Il processo di consolidamento, cioè di trasferimento della memoria a breve termine a quella a lungo termine, è possibile se esiste una relazione tra un evento dell'una e dell'altra, ad esempio se un evento della memoria a breve termine è legato ad un trauma già presente in quella a lungo termine. Il secondo concetto chiave legato alla memoria a breve termine è il fatto che ha una capacità finita: George Miller (1956) suggerì che la sua capacità si aggira tra le cinque e le nove unità.

Memoria a lungo termine

La memoria a lungo termine, in contrasto con quella a breve termine, può immagazzinare molte più informazioni con una durata potenzialmente illimitata, a volte addirittura per tutta l'intera vita. E' un tipo di memoria relativamente stabile, che trattiene informazioni riguardo ad eventi successi anche in un passato distante.

In termini generali la memoria a lungo termine può essere suddivisa in base al tipo di informazione contenuta (Anderson, 1976). Si ha, infatti, la seguente classificazione:

- memoria dichiarativa, o esplicita: è la capacità di memorizzare informazioni che sono accessibili alla coscienza e dunque possono essere espresse mediante il linguaggio;
- memoria procedurale, o implicita: non è accessibile alla coscienza, almeno non in tutti i particolari e riguarda le informazioni relative a comportamenti automatici, abilità e associazioni che sono acquisite e richiamate a livello inconscio.

La memoria dichiarativa riguarda la conoscenza di persone, fatti, luoghi, nozioni. Può essere ulteriormente suddivisa in memoria episodica, che riguarda le informazioni specifiche ad un contesto particolare, come un momento o un luogo, e in memoria semantica, che riguarda idee e affermazioni, o fatti indipendenti da uno specifico episodio. La memoria autobiografica è un tipo di memoria episodica e riguarda fatti avvenuti al soggetto stesso. Anche la memoria visiva rientra in questo campo.

La memoria procedurale riguarda, invece, soprattutto le abilità motorie e fonetiche, che vengono apprese con il semplice esercizio e utilizzate inconsciamente. Essa è legata all' apprendimento associativo e non associativo.

Memoria di lavoro

Tra la memoria a breve e quella a lungo termine si pone un particolare tipo di memoria: la memoria di lavoro (working memory). In questi anni questo processo mnemonico è stato soggetto di intense ricerche, dal momento che patologie psichiatriche, come la schizofrenia, sono associate a deficit nei processi cognitivi correlati a questa memoria (Verma and Moghaddam, 1996). La memoria di lavoro è un concetto teorico che si riferisce a processi cognitivi che provvedono in maniera temporanea al mantenimento e alla manipolazione delle informazioni necessarie per eseguire problemi complessi (Baddeley, 1992). E' la capacità di memorizzare, in maniera simultanea e temporanea, informazioni elementari che possono poi essere istantaneamente recuperate per realizzare determinati processi mentali (Logie and D'Esposito, 1998). E' la memoria finalizzata ad uno specifico compito (task) ed è caratterizzata dalla capacità di mantenere l'informazione per un intervallo di tempo di pochi secondi. La memoria di lavoro costituisce il nucleo centrale di funzioni cognitive importanti come il linguaggio, il ragionamento, la risoluzione di problemi complessi o la valutazione delle conseguenze di attività motorie prima ancora che queste vengano eseguite (Baddeley, 1992). La trasmissione glutamatergica gioca un ruolo molto importante in questo tipo di memoria, infatti, l'integrità della corteccia prefrontale, che è innervata da afferenze dopaminergiche e glutamatergiche, è fondamentale per l'espressione della memoria di lavoro (Romanides et al., 1999).

Principali sistemi recettoriali coinvolti nell'apprendimento e nella memoria

Recettori del glutammato

Il glutammato è il neurotrasmettitore eccitatorio maggiormente diffuso nel sistema nervoso centrale. La diffusione praticamente ubiquitaria dà conto del ruolo importante giocato dal sistema glutammatergico in molte funzioni cerebrali, quali l'apprendimento, la memoria (Davis et al., 1994; Maren, 1999; LeDoux, 1993) e la percezione della paura (Klepstad et al., 1990); è implicato, inoltre, in patologie quali manie, panico, schizofrenia e in malattie neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer e la sclerosi amiotrofica laterale.

La sintesi del glutammato avviene nelle terminazioni nervose tramite due vie: dal glucosio, attraverso il ciclo di Krebs e transaminazione dell'acido α -chetoglutarico e dalla glutamina, sintetizzata nelle terminazioni nervose dove è convertita in glutammato dall'enzima glutamminasi. Viene, quindi, immagazzinato in vescicole che lo riversano nella fessura sinaptica all'arrivo del potenziale d'azione. Sono stati individuati due principali gruppi di recettori del glutammato: recettori ionotropi, associati ad un canale ionico, e metabotropi, associati ad una proteina G. I primi sono stati in seguito suddivisi in recettori NMDA, Kainato (KA) e AMPA, sulla base di alcune molecole con funzione agonista che legano selettivamente tali recettori (Hollmann and Heinemann, 2003; Nakanishi, 1992). I recettori-canale NMDA sono permeabili agli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio. I recettori NMDA presentano una varietà di siti su cui possono agire agonisti, antagonisti, modulatori allosterici endogeni o esogeni. Tali siti possono essere raggruppati in quattro categorie:

- sito di riconoscimento per il glutammato/NMDA
- sito di legame per la glicina
- sito di legame del canale intraionico
- siti modulatori, come ad esempio il sito modulatore redox, il sito sensibile ai protoni, il sito per lo zinco ed il sito per le poliammine.

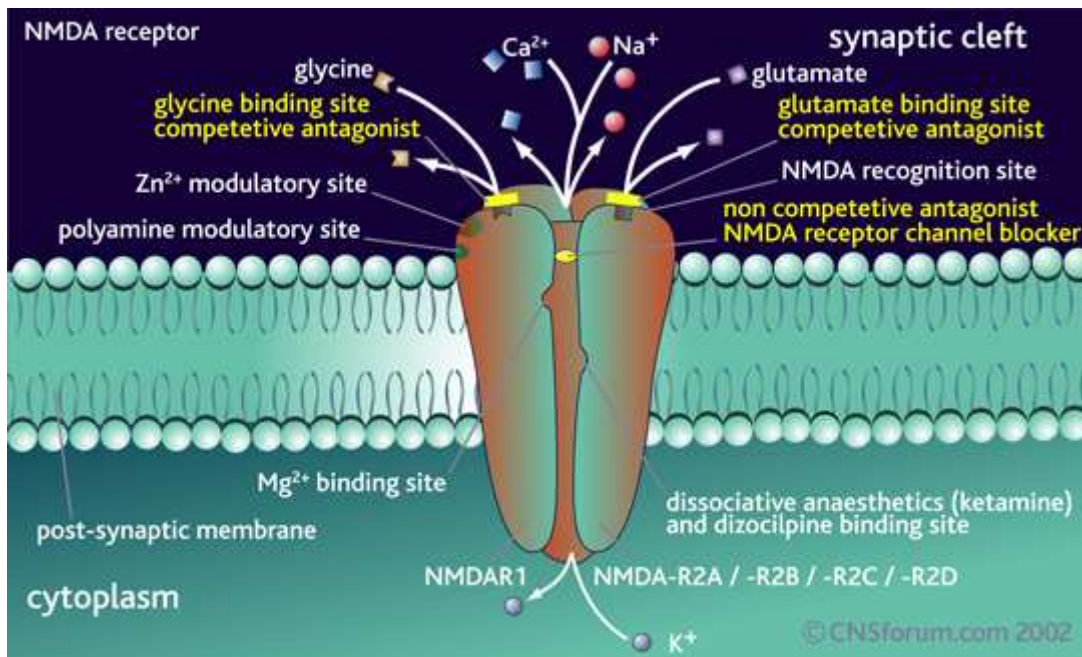


Figura 1: recettore ionotropo glutammatergico

La glicina potenzia l'azione degli agonisti; a basse concentrazioni di glutammato, la glicina rende il recettore sensibile al neurotrasmettitore; in condizioni di eccesso di glutammato, invece, la glicina si stacca e riduce la sensibilità del recettore. La localizzazione dei recettori NMDA è prevalentemente postsinaptica e spesso associata alla presenza dei recettori AMPA e Kainato che sono coinvolti nell'amplificazione del segnale del glutammato e mediano la trasmissione eccitatoria veloce (Cotman et al., 1988). Nonostante i recettori ionotropi del glutammato siano distribuiti in tutto il SNC, gli NMDA hanno densità maggiori nelle regioni corticali e limbiche, così come gli AMPA e i Kainato. Questi ultimi recettori, oltre a

possedere una collocazione postsinaptica, sono stati ritrovati anche sulla membrana presinaptica. Il sottotipo AMPA è composto da quattro diverse subunità (GluR1-4) espresse in diverse combinazioni e si ritrova in alta densità nell'ippocampo, nel cervelletto, nello striato e nella corteccia. Il recettore Kainato è invece costituito da cinque subunità, K1-K2 e Glu5, Glu6 e Glu7; si trova negli strati profondi della corteccia e provoca depolarizzazione che crea scompensi all'omeostasi cellulare.

I recettori metabotropi del glutammato sono associati ai secondi messaggeri tramite proteine G; essi sono costituiti da una porzione ammino-terminale extracellulare (O'Hara et al., 1993), contenente i siti di legame per il glutammato, una parte centrale di sette domini transmembrana ad α -eliche ed una porzione carbossi-terminale intracellulare che presenta i siti per la fosforilazione. Di questo sottotipo recettoriale sono state descritte otto varianti suddivise, in base alla farmacologia e al secondo messaggero al quale sono accoppiate, in tre gruppi differentemente distribuiti nel cervello.

I recettori mGluR1 e mGluR5 fanno parte del gruppo I e, attraverso la proteina G, attivano una fosfolipasi C che determina l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-difosfato in inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG); l' IP_3 si lega ad una proteina canale e provoca il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, mentre il DAG, insieme agli ioni Ca^{2+} , attiva la proteina chinasi C. I recettori mGluR2 e mGluR3 fanno parte del gruppo II, mentre mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 compongono il gruppo III ed entrambi sono accoppiati all'adenilatociclastasi tramite una proteina G_i , che inibisce le concentrazioni di tale enzima e provoca, quindi, una diminuzione delle concentrazioni di c-AMP intracellulare. La stimolazione di questi gruppi recettoriali può inoltre sopprimere i canali del Ca^{2+} di tipo N che, avendo essi localizzazione presinaptica, può portare ad un blocco del rilascio del glutammato. Gli agonisti dei recettori

metabotropi provocano effetti eccitatori tramite una lenta depolarizzazione, dovuta all'inibizione dei canali del K^+ , e una corrente verso l'interno associata ad un aumento nella scarica cellulare, dovuta all'inibizione del flusso del Ca^{2+} attivato dal K^+ (Schoepp and Conn, 1993). A livello delle sinapsi glutammatergiche, gli agonisti metabotropi riducono la trasmissione agendo sui recettori presinaptici (autorecettori) appartenenti a ciascuno dei tre gruppi, con un meccanismo non ancora ben definito; pare probabile una riduzione delle correnti di calcio voltaggio-dipendenti o l'attivazione delle correnti di potassio. Un'altra importante funzione svolta dai recettori del glutammato presinaptici è la riduzione del tono GABAergico tramite eterorecettori che riducono il rilascio di GABA e la trasmissione sinaptica inibitoria a livello di molte regioni cerebrali.

Recettori colinergici

L'acetilcolina (ACh) è il neurotrasmettitore del sistema colinergico; essa è presente a livello delle giunzioni neuromuscolari, delle sinapsi dei gangli del sistema nervoso autonomo e di una serie di sinapsi del sistema nervoso centrale. Mentre le funzioni della trasmissione colinergica a livello delle giunzioni neuromuscolari e della sinapsi gangliari sono ben conosciute, non si può dire altrettanto per le azioni dell'acetilcolina a livello del SNC. L'ACh è normalmente un neurotrasmettitore eccitatorio, ma può avere anche un'azione inibitoria in alcuni distretti come, per esempio, sul cuore e in alcune zone del cervello.

L'acetilcolina è un estere di acido acetico e colina e viene sintetizzata nelle terminazioni nervose a partire dall'acetil coenzima A e dalla colina, con una reazione catalizzata dalla colina acetiltransferasi (CAT).

A differenza della maggior parte dei neurotrasmettitori a basso peso molecolare, in molte sinapsi colinergiche le azioni postsinaptiche dell'ACh non vengono terminate nella riassunzione del trasmettitore, bensì da un

potente enzima idrolitico, l'acetilcolinesterasi (AChE). Questo enzima, concentrato nella fessura sinaptica, assicura una rapida riduzione della concentrazione di ACh dopo il suo rilascio nella terminazione sinaptica. L'AChE ha un'attività catalitica molto elevata e idrolizza l'ACh in acetato e colina. Le terminazioni nervose colinergiche contengono un trasportatore Na^+ - dipendente ad alta affinità, che assume la colina prodotta dall'idrolisi di ACh.

Esistono due grandi classi di recettori colinergici (AChR): i recettori nicotinici e quelli muscarinici. Essi si differenziano non solo per la diversa affinità verso agonisti ed antagonisti, ma anche per funzione, struttura e localizzazione. I recettori nicotinici sono di tipo ionotropo, i recettori muscarinici sono di tipo metabotropo.

Il recettore nicotinicco costituisce un canale ionico, che normalmente è chiuso, per cationi Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e anioni Cl^- . Questi canali ionici sono dei pentameri costituiti, nella maggior parte dei casi, da subunità diverse. Essi contengono subunità α , generalmente due, che agiscono cooperativamente e che inglobano il sito attivo, e subunità non α , che partecipano alla formazione e alla regolazione del canale, con funzioni tuttora da chiarire. La catena polipeptidica di ogni subunità forma quattro domini transmembrana orientati, probabilmente, ad α - elica. Queste regioni sono denominate M1, M2, M3 e M4, partendo dal dominio N-terminale. La sequenza M2 di tutte le subunità partecipa alla formazione del canale ionico intrinseco. La selettività per cationi o anioni è determinata dalle catene laterali polari del dominio di transmembrana M2, che sono orientate verso l'interno del canale. Le diverse subunità di cui è costituito il recettore e la loro diversa combinazione determina la diversità e quindi l'esistenza di recettori nicotinici multipli: il recettore nicotinicco muscolare, gangliare e a livello del SNC. L'interazione dell'ACh con il sito attivo di tali recettori

determina l'apertura del canale mediante una variazione conformazionale e il risultato è un influsso di cariche positive responsabile della depolarizzazione della membrana.

I recettori muscarinici sono, d'altra parte, metabotropi e appartengono ad una super famiglia di recettori di membrana legati ai loro effettori tramite una unità funzionale comprendente una proteina G associata ad un enzima o ad un canale ionico. I recettori muscarinici sono caratterizzati da una unica catena polipeptidica che attraversa la membrana sette volte, formando sette domini transmembrana. Finora sono stati caratterizzati farmacologicamente quattro recettori muscarinici diversi, denominati M₁, M₂, M₃ ed M₄. I recettori muscarinici si distribuiscono in tutto l'organismo, in particolare, sono localizzati nel cuore, nel muscolo liscio e nelle ghiandole esocrine. Anche il SNC è ricco di recettori muscarinici e, a seconda della regione, l'attivazione di questi recettori può determinare sia l'eccitazione, sia l'inibizione dei neuroni. Si trovano sottotipi recettoriali nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nello striato ed in altre aree cerebrali. I recettori muscarinici centrali controllano una varietà di risposte fisiologiche e comportamentali; inoltre, sono coinvolti nella regolazione di funzioni come l'apprendimento e la memoria.

