

**TESI DOCTORAL**

**Modulació colinèrgica de l'escorça prelímbica en  
l'aprenentatge i la memòria de la Transmissió Social de  
Preferència Alimentària**

Núria Boix Trelis

Tesi doctoral co-dirigida per:

Dra. Anna Vale Martínez

Dra. Margarita Martí Nicolovius

Departament de Psicobiologia i de Metodologia de les Ciències de la Salut

Institut de Neurociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2007

Aquest treball ha estat possible gràcies a:

Una beca predoctoral de Formació d'Investigadors de la UAB (*UNI/2078/202*)

Dues ajudes de la Generalitat de Catalunya (2002SGR00080) i (2005SGR00551)

Una ajuda del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) (*BSO2002-03441*)

Una ajuda del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) (*SEJ2005-02518*)

**“Som una terrible mescla d'àcids nucleics i de records, de desitjos i de proteïnes”**

François Jacob

---

# ÍNDEX

<b><u>I. INTRODUCCIÓ</u></b>	<b>3</b>
<b><u>II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS</u></b>	<b>7</b>
<b><u>III. ANTECEDENTS EXPERIMENTALS</u></b>	<b>15</b>
<b>1. LA TRANSMISSIÓ SOCIAL DE PREFERÈNCIA ALIMENTÀRIA I ELS SEUS CIRCUITS NEURALS</b>	<b>15</b>
<u>1.1. Transmissió Social de Preferència Alimentària</u>	15
<u>1.2. Circuits Neurals Implicats</u>	19
<i>1.2.1 Sistema Hipocampal</i>	19
<i>1.2.2 Prosencèfal Basal i Amígdala</i>	27
<i>1.2.3 Escorça Frontal</i>	33
<i>1.2.4 Diencèfal</i>	35
<i>1.2.5 Altres Estudis</i>	37
<b>2. NUCLI BASAL MAGNOCEL·LULAR</b>	<b>41</b>
<u>2.1. Neuroanatomia i Neuroquímica</u>	41
<u>2.2. Modulació dels Processos Cognitius</u>	47
<b>3. CÒRTEX PRELÍMBIC</b>	<b>61</b>
<u>3.1. Neuroanatomia i Neuroquímica</u>	61
<u>3.2. Modulació dels Processos Cognitius</u>	65

<b><u>IV. TREBALL EXPERIMENTAL</u></b>	81
<b>1. TREBALL 1</b>	81
<u>1.1 Introducció</u>	82
<u>1.2 Experiment 1</u>	84
1.2.1 <i>Objectius i Procediment</i>	84
1.2.2 <i>Resum dels Resultats</i>	86
<u>1.3 Experiment 2</u>	88
1.3.1 <i>Objectius i Procediment</i>	88
1.3.2 <i>Resum dels Resultats</i>	89
<b>2. TREBALL 2</b>	103
<u>2.1 Introducció</u>	104
<u>2.2 Experiment 3</u>	105
2.2.1 <i>Objectius i Procediment</i>	105
2.2.2 <i>Resum dels Resultats</i>	107
<b><u>V. DISCUSSIÓ</u></b>	121
<b><u>VI. CONCLUSIONS</u></b>	135
<b><u>VII. BIBLIOGRAFIA</u></b>	139

## ABREVIATURES

<b>5-CSRT</b>	Tasca de <i>five-choice serial reaction time</i>
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina o serotonina
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina
<b>ABL</b>	Amígdala basolateral
<b>AC</b>	Àrea cingulada anterior de l'escorça prefrontal medial
<b>AID</b>	Àrea insular agranular dorsal de l'escorça prefrontal lateral
<b>AIV</b>	Àrea insular