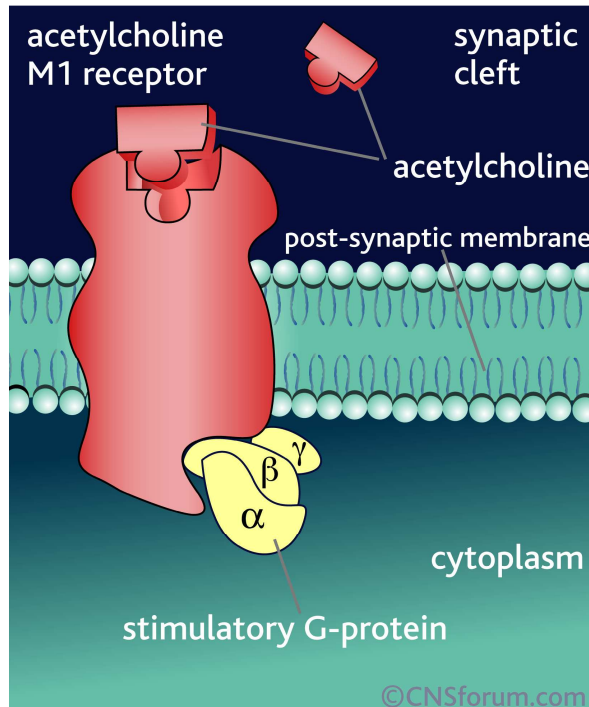


Figura 2: recettore muscarinico.

In numerosi studi sperimentali è stata valutata l'azione degli inibitori irreversibili dell'AChE sull'apprendimento dei ratti (Russell, 1960), e la relazione tra i livelli cerebrali di ACh e la performance dei ratti in modelli comportamentali di apprendimento spaziale, come i labirinti (Krech et al., 1954). Da queste ricerche è emerso che la capacità di apprendimento migliora quando c'è attivazione del sistema colinergico. Analogamente, è stato dimostrato che la somministrazione di antagonisti muscarinici, quali atropina e scopolamina, riduce la performance dei ratti in diversi modelli animali di apprendimento e di memoria (Buresova O. et al., 1964; Carlton P.L., 1963); (Whitehouse J.M., 1964). Recentemente è stato dimostrato come l'attivazione dei recettori colinergici sia una componente fondamentale del processo di consolidamento della memoria (Power et al., 2003a): farmaci ad azione colinomimetica, infatti, migliorano i processi cognitivi, tra i quali anche la memoria di lavoro. Infine, l'attivazione dei recettori muscarinici a livello dell'ippocampo e della corteccia cerebrale

facilita l'induzione (Burgard and Sarvey, 1990) e aumenta l'ampiezza del potenziamento a lungo termine (Blitzer et al., 1990), mentre l'atropina ne inibisce l'induzione (Sokolov and Kleschevnikov, 1995). Con potenziamento a lungo termine (LTP) si intende il rafforzamento duraturo delle connessioni sinaptiche in seguito a stimolazione tetanica neuronale: il neurone bersaglio, rafforzato dalla LTP, risulta molto più responsivo e produce potenziali post sinaptici eccitatori più ampi per molto tempo.

Ruolo dell'ippocampo nei processi mnemonici

All'ippocampo arrivano numerosi tipi di informazione da vaste aree corticali che permettono di avere in ogni momento input rappresentativi dello stato corrente dell'ambiente circostante. L'ippocampo li elabora, crea associazioni nuove, registra informazioni su vari livelli, ne seleziona alcune, ne lascia decadere altre (per esempio quelle che interferiscono) e rimanda le rappresentazioni alla corteccia entorinale, da cui ha ricevuto l'input iniziale. Se all'interno della rete la griglia della rappresentazione iniziale e quella che l'ippocampo rimanda indietro dopo l'elaborazione sono abbastanza simili, la rete permette di ricordare.

Le zone principali dell'ippocampo sono il giro dentato (DG), la zona CA1 e la zona CA3; le regioni della corteccia che forniscono gli input e gli output dell'ippocampo sono la corteccia entorinale (EC), il subiculum e la corteccia rinale (peririnale e postrinale). L'input primario arriva dalla EC, che ha una struttura colonnare ed ha connessioni sia afferenti che efferenti con ampie zone di corteccia. La EC è connessa con il DG e con la zona CA3 tramite proiezioni vaste e diffuse (perforant path), mentre il DG e la CA3 sono connesse tra di loro in modo sparso, focalizzato e topografico (mossy fiber pathway). I neuroni della zona CA3 sono ampiamente connessi tra loro. Lo Schaffer collateral invece è un ampio fascio di neuroni che va dalla CA3 alla CA1, e permette una connessione estesa e rapida tra le due zone. Infine, l'interconnessione tra la EC e la CA1 non è estesa come le altre, bensì puntuale e topografica, ma è molto importante nei meccanismi di trasmissione delle informazioni perché è invertibile e permette all'input primario di tornare alla EC dopo l'elaborazione. Le proprietà dei neuroni delle varie zone riflettono le caratteristiche funzionali delle aree cui appartengono; per esempio, i neuroni della zona CA3

trasmettono segnali verso un'unica direzione, e questo perché sono attivati solo da specifici input sensoriali che hanno una precisa collocazione spaziale. Si comportano nello stesso modo, anche se in maniera meno accentuata, i neuroni della zona CA1. Queste caratteristiche riflettono il fatto che nell'ippocampo si formino rappresentazioni sparse. I neuroni della EC e del subiculum, invece, essendo collegati a svariate aree corticali, hanno connessioni molto più distribuite e multidirezionali, che, come si è visto, danno origine a rappresentazioni sovrapposte e soggette a interferenza. In definitiva l'ippocampo riceve informazioni dalla maggior parte delle aree associative neocorticali. Tali informazioni giungono attraverso le altre strutture del lobo temporale mediale, la corteccia peririnale e la corteccia paraippocampale, che a loro volta proiettano alla corteccia entorinale. La corteccia entorinale invia queste informazioni ai diversi circuiti ippocampali. Dopo essere state elaborate nell'ippocampo, le informazioni vengono ritrasmesse, tramite la corteccia entorinale, alle aree neocorticali. La corteccia entorinale è, quindi, sia il principale ingresso che la principale uscita dell'ippocampo.

Il ruolo dell'ippocampo nell'ambito dei processi mnesici è quello di legare insieme le rappresentazioni semantiche immagazzinate nella corteccia, creando così un contesto sia temporale che spaziale per rappresentazioni diverse che si riferiscono ad un particolare evento. Il sistema ippocampale funziona tramite due meccanismi che sono in competizione tra loro:

- *Pattern separation*: è il meccanismo utilizzato per la codifica delle nuove informazioni: l'input di attivazione dalla EC arriva al DG e alla CA3; lì viene elaborato e rappresentato tramite unità neurali sparse e separate che non si sovrappongono e non interferiscono. Contemporaneamente, tale input viene mandato

anche alla zona CA1 e si ha una associazione tra le rappresentazioni della CA1 e della CA3. Dalla zona CA1 poi, la rappresentazione, dopo l'elaborazione e l'associazione, può tornare alla EC, perché le connessioni tra le due zone sono invertibili.

- *Pattern completion*: è il meccanismo che, a partire da piccoli frammenti di ricordi, permette di far riaffiorare e completare nella memoria rappresentazioni di eventi e situazioni. Il frammento di rappresentazione, che è costituito da input corticali, dalla EC arriva al DG e alla CA3; qui, tramite le numerose connessioni che ci sono all'interno della zona stessa, la rappresentazione può essere completata e ritrovata. La rappresentazione completata nella CA3 attiva quella corrispondente nella zona CA1 e da lì torna nella EC non più frammentaria, ma intera.

C'è una naturale competizione tra questi due meccanismi. Quando al cervello arrivano degli input esterni, esso non capisce subito se le informazioni che ne derivano siano nuove (*pattern separation*), oppure vadano invece completate in quanto frammenti di memoria già esistenti (*pattern completion*). Il ruolo dell'ippocampo è proprio quello di ottimizzare tale ambiguità creando quante più connessioni possibili per contestualizzare al meglio informazioni ed episodi.

L'ippocampo è la prima struttura individuata nel processo di immagazzinamento delle tracce di memoria dichiarativa ed ha tre vie eccitatorie principali. La *via perforante* decorre dal subiculum alle cellule dell'ilo e del giro dentato, da cui parte la *via delle fibre muscolari* che

raggiunge le cellule piramidali del campo CA3. Queste, attraverso la *via delle fibre collaterali di Schaffer*, eccitano le cellule piramidali del campo CA1.

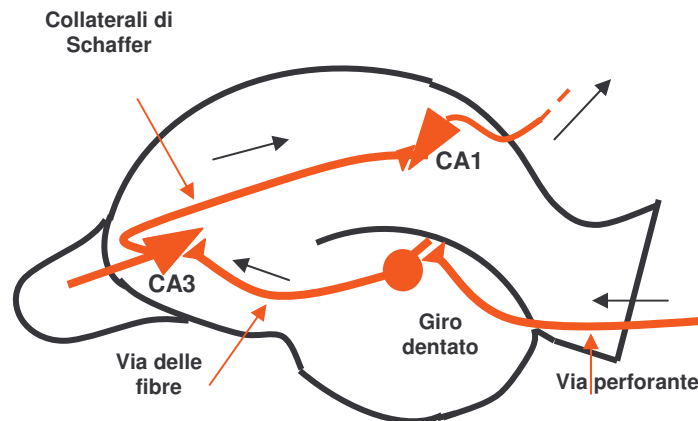


Figura 3: le vie della trasmissione nell'ippocampo

Bliss e Lomo (1966) hanno dimostrato che l'applicazione di una breve scarica di stimoli ad alta frequenza ad una qualunque di queste vie afferenti, determina un aumento dell'ampiezza dei potenziali postsinaptici eccitatori nei neuroni bersaglio nell'ippocampo. Questo fenomeno venne chiamato LTP (potenziamento a lungo termine). In definitiva il fenomeno dell'LTP è stato individuato in tre stazioni del circuito trisinaptico ippocampale: la sinapsi "via perforante-cellule dei granuli del giro dentato", la sinapsi "fibre muscoidi-cellule del campo CA3" e la sinapsi "fibre collaterali di Schaffer-cellule del campo CA1".

Quindi, a tutte e tre le stazioni dell'ippocampo, la trasmissione sinaptica è estremamente plastica, ovvero si modifica in risposta a modificazioni nel pattern di attività elettrica afferente e, una volta che la modificazione si è indotta, essa perdura a lungo. Questa grande plasticità era in linea con

l'ipotesi che nell'ippocampo avvenissero i cambiamenti nell'efficacia sinaptica necessari alla formazione di una traccia di memoria ed ha portato a ipotizzare che LTP fosse il meccanismo cellulare responsabile di tali cambiamenti.

Già nel 1949 lo psicologo Hebb aveva proposto che, durante la formazione di una traccia di memoria, la regola che guida la modificazione dell'efficacia sinaptica, è la regola della correlazione fra l'attività fra un neurone presinaptico ed il neurone postsinaptico. Egli ipotizzò che “quando l'assone della cellula A prende parte attiva in maniera ripetuta all'attivazione del neurone B l'efficienza con cui A eccita B aumenta”. Questa regola, nota come legge di Hebb, dice sostanzialmente che la ripetuta co-attività del neurone presinaptico con il suo bersaglio postsinaptico promuove il potenziamento di quella sinapsi. Hebb prospettava modificazioni dell'efficacia sinaptica anche in termini di crescita morfologica del terminale presinaptico e dello spazio postsinaptico.

Ebbene, LTP nell'ippocampo si induce soltanto in presenza di correlazione pre-postsinaptica, ovvero la sola presenza dell'ingresso presinaptico attivo non è sufficiente ad indurre LTP: è necessario che il neurone postsinaptico sia anch'esso attivo, ossia sia depolarizzato. Inoltre, alle sinapsi del giro dentato e del campo CA1 LTP mostra caratteristiche di associatività. L'associatività è una conseguenza della regola di Hebb: se un ingresso sinaptico debole su un neurone A viene attivato simultaneamente ad un forte ingresso sinaptico su A, l'ingresso sinaptico debole si potenzia.

Studi successivi hanno dimostrato che l'LTP non è identico in tutte le sinapsi. Mentre nel campo CA1 l'LTP è strettamente dipendente dall'attivazione dei recettori glutammatergici ionotropi NMDA, quanto visto nel campo CA3 suggerisce che il fenomeno sia NMDA indipendente. Infatti, mentre nel campo CA3 l'LTP non ha caratteristiche associative, nel campo

CA1 i recettori NMDA sono coinvolti in un meccanismo di induzione del potenziamento, che richiede l'attivazione contemporanea di più di una fibra. Gli assoni che provengono dal campo CA3 raggiungono le cellule piramidali del campo CA1 e usano come neurotrasmettitore il glutammato.

I recettori NMDA per essere attivati hanno bisogno di una depolarizzazione della membrana che li sblocchi dal Mg^{2+} . Generalmente vi sono più componenti presinaptiche convergenti sulla stessa cellula postsinaptica.

La rimozione del blocco del magnesio permette l'ingresso degli ioni calcio nel neurone postsinaptico. Il conseguente innalzamento della concentrazione di calcio all'interno delle spine dendritiche del neurone postsinaptico rappresenta l'evento chiave per l'innescamento del LTP. È stato osservato che gli ioni calcio, entrando attraverso il canale associato ai recettori NMDA, vanno ad attivare una o più proteine chinasi Ca^{2+} - dipendenti nel neurone postsinaptico. Sono almeno due le proteine chinasi coinvolte nell'induzione del potenziamento a lungo termine: la proteina chinasi Ca^{2+} / calmodulina – dipendente (CaMKII) e la proteina chinasi C (Barria et al., 1997). L'inibizione della CaMKII e la delezione del relativo gene sembra che impediscano l'induzione dell' LTP.

I meccanismi attraverso i quali il potenziamento della trasmissione sinaptica si mantiene per molto tempo non sono ancora chiari. Ipotesi recenti affermano che l' LTP derivi da una modificata sensibilità della cellula postsinaptica al glutammato, dovuta ad una nuova sintesi di recettori sulle sinapsi oppure ad un aumento del flusso di corrente attraverso i recettori già presenti (Perez-Otano and Ehlers, 2005; Shi et al., 1999). Si verifica un aumento nel numero dei recettori postsinaptici AMPA, e non NMDA (Tocco et al., 1992) ed un aumento della liberazione del neurotrasmettitore da parte delle terminazioni presinaptiche, forse in virtù di modificazioni a carico delle proteine coinvolte nel processo di esocitosi. L'aumento del rilascio di

glutammato causa un potenziale post-sinaptico più ampio. Poiché l' LTP è chiaramente innescato dall'azione degli ioni calcio all'interno del neurone postsinaptico, si è supposto anche che vi sia un segnale retrogrado: l'ossido nitrico, NO, che diffonde dalla cellula postsinaptica a quella presinaptica. Questa piccola molecola, se prodotta nei bottoni sinaptici, può diffondere verso i bottoni terminali presinaptici, proprio come una sorta di messaggero all'indietro. Utilizzando farmaci che bloccano l' NO sintasi, enzima coinvolto nella sintesi del NO, non viene indotta l'LTP in fettine di tessuto di ippocampo (O'Dell, 1991). Inoltre è stato scoperto che in molte aree del cervello, inclusi il giro dentato e le zone CA1 e CA3 dell'ippocampo, ci sono molte cellule che contengono l'NO sintasi e recettori per il glutammato (Zhang and Wong-Riley, 1996).

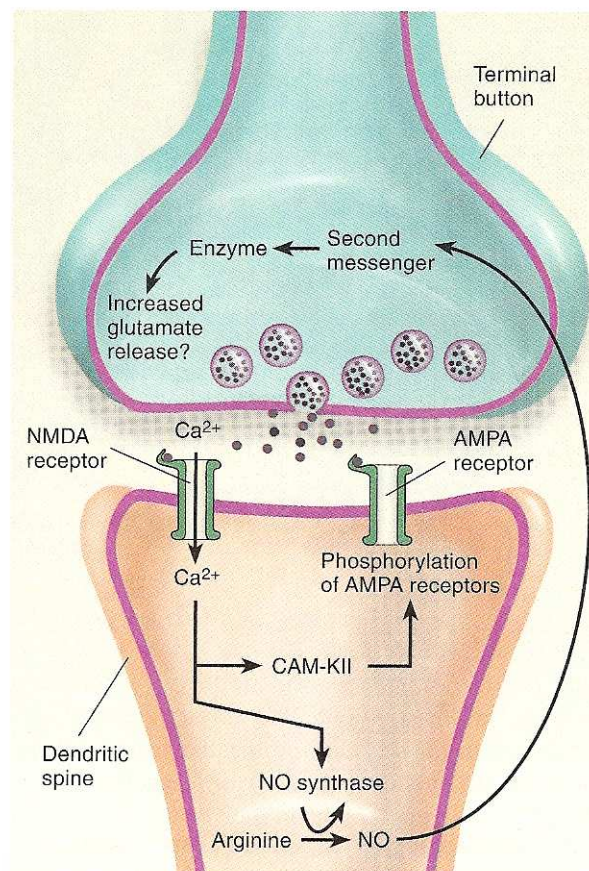


Figura 4: l'LTP ed il suo possibile meccanismo

L'osservazione dell'LTP, dall'ippocampo, si è rapidamente spostata anche verso altre strutture encefaliche, coinvolte nella memoria e nell'apprendimento. La cosa interessante è che le forme di induzione dell'LTP viste nell'ippocampo, sono state ritrovate anche nelle strutture corticali. Nella corteccia entorinale, stimolando le fibre che provengono dall'ippocampo e registrando gli stimoli degli strati V e VI, si ottiene un LTP strettamente dipendente dai recettori NMDA (Solger et al., 2004).

La situazione però si è ulteriormente complicata quando si è scoperto che una stimolazione a bassa frequenza, intorno a pochi Hz, provoca un effetto a lungo termine completamente opposto all'LTP. Questo fenomeno è noto come LTD (depressione a lungo termine) e consiste appunto in una riduzione della risposta postsinaptica, che persiste nel tempo. Ciononostante, è stato notato che, perché una stimolazione a bassa frequenza provochi l'LTD, l'afflusso di Ca^{2+} nella terminazione postsinaptica deve essere abbastanza ridotto rispetto a quello richiesto per indurre l'LTP con alta frequenza. E' plausibile, quindi, che le due modalità di stimolazione comportino livelli di depolarizzazione differenti della membrana della terminazione postsinaptica e che questi livelli di depolarizzazione si traducano in un diverso flusso di Ca^{2+} nel citosol. Diverse concentrazioni di calcio porterebbero in questo caso a diverse vie di trasduzione intracellulare. Nonostante ci sia ancora tanto da chiarire, le osservazioni riscontrate finora sull'LTP e l'LTD lasciano pensare che l'attività funzionale generale delle strutture encefaliche, coinvolte nei processi di memoria ed apprendimento, dipenda da conformazioni di reti neuronali in cui componenti che hanno ruoli diversi probabilmente presentano anche meccanismi intracellulari differenti di plasticità.

Ruolo della corteccia peririnale nei processi mnemonici

Numerosi studi hanno dimostrato che il lobo temporale mediale (MTL) svolge un ruolo chiave nelle funzioni di memoria dichiarativa a lungo termine. Il MTL comprende la formazione ippocampica, subiculum, presubiculum, parasubiculum e le cortecce entorinale, peririnale e paraippocampica. Il termine corteccia peririnale (PRh) è stato coniato per descrivere una regione corticale architettonicamente eterogenea lungo la metà caudale del solco rinale. La PRh è delimitata rostralmente dalla corteccia insulare, dorsalmente dalla corteccia temporale e centralmente dalla corteccia entorinale. La corteccia peririnale del ratto è composta dall'area 35 e dall'area 36. Entrambe le regioni hanno neuroni a forma di cuore nello strato V. Nell'area 36 l'organizzazione dello strato V è più radiale rispetto a quella dell'area 35; quest'ultima mostra una differenziazione laminare più povera rispetto alla 36, in particolare il confine tra gli strati II e III è difficilmente riconoscibile.

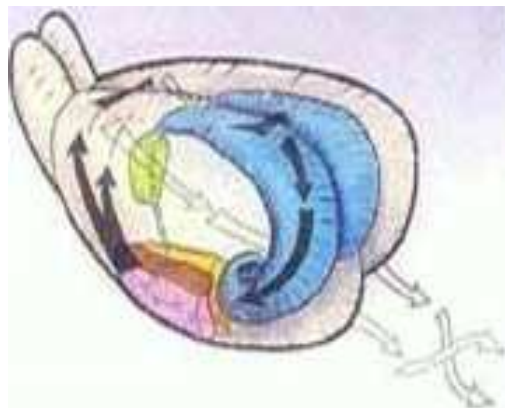


Figura 5: Schema delle connessioni tra le strutture corticali dell'area ippocampale e paraippocampale.

Nonostante dati anatomici suggeriscano l'esistenza di una cascata di connessioni che collegano bidirezionalmente neocorteccia - PRh - corteccia entorinale - formazione ippocampica, e dati fisiologici indichino che la PRh è un elemento cruciale in tale circuito, sono attualmente disponibili ben poche informazioni circa gli effetti esercitati dalla PRh sulle varie strutture che compongono i circuiti di memoria del lobo temporale mediale. Fra le varie cortecce che circondano la formazione ippocampica, la corteccia peririnale è quella sulla quale si è maggiormente concentrata l'attenzione negli ultimi anni. Evidenze neuroanatomiche mostrano che la PRh è una regione in cui convergono proiezioni sia da cortecce associative di ordine superiore sia da strutture del MTL. In base alle sue connessioni la PRh sembra rappresentare un collegamento cruciale nel contesto dei circuiti di memoria del MTL, in quanto è principalmente attraverso la PRh che segnali neocorticali possono essere trasmessi all'ippocampo e segnali in uscita dall'ippocampo possono raggiungere la neocorteccia. Sebbene l'importanza della PRh in certe forme di memoria sia riconosciuta, le sue relazioni funzionali con le altre strutture del MTL non sono state ancora del tutto chiarite. La corteccia peririnale, sia nella scimmia che nel ratto, è definita da tre importanti caratteristiche di connessione. La prima è rappresentata dalle robuste interconnessioni con la formazione ippocampale attraverso la corteccia entorinale. La seconda è che la PRh riceve numerosi input dalle cortecce associative unimodali e polimodali. La terza ed ultima importante caratteristica è la profonda interconnessione tra PRh e complesso amigdaloidale. Questi dati neuroanatomici suggeriscono che la corteccia peririnale funge da zona di convergenza tra le aree associative sensoriali di alto ordine e diverse strutture sottocorticali. La sua posizione unica le permette di elaborare le informazioni e di comunicare con altre strutture deputate ai processi mnemonici: l'ippocampo e l'amigdala.

Sebbene sia chiaro che l'ippocampo è una struttura essenziale per il consolidamento della memoria, studi recenti hanno dimostrato che i deficit di memoria prodotti da lesioni ippocampali vengono peggiorati dalla lesione di regioni corticali adiacenti, comprese le corteccie entorinale, peririnale e paraippocampica. D'altra parte, recenti studi sperimentali hanno evidenziato un ruolo importante della corteccia peririnale per quanto riguarda la memoria di riconoscimento visiva, mentre l'ippocampo sembra essere più correlato ai processi che sottendono la memoria spaziale (Liu and Bilkey, 1998), conferendo alle due distinte regioni ruoli dissociabili. Negli studi effettuati sulla memoria di riconoscimento uno dei test comportamentali spesso applicato è l' "*Object Recognition Test*" (ORT). Questo test sfrutta la tendenza spontanea esplorativa degli animali di oggetti non familiari. Il test ha diverse varianti, ma sostanzialmente consiste in una fase di familiarizzazione iniziale, in cui l'animale esplora due oggetti uguali e in una successiva fase di riconoscimento, in cui uno degli oggetti precedente viene sostituito con uno nuovo. La capacità di riconoscimento dell'animale sarà tanto più elevata tanto più lungo è il tempo di esplorazione dell'oggetto nuovo, rispetto al tempo di esplorazione dell'oggetto vecchio. Gli esperimenti effettuati con l'ORT hanno più volte confermato che il riconoscimento visivo di un oggetto basato sulla familiarità, è impedita da lesioni che riguardano la corteccia rinale. Nella corteccia rinale l'area che in particolare è stata sempre vista coinvolta in questi deficit è la corteccia peririnale. Lesioni applicate alla corteccia peririnale sembrano non influire nella memoria spaziale mentre lesioni applicate all'ippocampo non influiscono sulla memoria di riconoscimento degli oggetti (Winters et al., 2004; Bussey et al., 1999). L'ippocampo è coinvolto in fenomeni di riconoscimento visivo solo se per tale riconoscimento l'animale deve anche memorizzare delle nozioni spaziali (Bussey and Aggleton, 2002). Questo

non significa che ippocampo e corteccia peririnale siano del tutto indipendenti, ma solo che le connessioni presenti tra le due strutture entrino in gioco dopo che è avvenuta un'analisi preliminare e separata dell'informazione afferente. E' plausibile che, successivamente, le due elaborazioni siano integrate per formare una contestualizzazione. Registrazioni elettrofisiologiche effettuate dalla corteccia peririnale di scimmie sottoposte a test di memoria di riconoscimento visivo hanno rivelato che alcuni neuroni diminuiscono la loro risposta quando viene riproposto uno stimolo visivo già presentato precedentemente (Brown et al., 1987; Xiang and Brown, 1998). Questa riduzione porta anche informazioni su quanto recentemente e quanto spesso lo stimolo è stato riproposto e si presenta anche quando più stimoli devono essere appresi simultaneamente. Le stesse registrazioni effettuate dall'ippocampo invece hanno riportato riduzioni molto meno frequenti, con latenza più lunga e che non permangono per 24 ore. Nella PRh e nella corteccia associativa adiacente, la riduzione delle risposte a stimoli riproposti è spontanea e si manifesta senza un addestramento particolare e senza che l'animale debba usare necessariamente l'informazione per fini comportamentali.

Recenti studi hanno cercato di spiegare quale ruolo avesse la corteccia peririnale all'interno del processo di acquisizione, consolidamento e recupero della traccia mnemonica. In questi esperimenti ad alcuni ratti, sottoposti all'ORT, è stato iniettato un farmaco (lidocaina) bilateralmente nella PRh, in modo da bloccarne il funzionamento. Se la lidocaina era iniettata in modo da far effetto solo durante la fase di familiarizzazione, o solo durante la fase di riconoscimento, gli animali non riuscivano a distinguere l'oggetto nuovo da quello familiare. Da questi risultati sembra che la PRh abbia un ruolo attivo sia nei processi di acquisizione che in quelli di recupero della traccia. Per osservare gli effetti della PRh sul

consolidamento, la lidocaina è stata iniettata nel periodo compreso tra le due fasi e il test di riconoscimento è stato effettuato quando l'effetto del farmaco era concluso. Si è osservato che i ratti avevano deficit nell'ORT se il blocco dell'attività elettrica della PRh cominciava 20 minuti dopo la familiarizzazione ma non se cominciava più di 40 minuti dopo (Winters and Bussey, 2005). I risultati che riguardano il periodo frapposto tra le due fasi, quindi, suggeriscono che la PRh sia coinvolta anche nel consolidamento.

Lesioni nell'area paraippocampale

Le lesioni ai sistemi corticali permettono di studiare e codificare il ruolo fisiologico, nonché il meccanismo, di certe strutture cerebrali. Lesioni alla corteccia peririnale, come ad ogni struttura cerebrale, possono essere eseguite in diversi modi. I metodi usati per ledere una struttura possono essere distinti in metodi convenzionali e metodi neurotossici. I *metodi convenzionali* sono: l'asportazione della regione di interesse per aspirazione, lesioni elettrolitiche e uso di radiofrequenze. I *metodi neurotossici* includono: iniezione di agenti come ad esempio NMDA o acido ibotenico (Burwell et al., 2004; Liu and Bilkey, 1998; Moran and Dalrymple-Alford, 2003) a concentrazioni che risultano eccitotossiche. L'effetto di una lesione non dipende soltanto dalla procedura utilizzata ma soprattutto dalla sua estensione. Generalmente i metodi convenzionali portano a lesioni corticali più estese rispetto ai metodi neurotossici; è per questo motivo che si predilige ledere strutture anatomicamente piccole, come la PRh o la POR (corteccia postrinale), tramite iniezione in situ di agenti chimici o neurotossine. Data la profonda interconnessione sinaptica esistente nelle strutture cerebrali, una lesione non circoscritta ad una determinata area, può compromettere il risultato di uno studio comportamentale.

Un altro aspetto importante da considerare è l'accoppiamento tra la struttura lesa e la sensibilità di un certo test comportamentale. Non tutti i tests, infatti, permettono di giungere agli stessi dati sperimentali relativi ad un'unica struttura danneggiata. Infatti, mentre alcuni tests comportamentali permettono di ritenere la PRh una struttura essenziale del sistema paraippocampale, altri ne delineano solo aspetti marginali. Certo è che lesioni combinate, per esempio PRh-ippocampo o PRh-EC o PRh-talamo, diminuiscono l'efficienza del sistema mnesico ancor di più rispetto ad una singola lesione nell'ippocampo, nella corteccia entorinale o nel talamo (Moran and Dalrymple-Alford, 2003; Nagahara et al., 1995; Otto et al. 1997; Bilkey and Liu, 2000).

Espressione di Immediate Early Genes nei processi mnemonici

I processi di apprendimento e consolidazione mnemonica provocano una cascata di eventi intracellulari che terminano nell'induzione di geni e nella sintesi di proteine necessarie per la formazione della memoria a lungo termine. Immediate early genes (IEGs), come *c-fos*, vengono indotti ed espressi in maniera rapida e transitoria a seguito della stimolazione di vari tipi di cellule e servono come segnali di attivazione cellulare. La maggior parte delle proteine prodotte da IEGs fungono da messaggeri nell'accoppiamento tra attività neuronale a breve termine e i cambiamenti strutturali e funzionali a lungo termine, agendo come fattori di trascrizione e regolando l'espressione genica (Teather et al., 2005). Ciò ha portato a ipotizzare che l'espressione di IEGs giochi un ruolo importante nei meccanismi di neuroplasticità necessari per la consolidazione mnemonica. A favore di tale teoria, è stato dimostrato che la soppressione dell'espressione genica dell'IEG *fos* tramite oligonucleotide antisenso induce deficit nella consolidazione mnemonica a lungo termine senza influenzare l'apprendimento del task e la memoria a breve termine (Guzowski et al., 2001).

Cambiamenti nell'espressione di IEGs risultano coinvolti nell'immagazzinamento delle informazioni e nella consolidazione mnemonica a lungo termine (Goelet et al., 1986).

L'espressione del gene *Fos*, quindi, è ritenuto un correlato indiretto di un'aumentata attività neuronale ed è stato dimostrato essere indotto in varie forme di apprendimento. Per tale motivo, la distribuzione dell'espressione di tale gene può essere usata per valutare la differente attivazione neuronale in diverse aree cerebrali nel cervello intatto di ratto

in seguito allo svolgimento di uno specifico task da parte dell'animale (Vann et al., 2000).

I processi mnemonici sottendono a sistemi cerebrali che risultano anatomicamente e funzionalmente relativamente indipendenti e si differenziano in base al tipo di memoria che mediano (Teather et al., 2005).

Nella presente tesi è stata indagata l'espressione del Fos in differenti distretti del cervello in seguito all'esecuzione del task nel modello di memoria di lavoro proposto. Tale indagine è volta a cercare di capire quale regione sia maggiormente attivata e, di conseguenza, coinvolta nel processo di memoria di lavoro.

Modelli comportamentali per la valutazione della memoria di lavoro

La memoria di lavoro (working memory), come già specificato, consente di mantenere in maniera temporanea una serie di informazioni necessarie per risolvere problemi complessi (Baddeley, 1992). La maggior parte dei modelli comportamentali per la working memory accentua questo aspetto ed ha un orientamento spaziale. I labirinti sono modelli usati da tempo per valutare l'apprendimento spaziale e la memoria. Tantissimi studi, infatti, hanno esaminato il comportamento dei ratti in diversi tipi di labirinti: il labirinto classico, quello a T o a Y (T-maze, Y-maze), il labirinto radiale (radial maze), e i vari labirinti ad acqua (water-maze), tra i quali il più conosciuto è il Morris water maze.

Ulteriori modelli comportamentali impiegati sono l'evitamento attivo e passivo, descritti precedentemente.

Morris water maze

Richard Morris sviluppò questo test, comunemente conosciuto come Morris water maze, per valutare l'orientamento spaziale nei ratti (Morris et al., 1986a; Barnes et al., 1990). Tale modello è sensibile a lesioni all'ippocampo, il cui ruolo nella memoria spaziale, per lo meno nei ratti, sembra essere fondamentale (Morris, 1981).

Il modello classico del Morris Water Maze prevede l'utilizzo di una vasca circolare riempita di acqua, in cui viene immerso l'animale che deve trovare una piattaforma di plastica trasparente, nascosta sotto la superficie dell'acqua e posta sempre in una posizione fissa. L'animale impara a orientarsi per trovare l'approdo utilizzando i segnali visivi localizzati intorno alla vasca, che possono variare per grandezza, forma o luminosità, . Viene così misurato il tempo che l'animale impiega a raggiungere l'approdo.



Figura 6: Morris water maze.

Il Morris water maze è basato sul fatto che per i roditori l'acqua costituisce un ambiente estraneo dal quale sono fortemente motivati a fuggire cercando un approdo, la piattaforma, che costituisce un rinforzo positivo (Frick et al., 2000). Questo aspetto rappresenta uno dei punti di forza del test, poiché non richiede l'utilizzo di cibo o acqua come rinforzi positivi o l'evitamento di uno stimolo negativo, come lo shock elettrico. Un ulteriore vantaggio è la possibilità di esaminare diversi aspetti della performance dei ratti: quante prove il ratto deve eseguire prima di riuscire a rintracciare la piattaforma e cosa accade se i segnali di riferimento vengono rimossi o spostati.

Questo modello, inoltre, risulta sensibile a trattamenti farmacologici o lesioni e può rivelare alterazioni del sistema sensoriale e motorio, modificazioni nell'apprendimento, deficit nei processi di acquisizione e ritenzione di vari tipi di memoria, tra cui la working memory. Sono, infatti, state sviluppate diverse versioni del water maze (Morris et al., 1986) per lo studio della memoria di lavoro: una di queste prevede, per esempio, ogni giorno la variazione della posizione della piattaforma (Dudchenko,

2004;Steele and Morris, 1999;Morris et al., 1986); un'altra versione, invece, proposta da Buresova et al. (Buresova et al., 1985), consiste nell'introdurre un radial maze all'interno della vasca circolare ed il compito dell'animale consiste nel trovare la piattaforma alla fine di ogni braccio del radial maze. Dopo 20 secondi la piattaforma collassa e il ratto è costretto a nuotare in un altro braccio per trovare un altro approdo. In tali modelli il task diventa più complesso ed evidenzia la necessità di un recupero temporaneo delle informazioni spaziali precedentemente acquisite per riuscire a trovare la piattaforma.

Tuttavia i modelli sviluppati finora per la spatial working memory modificando la versione classica del morris water maze sono pochi e richiedono tempi di apprendimento piuttosto lunghi (alcune settimane). Inoltre, tale metodica è particolarmente sensibile all'età degli animale (Shukitt-Hale et al., 2004).

Radial maze

Il radial maze è costituito da una piattaforma circolare centrale con otto, o più bracci disposti radialmente, come i raggi di una ruota (Olton and Papas, 1979;Olton, 1977b;Olton, 1977a).



Figura 7 : radial maze

L'apparato è solitamente elevato rispetto a terra di circa 50 centimetri, in modo tale che i ratti non possano saltare giù. Prima di porre il ratto sulla piattaforma centrale, viene posto del cibo alla fine di ciascun braccio, che consiste nel rinforzo positivo. I ratti, affamati, esplorano il labirinto, mangiano il cibo e velocemente imparano a rintracciarlo e ad entrare in un braccio alla volta. Dopo circa venti prove consecutive molti dei roditori non entrano più nei bracci dove hanno già mangiato durante la stessa sessione (Olton, 1983).

Una versione più complessa di tale modello è stata sviluppata per lo studio della working memory: si tratta di un labirinto radiale a 17 bracci, nel quale viene posto il cibo soltanto in 8 bracci. Dopo varie prove, il ratto impara ad entrare una sola volta nei bracci dove è presente il cibo e mai in quelli dove esso è assente. Data la maggior complessità del modello, anche il tempo di apprendimento risulta maggiore (Myhrer, 2003).

Presumibilmente, dopo l'addestramento, le informazioni sui bracci senza cibo vengono salvate nella memoria a lungo termine, ma per evitare i bracci da cui il cibo è già stato prelevato è necessaria la working memory. I ratti con lesioni all'ippocampo ricordano i nove bracci che non contengono il cibo e non entrano, mentre non ricordano quelli nei quali hanno già mangiato.

Il vantaggio di questo modello è l'utilizzo di una capacità ben sviluppata nel ratto: la loro naturale attitudine a ricercare e trovare cibo ogni giorno. Essi, quindi, apprendono in maniera veloce (Olton, 1983). Lo svantaggio, d'altra parte, consiste nell'utilizzo di cibo o acqua e nella privazione, quindi, di uno o dell'altra prima del test: ciò può danneggiare lo stato di salute dei ratti (Frick et al., 1995).

T-maze

Il T-maze e l'Y maze sono i tra i tests comportamentali più impiegati per la valutazione della spatial working memory (Verma and Moghaddam, 1996).



Figura 8: T maze

Il labirinto a T o a Y consiste in un percorso a tre bracci, con uno più lungo degli altri due, la cui forma è proprio quella di una T o di una Y rispettivamente. Il braccio più lungo serve come punto di partenza e i bracci laterali possono essere chiusi da porte scorrevoli o da barriere rimovibili.

Il T-maze può essere costruito più facilmente rispetto al radial maze ed è un metodo piuttosto veloce. Durante il test viene utilizzato il cibo come rinforzo positivo, che viene posto alla fine di uno dei bracci laterali, mentre l'altro braccio viene chiuso, impedendo che il ratto entri. Il ratto viene, quindi, posizionato sul braccio di partenza ed è obbligato ad andare nel braccio dove si trova il cibo: questa è la scelta forzata (forced choice).

Ogni giorno il braccio che rimane chiuso varia. Dopo aver mangiato, il ratto viene riposizionato e questa volta entrambi i bracci laterali sono aperti ma il cibo si trova nel braccio opposto rispetto alla scelta forzata. Il ratto, dopo un certo intervallo di tempo, viene rimesso nel punto di partenza, e dopo diverse prove impara ad andare nel braccio giusto: questa è la scelta

libera. Se entra nel braccio in cui c'è il cibo viene registrata la corretta scelta, in caso contrario viene registrato l'errore ed il roditore non viene ricompensato con il cibo. I dati che si raccolgono sono il numero di entrate corrette e quante volte il ratto ritorna nel braccio sbagliato, errore legato alla working memory. In condizioni normali il ratto apprende in circa cinque giorni, quindi molto velocemente. La semplicità e la velocità del metodo costituiscono i vantaggi. Lo svantaggio, d'altra parte, come nel radial maze, è dato dalla privazione di cibo negli animali prima del test (Frick et al., 1995e). Il metodo è sensibile agli effetti di varie lesioni al cervello (Durantou et al., 1989; Aggleton et al., 1996; Aggleton et al., 1995) e a molti farmaci che aumentano o riducono la memoria spaziale (Wenk et al., 1989).

Water T-maze

Tutti i metodi sperimentali citati precedentemente presentano vantaggi e svantaggi (Shukitt-Hale et al., 2004).

Recentemente, Del Arco e collaboratori (Del Arco et al., 2007) hanno sviluppato un nuovo metodo, il labirinto a T ad acqua (water escape T-maze), che combina i vantaggi del Morris water maze e del T-maze, minimizzando così gli svantaggi.

Il water T-maze ha le stesse caratteristiche del T-maze classico: è un labirinto a forma di T, con un braccio più lungo e due bracci laterali, riempito di acqua. Al posto del cibo, nei due bracci laterali, vengono inserite delle piattaforme rimovibili. Questo nuovo metodo presenta, quindi, uno dei più importanti vantaggi del Morris water maze: il rinforzo positivo è rappresentato da una piattaforma, che costituisce un approdo, ottima spinta motivazionale per il ratto a fuggire dall'acqua (Frick et al., 1995). Il roditore, una volta in acqua, è spinto a concludere la sua performance il più velocemente possibile. Come specificato sopra, infatti, lo svantaggio del T-maze classico è l'utilizzo di cibo o di acqua come ricompensa per gli animali e la necessità, di conseguenza, di privarli di cibo prima di sottoporli al test. D'altra parte, i vantaggi del T-maze, che si ritrovano anche in questo modello, sono la sua semplicità e la velocità di apprendimento degli animali: si ottengono infatti buone risposte in dodici giorni e per i ratti non risulta essere un task né troppo facile né troppo difficile.

Gli errori che sono connessi alla memoria spaziale e alla memoria di lavoro possono essere immediatamente valutati.

Inoltre, nei metodi comportamentali più semplici le prestazioni degli animali migliorano continuamente di giorno in giorno fino ai massimi

livelli (Aultman and Moghaddam, 2001): in questo modello, invece, le prestazioni degli animali raggiungono dei valori che rimangono stabili, che non raggiungono mai la soglia massima e che non vengono superati nemmeno con un numero eccessivo di prove.

Scopo della tesi

La presente tesi ha avuto come scopo dapprima la validazione di un nuovo metodo comportamentale, il water escape T-maze, per mezzo di trattamenti farmacologici ed, in seguito, l'utilizzo di tale modello per studiare l'implicazione della corteccia peririnale nella memoria di lavoro.

Per quanto riguarda la validazione farmacologica del metodo sono stati utilizzati farmaci dei quali è conosciuta la capacità di diminuzione delle funzioni cognitive. In particolare, è stato esaminato l'effetto della scopolamina, antagonista colinergico muscarinico, come prototipo di farmaco con noti effetti negativi sui test utilizzati nella valutazione della working memory (Aultman and Moghaddam, 2001; Beninger et al., 1986; Steckler et al., 1998). Inoltre, poiché la neurotrasmissione glutammatergica gioca un ruolo critico nel mantenimento della working memory (Verma and Moghaddam, 1996c), sono stati valutati gli effetti dell'antagonista ionotropo dizocilpina (MK-801) e metabotropo 2-metil-6-(feniletinil)piridina (MPEP) del glutammato, somministrati da soli o in combinazione.

Poiché l'espressione del gene Fos, appartenente alla famiglia degli Immediate Early Genes (IEGs), è un correlato indiretto dell'aumentata attività neuronale (Vann et al., 2000), abbiamo voluto studiare la distribuzione del Fos in diverse aree cerebrali (corteccia e ippocampo) in seguito allo svolgimento del task nel modello animale proposto. Abbiamo, quindi, valutato l'eventuale alterazione dell'espressione del Fos dopo trattamento con gli antagonisti glutammatergici per capire se possa esistere una correlazione tra attività neuronale e performance del task.

Dati neurofisiologici e numerose evidenze sperimentali portano a ritenere la corteccia peririnale una stazione nervosa cruciale nel circuito mnesico ippocampale e paraippocampale: esiste, infatti, una profonda interconnessione sinaptica tra PRh, EC ed ippocampo. Molteplici studi effettuati su altre zone corticali del MTL (ippocampo, amigdala, corteccia entorinale, giro dentato) hanno evidenziato che la regione ippocampale gioca un ruolo chiave nella trasmissione degli input alla neocorteccia, ma l'implicazione ed il ruolo della PRh nel complesso sistema di trasferimento delle informazioni risultano ancora controverse. Questi presupposti, soprattutto di natura anatomo-fisiologica, ci hanno spinto ad ipotizzare che lesioni localizzate in tale area corticale possano indurre un deficit nei processi di acquisizione, consolidamento ed elaborazione delle informazioni. Allo scopo di valutare il coinvolgimento della PRh sono state effettuate lesioni neurotossiche bilaterali localizzate sia prima che dopo l'apprendimento del task ed è stata valutata la memoria di lavoro tramite il modello da noi convalidato.

MATERIALI E METODI

Animali

Sono stati utilizzati ratti albinici maschi di ceppo Sprague Dawley (Charles River, Como) del peso iniziale di 200-250 gr. Gli animali sono stati stabulati in condizioni controllate di luce (dalle 07.00 alle 19.00), umidità (60%) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Essi sono stati alimentati con dieta standard, con libero accesso a cibo ed acqua e stabulati in gruppi di tre animali per gabbia. Le prove sperimentali sono state effettuate durante il giorno (tra le 9.00 e le 15.00). Sono stati impiegati un minimo di sei ratti per gruppo e sono stati inclusi gruppi di controllo per ogni test effettuato.

La gestione degli animali è stata condotta sulla base della legislazione vigente rispettando le direttive della Comunità Europea, sulla cui osservanza vigila il comitato veterinario istituito dalla nostra Università.

Lesioni neurotossiche

I ratti sono stati suddivisi in due gruppi: gruppo di controllo (sham) e gruppo lesi (N=9). Gli animali, prima dell'intervento, sono stati anestetizzati tramite iniezione intraperitoneale di equitesina 0.4 ml/100 g (miscela di sodio pentobarbitale e cloralio idrato) ed in seguito sistemati su stereotassico Kopf. E' stato effettuata l'incisione dello scalpo in modo da scoprire il cranio e riconoscere il bregma al fine di settare le coordinate e proseguire con l'operazione. Per indurre le lesioni nella PRh è stato iniettato acido ibotenico disciolto in buffer fosfato 0.1 M (1mg/ml). Le coordinate usate sono state: AP -3.3 , -4.3 , -5.3 ; L ± 6.4 , ± 6.5 , ± 6.6 ; V

5.5 , 5.5 , 5,3 (Paxinos and Watson, 1986). Il gruppo sham ha ricevuto lo stesso trattamento operatorio, ma al posto di acido ibotenico è stata iniettata soluzione fisiologica. Alla fine dell'intervento chirurgico ad ogni ratto è stato ricucito il taglio con filo da sutura e riportato in stabulario. Tutti i ratti operati, sia lesi che sham, prima di essere sottoposti al test nel water T-maze sono stati lasciati riposare per 2 settimane. E' bene sottolineare che tutti gli interventi chirurgici sono stati condotti in condizioni assolutamente asettiche come previsto dalla normativa vigente.

Perfusione e istologia

I ratti sono stati anestetizzati con equitesina e perfusi attraverso una cannula inserita nell'aorta ascendente prima con 50 ml di PBS (phosphate buffered saline) 10 mM per 2 minuti ed in seguito con 200 ml di paraformaldeide 4% in PBS 0,1 M ph 7,4 per 20 minuti. I cervelli rimossi sono stati messi in sucrosio al 30% tutta la notte per la crioprotezione. Le sezioni (40 µm di spessore) sono state preparate con un microtomo congelatore, raccogliendo una fettina ogni sei in ordine sequenziale. Per tutti gli animali, una serie di sezioni è stata montata su vetrini e poi utilizzata per la colorazione Nissl; un'altra serie di sezioni, invece, è stata utilizzata per l'immunoistochimica del Fos.

Immunoistochimica

Colorazione NISSL

La colorazione Nissl è una soluzione di blu di toluidina o di altri coloranti basofili che permette di colorare i nuclei in blu, i corpi di Nissl in violetto su sfondo incolore, permettendo una visualizzazione delle cellule. I vetrini con le sezioni coronali, prima, sono immersi in etanolo-cloroformio 4:1 per un'ora e, dopo, in una preparazione di cresyl-violetto 0.1% per 20 minuti.

Le successive fasi comprendono: una disidratazione con passaggi successivi in alcoli con gradazione crescente (50%, 70%, 80%, 96% e due passaggi in alcol 100%) ed un'immersione in xilene per 10 minuti. I vetrini vengono quindi coperti con una sostanza montante (Entellan) a cui viene fatto aderire il coprioggetto.

Acquisizione ed elaborazione delle immagini

Le immagini sono state acquisite ed elaborate col programma Image Proplus. I vetrini sono stati osservati al microscopio collegato con una videocamera al computer. Il programma Image Proplus è stato impostato in modo da prendere immagini da più frames (riquadri) a 10x di ingrandimento, tanto da coprire con tutti i frames l'area interessata. Un tavolino motorizzato sposta automaticamente il vetrino di un frame alla volta, il programma recupera l'immagine (con anche la correzione del background) di tutti i frames e le allinea in successione componendo così l'immagine finale.

Immunoistochimica per la quantificazione del c-Fos

Per la procedura di immunoistochimica è stato utilizzato l'anticorpo policlonale goat anti-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), diluito 1:2000 in 1% di siero normale di rabbit (NRS), 0.3% Triton X-100 e 0.1% NaN₃ in PBS. Le sezioni sono state pre trattate per 15 minuti con una soluzione 1 % di H₂O₂ e poi pre incubate per un'ora in NRS al 5%. Le sezioni poi sono state incubate per 48-72 ore con l'anticorpo primario. Dopo ripetuti lavaggi sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-goat biotinilato, diluito 1:200 in 1% di NRS e 0.3% Triton X-100 in PBS. Alla fine, le sezioni sono state trattate con la soluzione avidina-biotina-perossidasi, utilizzando la 3,3-diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO) come cromogeno.

Acquisizione ed elaborazione delle immagini

Il materiale è stato esaminato al microscopio. Per la valutazione quantitativa il numero di corpi cellulari positivi al Fos sono stati contati in 3 sezioni per animale usando il sistema di analisi delle immagini ImagePro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) per ricostruire l'area di interesse della conta. Le cellule immunoreattive al Fos sono state contate in una porzione della corteccia temporale adiacente alla corteccia peririnale, negli strati superiori (I-III) e inferiori (V-VI); nella corteccia peririnale (area 36 e 35, strati superiori (I-III) e inferiori (V-VI)); nella corteccia entorinale, strati superiori (I-III) e inferiori (V-VI); nell'ippocampo: nello strato piramidale delle regioni CA1, CA2, CA3, e negli strati granulare e polimorfico (hilus) del giro dentate.

Con il programma ImageProplus abbiamo ottenuto le immagini dell'area di interesse per la conta su cui abbiamo segnato (con un marker) le cellule Fos-positive. I dati relativi alle coordinate della posizione di ciascun marker rispetto alla figura sono stati trasferiti nel programma Excel e caricati su uno script di Matlab scritto dal dott. Giuseppe Bertini dell'Università di Verona, attraverso il quale abbiamo potuto calcolare il numero di marker per regione di interesse (quindi il numero di cellule Fos-positive) e l'area di ciascuna regione, ottenendo così la densità di cellule per regione. Per ogni animale è stata fatta la media dei valori della stessa regione presi su tre sezioni diverse.

Apparecchiatura

Water T maze

Come modello comportamentale per la spatial working memory è stato utilizzato il water T maze (Del Arco et al., 2007).

Il water T maze consiste in un T-maze in Plexiglas nero, riempito con acqua a circa 23°C. Il braccio principale (100 cm X 20 cm X 40 cm) è connesso ai bracci laterali destro e sinistro (45 cm X 20 cm X 40 cm), il cui accesso può essere bloccato da barriere rimovibili in Plexiglas. Alla fine di ogni braccio è posta una piattaforma (Plexiglas nero, 15 cm X 18 cm), immersa 2 cm sotto la superficie dell'acqua. Il water T maze è stato collocato in un ambiente privo di segnali visivi.

Farmaci

Dizocilpina (MK-801, 0.125 – 0.25 mg/kg), scopolamina (1 mg/kg, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) e MPEP (1 mg/kg, Tocris, Bristol, UK) sono stati disciolti in soluzione fisiologica ed iniettati per via intraperitoneale 40 minuti prima del test. MK-801 e MPEP sono stati somministrati soli o in associazione.

I farmaci e la dose sono stati assegnati in maniera casuale ai ratti che avevano raggiunto il criterio, ovvero almeno il 70% di prove corrette per tre giorni consecutivi. Gli animali hanno ricevuto al massimo tre trattamenti farmacologici intervallati da una settimana, durante la quale i ratti sono stati sottoposti al test comportamentale ogni giorno. È stato seguito questo protocollo sperimentale poiché si è visto che le prestazioni degli animali tornano ai livelli di quelle dei gruppi controllo dopo circa 24 ore dal trattamento.

Procedura

Il metodo del water T maze viene effettuato ripetendo una sequenza “pseudorandom” di dieci paia di prove (forced-choice). Ogni prova consiste, infatti, in una scelta forzata (forced choice), dove i ratti hanno accesso soltanto ad un braccio, sinistro (L) o destro (R), nel quale è presente la piattaforma, ed in una scelta libera (choice), dove gli animali hanno accesso ad entrambi i bracci ma la piattaforma si trova soltanto nel braccio opposto a quello in cui il ratto è entrato precedentemente. Il roditore, quindi, deve imparare che la piattaforma si trova sempre nel braccio opposto a quello nel quale è stato guidato in maniera forzata. Se l’animale sceglie il braccio in cui non è presente la piattaforma (lo stesso braccio nel quale è entrato durante la forced choice), viene bloccato all’interno di esso ponendo la barriera rimovibile: in questo modo il ratto rimane in acqua per dieci secondi (scelta sbagliata). Trascorsi i dieci secondi, la barriera viene manualmente sollevata e il ratto può nuotare verso il braccio opposto fino a trovare l’approdo per uscire dall’acqua. Una volta che l’animale ha raggiunto la piattaforma, sia dopo la scelta forzata che quella libera, la porta scorrevole viene chiusa ed esso viene mantenuto sulla piattaforma per dieci secondi. L’intervallo di tempo tra due prove successive (inter-trial interval) è di trenta secondi, quello tra la scelta forzata e quella libera (intra-trial interval) è di dieci secondi. Durante questi secondi il ratto è posto in una gabbia di plastica (27 cm X 27 cm X 23 cm) vicino al T maze.

Il primo giorno, i ratti vengono immersi nel water T maze per un minuto, senza piattaforme, ed in questo modo essi vengono abituati al labirinto e all’acqua. Il secondo e il terzo giorno, gli animali sono sottoposti a dieci paia di prove costituite da due scelte forzate alternate, e durante la seconda scelta hanno accesso solo al braccio opposto a quello che hanno visitato

precedentemente. Dal quarto giorno i ratti sono sottoposti a dieci paia di prove forced-choice alternate, come descritto sopra. Ogni giorno viene utilizzata una sequenza differente, “pseudorandom”, di scelte alternate forzate (per esempio L-R-L-R-L-L-R-R-L-R).

I ratti vengono sottoposti al test fino a quando non eseguono almeno il 70% di risposte corrette per tre giorni consecutivi, ovvero almeno sette paia di prove corrette su dieci. Gli animali che non raggiungono tale criterio (approssimativamente il 15%) vengono scartati.

Gruppi diversi di animali (N = 9-12 per gruppo), che hanno raggiunto il criterio, sono stati trattati con l'antagonista muscarinico scopolamina (1 mg/kg), o con l'antagonista ionotropo del recettore NMDA MK 801 (0.125 mg/kg e 0.25 mg/kg), o con l'antagonista metabotropo mGlu₅ MPEP (1 mg/kg) 40 minuti prima del test. Altri gruppi di animali hanno ricevuto sia MK801 (0.125 o 0.25 mg/kg) che MPEP (1 mg/Kg) somministrati contemporaneamente. I gruppi di controllo sono stati trattati con soluzione fisiologica. I ratti sono stati sottoposti al test nel water T maze, come precedentemente descritto, e valutati per la percentuale di risposte corrette effettuate.

Analisi statistiche

I risultati riguardanti la validazione farmacologica del modello animale e le lesioni effettuate prima e dopo l'apprendimento sono stati analizzati tramite analisi di varianza seguita dal test di Duncan.

I risultati sull'espressione del c-fos, sono stati analizzati per area tramite analisi di varianza seguita dal test di Tukey.

RISULTATI

La **figura 9** mostra l'effetto della somministrazione di scopolamina (1 mg/kg) sulla percentuale di risposte corrette dei ratti nel water T maze. Il trattamento con l'antagonista colinergico indusse una diminuzione significativa della performance dei ratti rispetto al gruppo di controllo, nel quale la percentuale di risposte corrette durante il test è stata molto elevata. I risultati ottenuti sono in perfetto accordo con l'effetto amnestico della scopolamina: come descritto precedentemente, infatti, tale antagonista muscarinico diminuisce i processi cognitivi, tra i quali anche la memoria di lavoro, processo fondamentale per la risoluzione di questo task..

La **figura 10** mostra l'effetto della somministrazione di MK801 a due differenti dosi (0.125 mg/kg o 0.25 mg/kg) sulla percentuale di risposte corrette dei ratti nel water T maze. Il trattamento con MK 801 indusse una diminuzione significativa della performance dei ratti soltanto alla dose di 0.25 mg/kg.

Tali risultati sono in accordo con il ruolo critico rivestito dal glutammato nel mantenimento della working memory.

La **figura 11** mostra l'effetto della somministrazione di MPEP (1 mg/kg) da solo o in combinazione con MK 801 (0.125-0.25 mg/kg) sulla percentuale di risposte corrette dei ratti nel water T maze.

Il trattamento con MPEP (1 mg/kg) da solo non causò effetti significativi sulla performance dei ratti, ma potenziò l'effetto amnestico indotto dalla dose più alta MK 801. Infatti, il gruppo di animali trattato con entrambi gli antagonisti glutamatergici mostrò un numero di risposte corrette

significativamente inferiore rispetto al gruppo trattato solo con MK-801. Tale dato è a favore della probabile interazione funzionale tra i recettori ionotropi e metabotropi del glutammato.

La **figura 12** mostra l'effetto della somministrazione di MK-801 (0.25mg/Kg) sull'espressione del c-fos in diverse sotto regioni dell'ippocampo a seguito dell'esecuzione del task nel water T-maze.

Si può osservare una tendenza all'aumento dell'attività neuronale, in quasi tutte le aree prese in considerazione, in seguito alla somministrazione dell'antagonista glutamatergico MK-801, indipendentemente dalla performance (MK+ e MK-). Tale effetto è risultato significativo, però, solo nei ratti la cui performance è stata negativa (MK-) e che, quindi, hanno risentito del blocco della trasmissione glutamatergica, e, in particolare, solo nelle aree CA₁ e CA₃.

La **figura 13** mostra l'effetto della somministrazione di MK-801 (0.25mg/Kg) sull'espressione del c-fos in diverse regioni corticali a seguito dell'esecuzione del task nel water T-maze.

Si può notare una tendenza all'aumento dell'attività neuronale in seguito alla somministrazione dell'antagonista glutamatergico MK-801 indipendentemente dalla performance (MK+ e MK-), nelle varie aree corticali considerate.

La **figura 14** mostra l'effetto della somministrazione di MK-801 (0,25mg/Kg) sull'espressione del c-fos in differenti regioni corticali, suddivise in strati superiori e profondi, a seguito dell'esecuzione del task nel water T-maze.

Si può notare una tendenza all' aumento dell' attività neuronale in seguito alla somministrazione dell'antagonista glutamatergico MK-801 indipendentemente dalla performance degli animali (MK+ e MK-). Tale aumento, però, risulta essere statisticamente significativo nei ratti che hanno eseguito male il task (MK-) solo nello strato più profondo della corteccia peririnale 35 e, indipendentemente dalla performance dell'animale (MK+ e MK-), nello strato più profondo della corteccia entorinale.

La **figura 15** mostra la fase di apprendimento del gruppo controllo (N=12) nel test comportamentale del water T-maze. Come si può notare esiste una netta differenza tra la media delle prestazioni del primo giorno e quella dell'undicesimo. Solo il 5% dei ratti non raggiunge il criterio prestabilito (il 70% di risposte corrette per 3 giorni consecutivi).

La **figura 16** mostra l'effetto delle lesioni della zona peririnale effettuate con somministrazione di acido ibotenico 15 giorni prima l'apprendimento. I ratti lesi non riescono a raggiungere il criterio prestabilito: la percentuale di risposte corrette sono significativamente inferiori rispetto ai ratti di controllo.

La **figura 17** mostra l'effetto delle lesioni effettuate dopo che i ratti avevano già appreso il compito nel T-maze. In questo caso i ratti lesi, al pari del gruppo controllo, ricordano, presentando una performance paragonabile a quella esibita prima dell'intervento.

La **figura 18** mostra un esempio di sezione coronale di corteccia di un ratto sham in seguito a colorazione Nissl a due diversi

ingrandimenti (10x e 4x). L'elevato numero dei corpi cellulari colorati in violetto, è indice di elevata densità neuronale e quindi di vitalità del tessuto.

La **figura 19** mostra un esempio di sezione coronale di corteccia di un ratto leso con acido ibotenico in seguito a colorazione Nissl a due diversi ingrandimenti (10x e 4x). Il basso numero dei corpi cellulari colorati in violetto, è indice di una scarsa densità neuronale. Il tessuto appare diverso da quello riportato in figura 18 (ratto di controllo).

La **figura 20** mostra un esempio di sezione coronale di corteccia di ratto trattato con MK-801 che esibì una performance positiva al water T-maze. La sezione è stata sottoposta ad incubazione con anticorpo specifico per il c-fos. La presenza di cellule immuno positive al Fos risultano (colorate in marrone scuro) è indice di attività neuronale.

La **figura 21** mostra un esempio di sezione coronale di ippocampo di ratto trattato con MK-801 e che esibì una performance negativa al water T-maze. La sezione è stata sottoposta ad incubazione con anticorpo specifico per il c-fos. La presenza di cellule immuno positive al Fos (colorate in marrone scuro) è indice di attività neuronale.

DISCUSSIONE

Finora sono stati sviluppati pochi metodi per la valutazione della working memory che utilizzano l'acqua come ambiente esterno ed alcuni di questi richiedono parecchie settimane di prova affinché i ratti apprendano (Frick et al., 1995). Il presente studio ha avuto come scopo la validazione, per mezzo di trattamenti farmacologici, di un metodo comportamentale nuovo e semplice: il water T maze (Del Arco et al., 2007).

In tale modello sperimentale tutte le informazioni necessarie per lo svolgimento del task (scelta forzata e, quindi, accesso guidato ad uno dei due bracci del labirinto) e per determinare la risposta corretta (scelta libera e, quindi, entrata nel braccio opposto a quello in cui l'animale è stato precedentemente forzato a dirigersi) sono disponibili ed accessibili prima dell'intervallo di tempo di 10 secondi (intra-trial interval). Questo metodo non risulta né troppo semplice né troppo difficile per i roditori ed il criterio viene raggiunto in circa 12 giorni.

Uno dei maggiori vantaggi di questo metodo è la presenza, come rinforzo positivo, della piattaforma che permette al ratto di uscire dall'acqua e che, conseguentemente, costituisce un'ottima spinta motivazionale per la risoluzione di questo task. L'uso della piattaforma non richiede l'utilizzo di cibo o di acqua come ricompensa e, di conseguenza, i ratti non ne vengono privati prima del test. Tale privazione, infatti, potrebbe risultare dannosa per la salute dei roditori (Frick et al., 1995). Il water T maze, inoltre, permette la ripetizione di più prove al giorno dal momento che la sazietà non influenza la risposta dell'animale.

Il water T maze supera i problemi legati alla paura del ratto dovuta ad ambienti aperti o a labirinti sopraelevati: un eccessivo timore, infatti, induce immobilità (freezing) e, di conseguenza, l'animale potrebbe non essere portato ad esplorare l'ambiente e a non terminare la prova. L'immersione del ratto in acqua, d'altra parte, lo obbliga a raggiungere l'approdo il prima possibile e a concludere, quindi, la prova.

Una volta che i roditori hanno imparato, le loro prestazioni raggiungono livelli stabili, sotto la soglia massima, nonostante un allenamento prolungato (oltre i 12 giorni): questo aspetto risulta essere vantaggioso rispetto a modelli sperimentali più facili, nei quali la performance degli animali, con il continuo allenamento, raggiunge i valori massimi. Infatti, il nostro modello comportamentale può risultare idoneo anche alla valutazione di farmaci che aumentano le funzioni cognitive.

Il water T maze permette di rivelare immediatamente gli errori dovuti alla memoria di lavoro spaziale e alla memoria di riferimento. La memoria di riferimento è un tipo di memoria che permette l'apprendimento delle regole generali di un metodo, ad esempio la corsa fino alla fine di un labirinto o il raggiungimento della piattaforma; la working memory, invece, è caratterizzata dalla natura transitoria della relazione stimolo-risposta (Frick et al., 1995). Il nostro metodo comportamentale è in grado di valutare entrambi i tipi di memoria.

La validazione del water T maze è stata fatta esaminando in primo luogo gli effetti della somministrazione di scopolamina, antagonista muscarinico, sulla performance dei ratti. I nostri risultati, come ipotizzato, riportano una marcata riduzione della percentuale di risposte corrette in tutti i ratti trattati e sono in perfetto accordo con l'effetto amnestico della scopolamina: tale antagonista colinergico come descritto precedentemente, diminuisce i

processi cognitivi, tra i quali anche la memoria di lavoro, processo fondamentale per la risoluzione di questo task (Power et al., 2003).

In secondo luogo sono stati valutati gli effetti di MK-801, antagonista ionotropo del recettore NMDA che determinò una diminuzione significativa della percentuale di risposte. Poiché numerosi studi sperimentali hanno evidenziato che la somministrazione di antagonisti del recettore NMDA diminuisce le prestazioni dei ratti in differenti modelli impiegati per la valutazione della spatial working memory (Verma and Moghaddam, 1996), in questo studio abbiamo dimostrato che il water T maze è sensibile alla modulazione della working memory da parte della neurotrasmissione glutammatergica.

Infine, i dati che abbiamo ottenuto riportano che la somministrazione combinata di MK-801 e di MPEP, antagonista metabotropo del recettore NMDA, comporta un indebolimento significativamente più marcato della memoria di lavoro rispetto a quello ottenuto con la somministrazione del solo MK-801. Infatti, mentre il trattamento con MPEP da solo non comporta diminuzione significativa della percentuale di risposte corrette dei ratti, in associazione con MK-801 ne aumenta gli effetti amnestici. Poiché è stato dimostrato che l'antagonista dei recettori mGlu₅ MPEP può modulare la trasduzione del segnale mediata dal recettore NMDA (Homayoun et al., 2004), i nostri risultati suggeriscono che il water T maze potrebbe essere un modello animale utile per lo studio delle probabili interazioni tra recettori metabotropi e ionotropo del glutammato.

Antagonisti non competitivi dei recettori NMDA come la fenciclidina, ketamina e dizocilpina (MK-801) inducono risposte comportamentali che rispecchiano alterazioni comportamentali riscontrate in disordini psichici quali la schizofrenia. Per esempio, se somministrate ai ratti, tali sostanze

inducono il comportamento stereotipato, il più comune modello animale di psicosi (Javitt, 1991). Nell' uomo sano inducono uno stato psicotomimetico caratterizzato da immagine distorta del corpo, allucinazioni e delirio (Korhonen et al., 1999). Oltre agli effetti psicotici, è stato dimostrato che il blocco dei recettori NMDA induce deficit in funzioni cognitive quali memoria e apprendimento (Riedel et al., 2003) ed effetti neurotossici reversibili in varie zone cerebrali quali induzione di mRNA per il c-fos, heat shock protein 70 e brain-derived neurotrophic factors (BDNF). L'induzione di c-fos e BDNF vengono osservati tipicamente in neuroni attivati. Per questo motivo, tali effetti indotti dagli antagonisti NMDA possono essere considerati "effetti eccitatori" e correlati alla loro azione psicotomimetica (Vaisanen et al., 1999). L'induzione dell'espressione del c-fos, gene indotto in maniera rapida e transitoria in seguito a stimoli di varia natura che attivano i neuroni, è stata ampiamente usata come segnale di attivazione neuronale. Per questo motivo abbiamo voluto indagare la correlazione tra l' "effetto eccitatorio" dell' MK-801 a livello neuronale e la performance dell'animale sul nuovo modello di working memory proposto.

A tale riguardo è opportuno precisare che la somministrazione di MK-801 nei ratti induce riposte a volte contraddittorie: in particolare, abbiamo riscontrato l'esistenza di animali che non rispondono all'effetto del farmaco, la cui performance non risulta affetta dal trattamento. Tale peculiare comportamento ci ha portato a valutare l'eventuale correlazione tra l'effetto dell' MK-801 sull'espressione del c-fos e la performance dell'animale nel task del water T-maze. Per verificare ciò abbiamo valutato l' aumento di c-fos indotto in varie aree cerebrali, sia in ratti la cui performance è risultata affetta che in ratti la cui performance non è risultata affetta dal blocco della trasmissione glutamatergica da parte dell' MK-801.

Le aree da noi analizzate sono state le corteccie entorinale, temporale e peririnale e l'ippocampo. I risultati ottenuti confermano una generale attivazione neuronale indotta dall'antagonista glutamatergico. In particolare, tale effetto risulta essere statisticamente significativo, nei ratti che rispondono al trattamento, solo in determinate regioni: nello strato più profondo della corteccia peririnale 36 e della corteccia entorinale e nelle regioni CA₁ e CA₃ dell'ippocampo. Tale risultato potrebbe sostenere la tesi che gli antagonisti NMDA sono in grado di indurre un "effetto eccitatorio", che si manifesta in un marcato aumento dell'espressione del c-fos a livello neuronale, e un deficit cognitivo a livello comportamentale, che si manifesta con ridotta performance dell'animale. Tali effetti però non sembrano essere propriamente correlati dal momento che i nostri risultati mostrano un marcato aumento di espressione del c-fos anche nei ratti che, nonostante il trattamento con l' MK-801, hanno effettuato correttamente il compito. Tale aumento, inoltre, risulta statisticamente significativo solo nello strato più profondo della corteccia entorinale. Poiché il numero di animali analizzati nell'ambito di questa tesi è relativamente basso sarà necessario aumentare la popolazione in esame per potere confermare i suddetti risultati e, quindi, poter delucidare in maniera più approfondita la correlazione tra attivazione neuronale indotta dal blocco glutamatergico e performance nel task.

Recenti studi, effettuati sia sull'uomo che sull'animale, sottolineano il ruolo essenziale del lobo temporale mediale nella formazione della memoria a lungo termine (Milner et al., 1998; Squire, 1992). L'acquisizione ed il consolidamento dei processi mnesici interessano un'interazione transitoria tra l'ippocampo e le altre strutture del MTL e della neocorteccia. In particolare l'ippocampo e la PRh, struttura corticale

oggetto del presente studio, sono strettamente interconnesse a livello neuroanatomico; ciò potrebbe portare a ritenere queste due strutture simili a “sistemi comunicanti”. Il ruolo di questa corteccia, però, è ancora abbastanza controverso e difficile da individuare con chiarezza. Nonostante siano numerose le evidenze sperimentali dell’implicazione della corteccia peririnale nella memoria, purtroppo ancora oggi ben poco si sa sul coinvolgimento di quest’area nei processi di memoria spaziale e di working memory. Alcune ricerche indicano che solo l’ippocampo, e non la PRh, sembra essere essenziale per i processi di apprendimento e ritenzione dell’informazione allocentrica (Bussey et al., 1999; Mumby et al., 2000); altre, al contrario, dimostrano che lesioni localizzate a livello della PRh inducono deficit nella “spatial memory” in test comportamentali come il water maze (Liu and Bilkey, 1998; Liu and Bilkey, 2001). Differenze metodologiche e procedurali potrebbero essere alla base di questa discrepanza di opinioni. Come suggerito da Liu e Bilkey (2001), è probabile che la corteccia peririnale contribuisca al consolidamento della memoria spaziale solo all’inizio del processo di acquisizione, quando l’informazione contestuale è ancora relativamente nuova.

Per studiare la corteccia peririnale ci siamo avvalsi del metodo di lesioni neurotossiche. Sono state indotte lesioni bilaterali con acido ibotenico, agente chimico selettivo per le fibre del sistema glutammatergico, prima dell’apprendimento e dopo l’apprendimento. L’uso dell’acido ibotenico, come agente neurotossico, è stato giustificato dal fatto che le strutture limbiche e corticali presentano un’elevata densità di recettori glutammatergici. I risultati sperimentali hanno dimostrato che lesioni localizzate a livello del sistema glutammatergico impediscono la piena espressione della working memory nel modello animale utilizzato (water-T maze). Si è notato, inoltre, che le lesioni pre-apprendimento comportavano

un calo delle prestazioni non permettendo agli animali di raggiungere il criterio stabilito, mentre le lesioni post-apprendimento non causavano deficit o problemi. Questi risultati sono in pieno accordo con quanto ipotizzato da Liu e Bilkey (2001): la PRh, ed in particolare il sistema glutammatergico presente in quest'area, influenza marginalmente il processo di consolidamento ed immagazzinamento, mentre gioca un ruolo chiave nel processo di acquisizione delle informazioni.

I risultati della presente confermano l'utilità ed il vantaggio del water T-maze come modello animale utile per lo studio delle capacità cognitive e suggeriscono l'importanza cruciale della PRh nel processo mnesico e di apprendimento. Questo studio si configura, pertanto, come “un trampolino di lancio” per il futuro impiego di sostanze farmacologicamente attive che permettano un miglioramento o ripristino delle capacità cognitive, in particolare per quanto riguarda la memoria di lavoro.

FIGURE

Figura 9

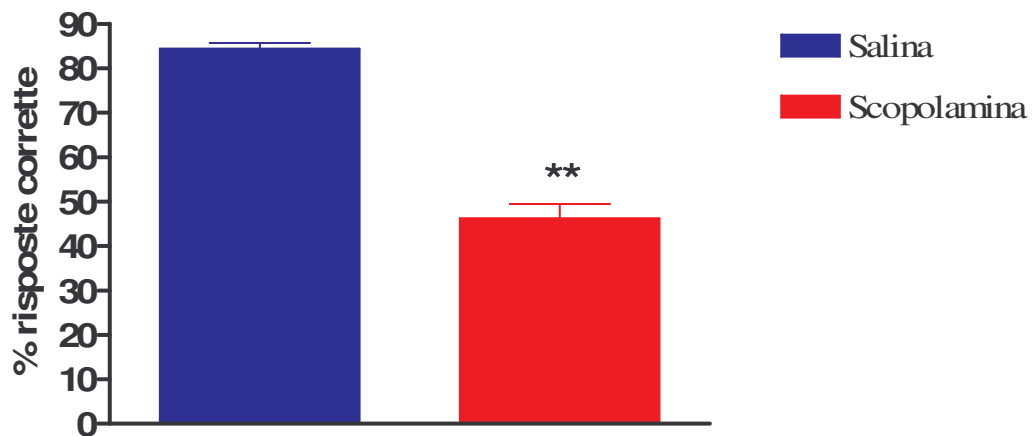


Figura 9. Effetto della somministrazione di scopolamina (1 mg/kg) sulla percentuale di risposte corrette nel water T- maze.

(Valori medi \pm ES della percentuale di risposte corrette; N = 8 animali per gruppo)

** $p < 0.001$ rispetto al gruppo controllo

Figura 10

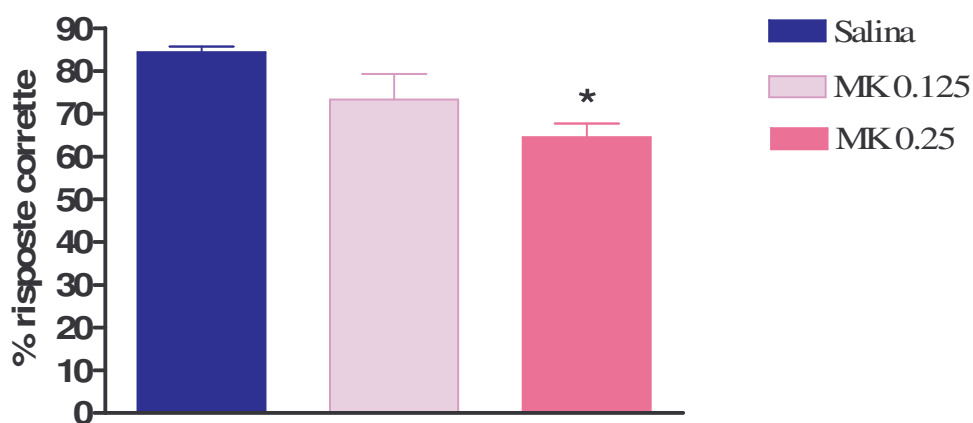


Figura 10. Effetto della somministrazione di MK801 (0.125 mg/kg – 0.25 mg/kg) sulla percentuale di risposte corrette nel water T maze.

(Valori medi \pm ES della percentuale di risposte corrette; N = 9-12 animali per gruppo)

* $p < 0.05$ rispetto al gruppo controllo.

Figura 11

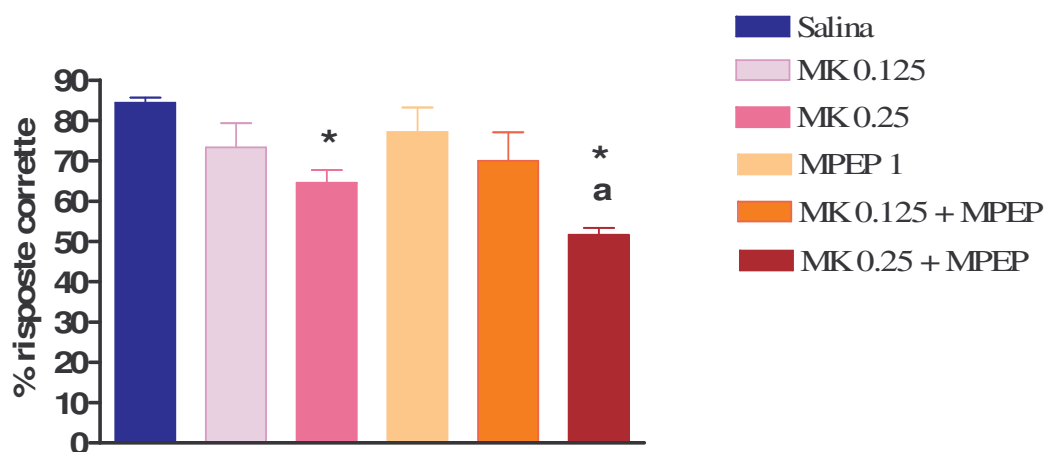


Figura 11. Effetto della somministrazione di MK801 (0.125-0.25 mg/kg), MPEP (1 mg/kg) e MPEP + MK801 (0.125-0.25 mg/kg) sulla percentuale di risposte corrette nel water T maze. (Valori medi \pm ES della percentuale di risposte corrette; N = 9-12 animali per gruppo)

* $p < 0.05$ rispetto al gruppo controllo.

* a $p < 0.05$ rispetto al gruppo trattato con MK 801 (0.25 mg/kg)

Figura 12

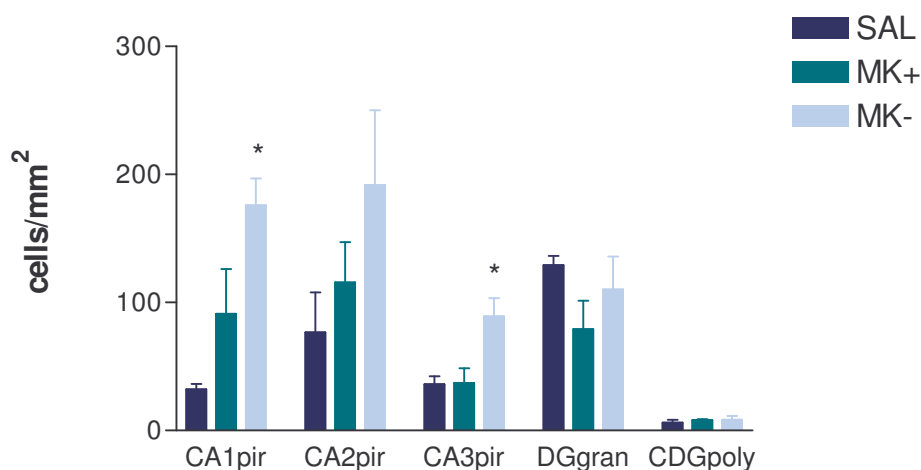


Figura 12 Effetto della somministrazione di MK-801 (0.25mg/Kg) sull'espressione del c-fos (quantificata come numero di cellule contate su mm² di area) in diverse sotto regioni dell'ippocampo a seguito dell'esecuzione del task nel water T-maze. (Valori medi \pm ES del numero di cellule Fos-positive per area; N = 3-5 animali per gruppo)

MK + animali trattati con MK-801 la cui performance risultò positiva e, quindi, non affetta dal blocco glutamatergico.

MK - animali trattati con MK-801 la cui performance risultò negativa e, quindi, affetta dal blocco glutamatergico.

* p < 0,05 rispetto al gruppo controllo

Figura 13

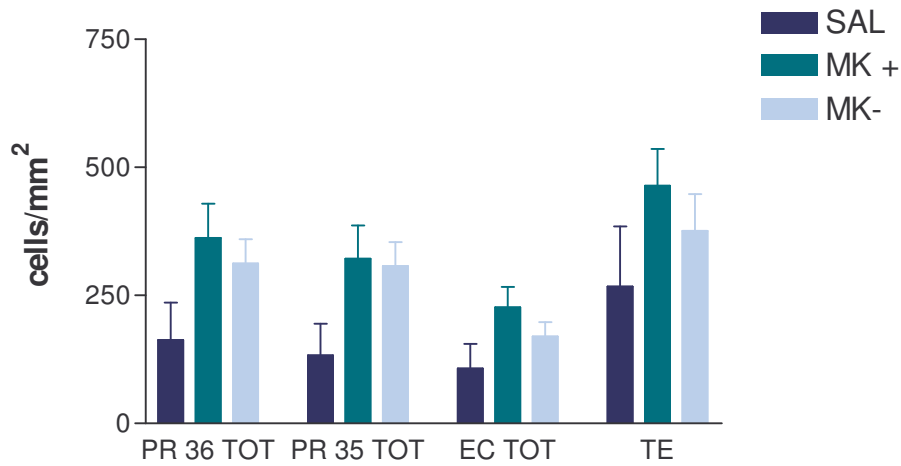


Figura 13 Effetto della somministrazione di MK-801 (0,25mg/Kg) sull'espressione del c-fos (quantificata come numero di cellule contate su mm^2 di area) in diverse regioni corticali a seguito dell'esecuzione del task nel water T-maze. (Valori medi \pm ES del numero di cellule Fos-positive per area; N = 3-5 animali per gruppo)

MK + animali trattati con MK-801 la cui performance risultò positiva e, quindi, non affetta dal blocco glutamatergico.

MK - animali trattati con MK-801 la cui performance risultò negativa e, quindi, affetta dal blocco glutamatergico.

Figura 14

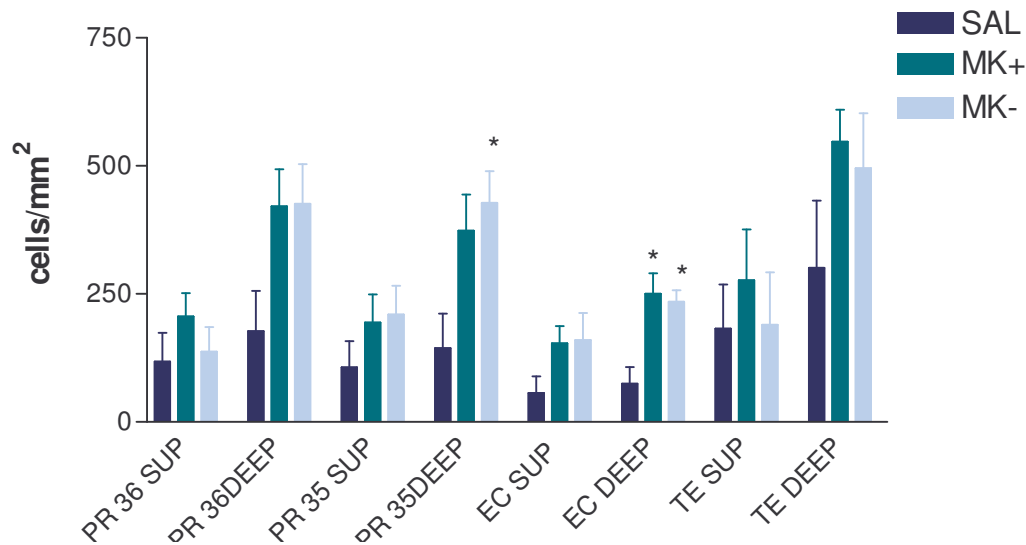


Figura 14 Effetto della somministrazione di MK-801 (0,25mg/Kg) sull'espressione del c-fos (quantificata come numero di cellule contate su mm² di area) in differenti regioni corticali, suddivise in strati superiori e profondi, a seguito dell'esecuzione del task nel water T-maze. (Valori medi \pm ES del numero di cellule Fos-positive per area; N = 3-5 animali per gruppo)

MK + animali trattati con MK-801 la cui performance risultò positiva e, quindi, non affetta dal blocco glutamatergico.

MK - animali trattati con MK-801 la cui performance risultò negativa e, quindi, affetta dal blocco glutamatergico.

* p < 0,05 rispetto al gruppo controllo

Figura 15

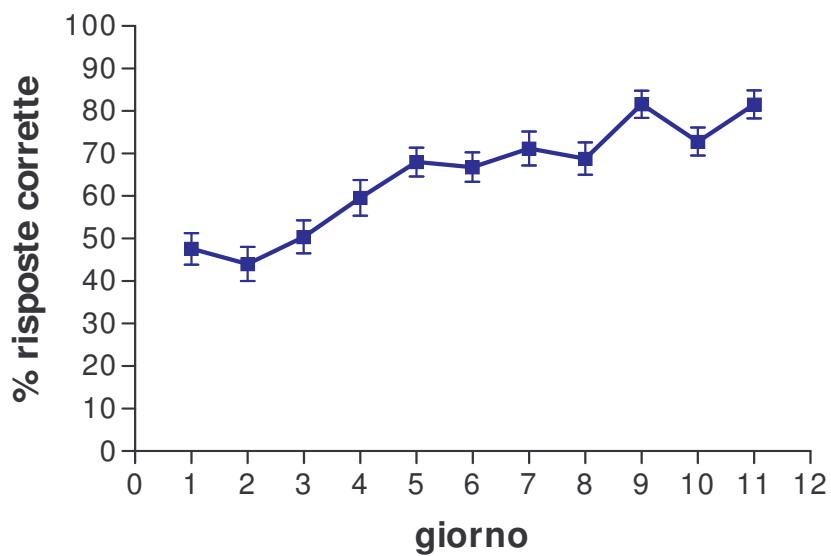


Figura 15 : Fase di apprendimento.

Percentuale di risposte corrette effettuate animali di controllo in 12 giorni di prove nel water T- maze.

(Valori medi \pm ES della percentuale di risposte corrette; N = 9-12 animali per gruppo)

Figura 16

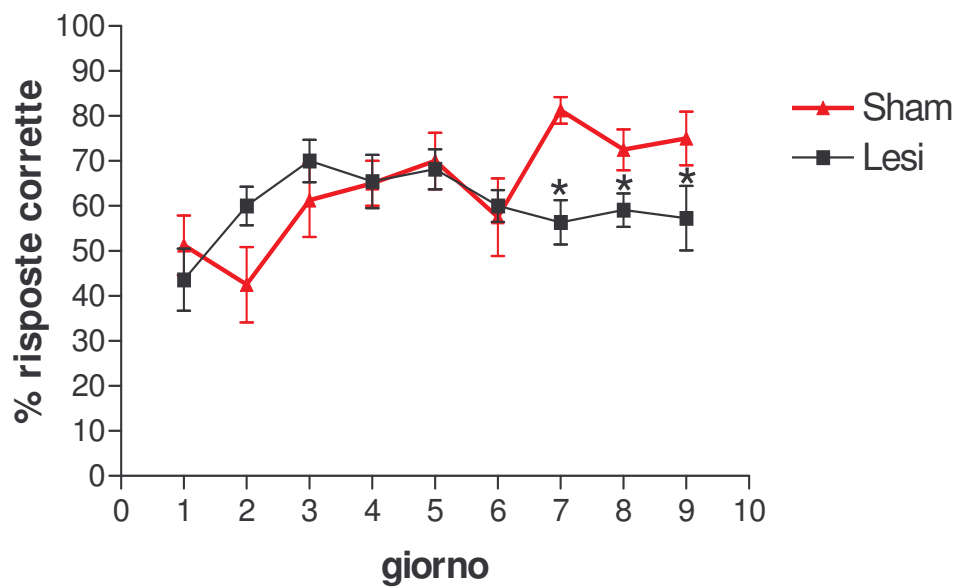


Figura 16: Effetto delle lesioni pre-apprendimento sulla performance di ratti nel task del water T-maze. (Valori medi \pm ES della percentuale di risposte corrette; N = 9-12 animali per gruppo)

* $p < 0.05$ rispetto al gruppo sham

Figura 17

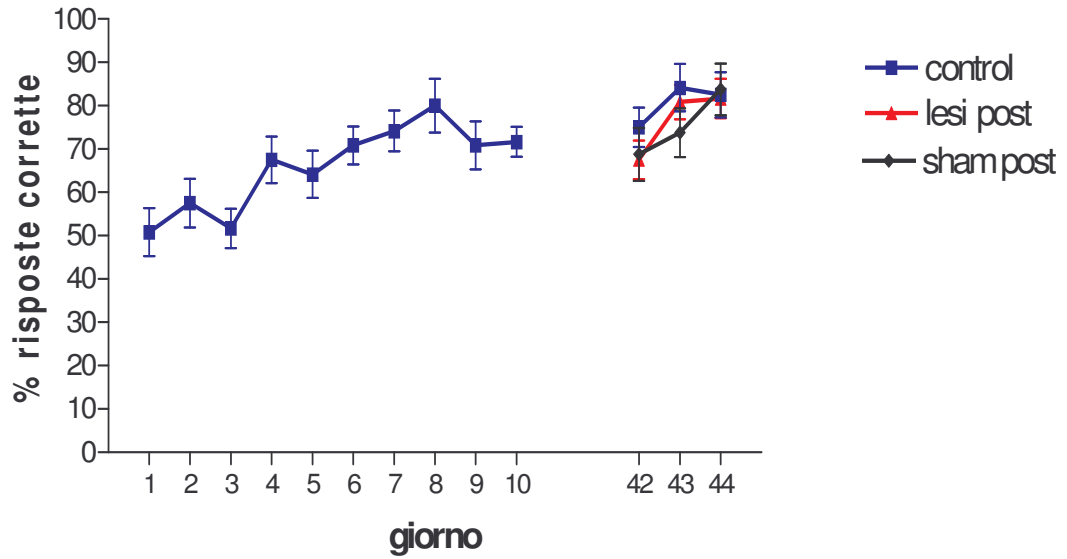


Figura 17: Effetto delle lesioni post-apprendimento sulla performance di ratti nel task del water T-maze. (Valori medi \pm ES della percentuale di risposte corrette; N = 9-12 animali per gruppo)

Figura 18

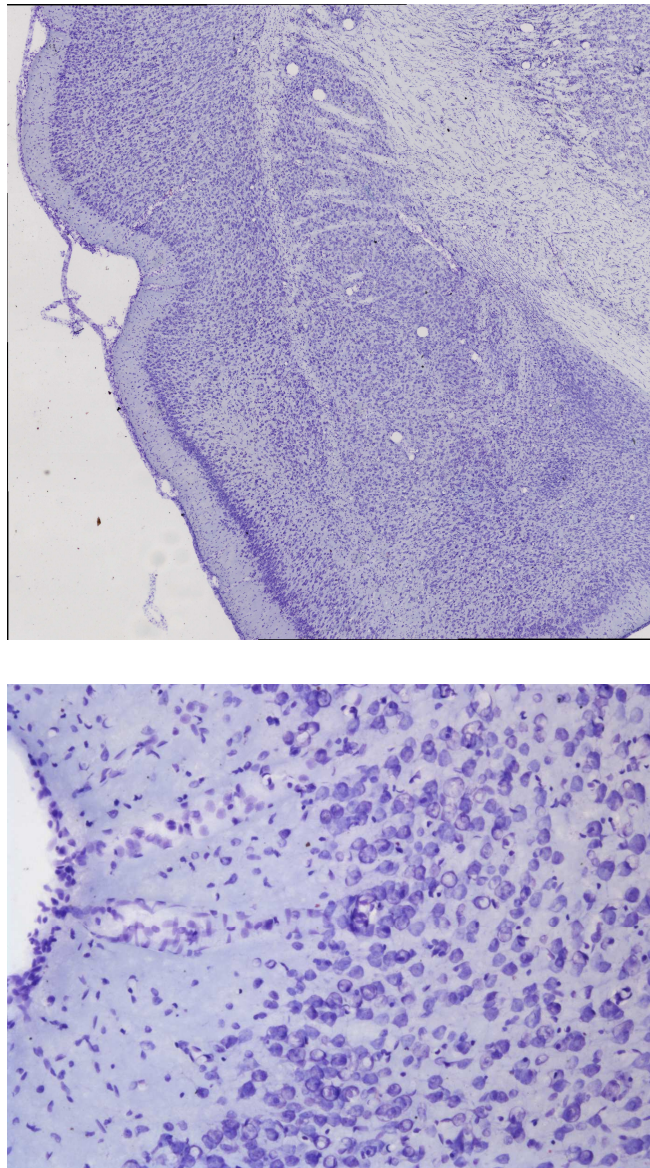


Figura 18: Sezioni coronali di corteccia di ratto di controllo (sham) effettuate a -4,8 mm dal bregma e sottoposte a colorazione Nissl.

Figura 19

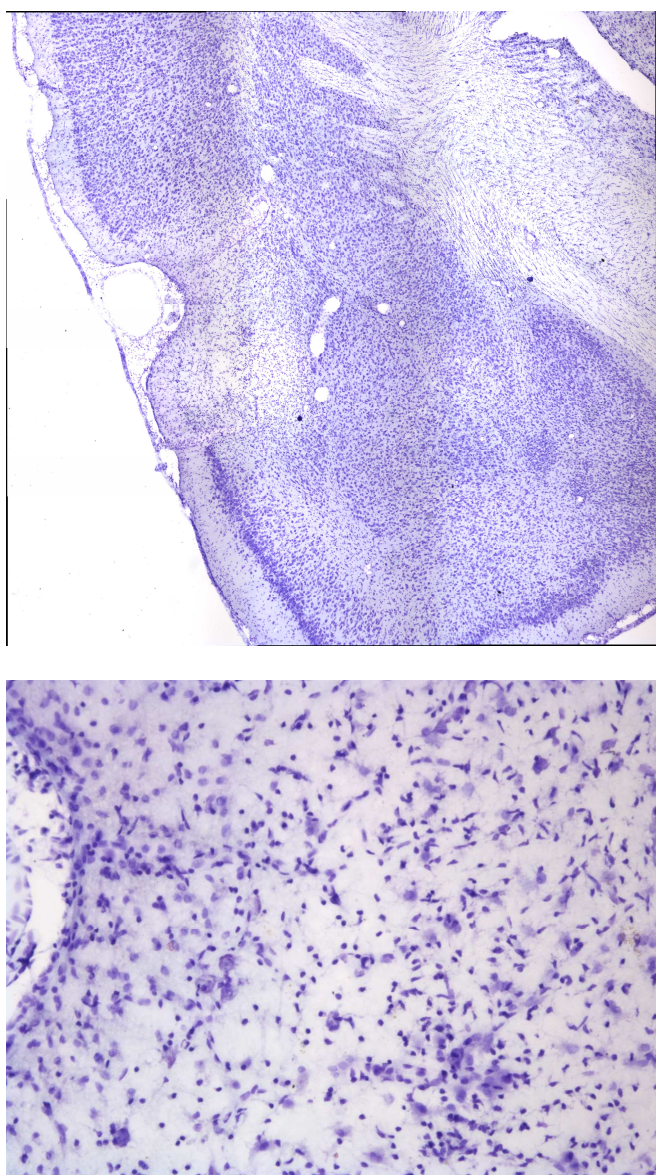


Figura 19: Sezioni coronali di corteccia di ratto leso con acido ibotenico effettuate a 4,8 mm dal bregma e sottoposte a colorazioni Nissl.

Figura 20



Figura 20: Sezione coronale di corteccia di ratto trattato con MK-801 e testato sul water-T maze, la cui performance risultò positiva. La sezione è stata sottoposta a immunizzazione con anticorpo specifico per il c-fos.

Figura 21



Figura 21: Sezione coronale di ippocampo di ratto trattato con MK-801 e testato sul water-T maze, la cui performance risultò negativa. La sezione è stata sottoposta a immunizzazione con anticorpo specifico per il c-fos.

BIBLIOGRAFIA

- Aggleton JP, Hunt PR, Nagle S, Neave N (1996) The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behav Brain Res* 81: 189-198.
- Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Sahgal A (1995) A comparison of the effects of medial prefrontal, cingulate cortex, and cingulum bundle lesions on tests of spatial memory: evidence of a double dissociation between frontal and cingulum bundle contributions. *J Neurosci* 15: 7270-7281.
- Anderson JR (1976) *Language, memory and thought*. Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Atkinson RL, Atkinson RC, Smith EE, Hilgard ER (1987) *Introduction to psychology* (9th ed.). New York.
- Aultman JM, Moghaddam B (2001b) Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology (Berl)* 153: 353-364.
- Baddeley A (1992) Working memory. *Science* 255: 556-559.
- Balsam PD, Tomie A (1985) *Context and learning*. Erlbaum.
- Barnes CA, Markowska AL, Ingram DK, Kametani H, Spangler EL, Lemken VJ, Olton DS (1990) Acetyl-1-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. *Neurobiol Aging* 11: 499-506.
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276: 2042-2045.
- Beninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ, el Defrawy SR (1986) Effects of scopolamine and unilateral lesions of the basal forebrain

on T-maze spatial discrimination and alternation in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 1353-1360.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1969a) Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67: 370-375.

Blitzer RD, Gil O, Landau EM (1990) Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 119: 207-210.

Bolles R.C., Fanselow M.S. (1980b) A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences* 3: 291-323.

Bures J, Buresova O., HJP (1983) Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour. Amsterdam: Elsevier.

Buresova O., Bures J, Bohdanecky Z, Weiss T (1964) Effect of atropine on learning, extinction, retention and retrieval in rats. *Psychopharmacologia* 5: 255-263.

Buresova O, Bures J, Oitzl MS, Zahalka A (1985) Radial maze in the water tank: an aversively motivated spatial working memory task. *Physiol Behav* 34: 1003-1005.

Burgard EC, Sarvey JM (1990) Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 116: 34-39.

Carlton P.L. (1963) Cholinergic mechanisms in the control of behavior by the brain. *Psychol Rev* 70: 19-39.

Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11: 61-80.

Davis M (1997) Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 9: 382-402.

Davis M, Rainnie D, Cassell M (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences* 17: 208-214.

De Wied D (1966) Inhibitory effect of ACTH and related peptides on extinction of conditioned avoidance behavior in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 28-32.

Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F (2007) Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res* 176: 267-273.

Dudchenko PA (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 699-709.

Durantou F, Cazala P, Jaffard R (1989) Intertrial interval dependent effect of lateral hypothalamic stimulation on spontaneous alternation behavior in a T-maze. *Physiol Behav* 46: 253-258.

Fanselow M.S., Lester L.S. (1988) A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as determinant of a topography of defensive behavior. In: *Evolution and learning* (Bolles R.C., Beecher M.D., eds), pp 185-211. Hillsdale NJ: Lawrence Erlbaum.

Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, Olton DS, Price DL (1995) Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging* 16: 149-160.

Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J (2000) Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience* 95: 293-307.

Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322: 419-422.

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J Neurosci* 21: 5089-5098.

Hebb D.O. (1949) *The organisation of behavior*. New York: John Wiley.

Heise GA (1975) Discrete trial analysis of drug action. *Fed Proc* 34: 1898-1903.

Hollmann M, Heinemann S (2003) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.

Holloway FA, Wansley R (1973) Multiphasic retention deficits at periodic intervals after passive-avoidance learning. *Science* 180: 208-210.

Homayoun H, Stefani MR, Adams BW, Tamagan GD, Moghaddam B (2004) Functional Interaction Between NMDA and mGlu5 Receptors: Effects on Working Memory, Instrumental Learning, Motor Behaviors, and Dopamine Release. *Neuropsychopharmacology* 29: 1259-1269.

Iversen L.L., Iversen S.D., Snyder S.H. (1987) Handbook of Psychopharmacology. In: *New Directions in Behavioral Pharmacology*. pp 531-573. New York: Plenum Press.

Klepstad P, Maurset A, Moberg ER, Oye I (1990) Evidence of a role for NMDA receptors in pain perception. *Eur J Pharmacol* 187: 513-518.

Korhonen MH, Litmanen H, Rauramaa R, Vaisanen SB, Niskanen L, Uusitupa M (1999) Adherence to the salt restriction diet among people with mildly elevated blood pressure. *Eur J Clin Nutr* 53: 880-885.

Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL, Krueckel B (1954) Enzyme concentrations in the brain and adjustive behavior-patterns. *Science* 120: 994-996.

Javitt D.C., Zukin S.R (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia.: *Am J Psychiatry* 148: 1301- 1308.

LeDoux JE (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behavioural Brain Research* 58: 69-79.

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *Journal of Neuroscience* 10: 1062-1069.

Liu P, Bilkey DK (1998) Excitotoxic lesions centered on perirhinal cortex produce delay-dependent deficits in a test of spatial memory. *Behav Neurosci* 112: 512-524.

Logie RH, D'Esposito M. (1998) Working Memory in the Brain: A special issue of Cortex. Amsterdam: Elsevier.

Maren S (1999) Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. Trends in Neurosciences 22: 561-567.

Marks I.M. Fears, phobias and rituals: panic, anxiety and their disorders. New York: Oxford University Press.

Martinez J.L., Kesner R.P. (1991) Learning and Memory: a Biological View. New York: Academic Press.

Morgan C.T., King A (1966) Introduction to psychology (3rd ed). New York.

Morris RG (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. Learning and Motivation 12: 239-260.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986a) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature 319: 774-776.

Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN (1986) Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. Q J Exp Psychol B 38: 365-395.

Myhrer T (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res Brain Res Rev 41: 268-287.

Nakanishi S (1992) Molecular diversity of the glutamate receptors. Clin Neuropharmacol 15: 4A-5A.

O'Dell, T.J., Kandel, E.R., Grant, S.G. (1991) Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. Nat 353: 558-560

O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. Neuron 11: 41-52.

-
- Olton DS (1977a) Spatial memory. *Sci Am* 236: 82-94, 96, 98.
- Olton DS (1977b) The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behaviour. *Ciba Found Symp* 327-349.
- Olton DS (1983) The use of animal models to evaluate the effects of neurotoxins on cognitive processes. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5: 635-640.
- Olton DS, Papas BC (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17: 669-682.
- Pavlov IP (1927) *Conditioned reflexes*. Oxford University Press.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Perez-Otano I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28: 229-238.
- Philips RG., Ledoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neuroscience* 106: 274-285.
- Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL (2003) Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 80: 178-193.
- Rescorla RA (1988) Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* 43: 151-160.
- Riedel G, Platt B, Micheau J (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140: 1-47.
- Rolls ET (2000) Memory systems in the brain. *Annual Review of Psychology* 2000;51: 599-630.
- Romanides AJ, Duffy P, Kalivas PW (1999) Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. *Neuroscience* 92: 97-106.
- Rosen JB, Schulkin J (1998) From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 105: 325-350.
- Rosenhan DI, Seligman MEP (1984) *Abnormal psychology*. New York: Norton.

Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 675-685.

Russell RW (1960) Drugs as tools in behavioral research. In: *Drugs and behavior* (Uhr L, Miller JG, eds), New York: Wiley.

Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 13-20.

Schulteis G, Martinez JL, Jr. (1990) ICI 174,864, a selective delta opioid antagonist, reverses the learning impairment produced by [leu]enkephalin. *Psychopharmacology (Berl)* 100: 102-109.

Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284: 1811-1816.

Shukitt-Hale B, McEwen JJ, Szprengiel A, Joseph JA (2004) Effect of age on the radial arm water maze—a test of spatial learning and memory. *Neurobiol Aging* 25: 223-229.

Sokolov MV, Kleschevnikov AM (1995) Atropine suppresses associative LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 672: 281-284.

Solger J, Wozny C, Manahan-Vaughan D, Behr J (2004) Distinct mechanisms of bidirectional activity-dependent synaptic plasticity in superficial and deep layers of rat entorhinal cortex. *European Journal of Neuroscience* 19: 2003-2007.

Steckler T, Sahgal A, Aggleton JP, Drinkenburg WH (1998) Recognition memory in rats—III. Neurochemical substrates. *Prog Neurobiol* 54: 333-348.

Steele RJ, Morris RG (1999) Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 9: 118-136.

Teather LA, Packard MG, Smith DE, Ellis-Behnke RG, Bazan NG (2005) Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiol Learn Mem* 84: 75-84.

Thorndike E (1932) *The Fundamentals of Learning*. New York: Teachers College Press.

Tocco G, Maren S, Shors TJ, Baudry M, Thompson RF (1992) Long-term potentiation is associated with increased [3H]AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Res* 573: 228-234.

Vaisanen J, Linden AM, Lakso M, Wong G, Heinemann U, Castren E (1999) Excitatory actions of NMDA receptor antagonists in rat entorhinal cortex and cultured entorhinal cortical neurons. *Neuropsychopharmacology* 21: 137-146.

Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP (2000) Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J Neurosci* 20: 2711-2718.

Verma A, Moghaddam B (1996) NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci* 16: 373-379.

Wenk GL, Grey CM, Ingram DK, Spangler EL, Olton DS (1989) Retention of maze performance inversely correlates with N-methyl-D-aspartate receptor number in hippocampus and frontal neocortex in the rat. *Behav Neurosci* 103: 688-690.

Whitehouse J.M. (1964) Effects of atropine on discrimination learning in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 57: 13-15.

Zhang C, Wong-Riley MT (1996) Do nitric oxide synthase, NMDA receptor subunit R1 and cytochrome oxidase co-localize in the rat central nervous system? *Brain Res* 729: 205-215.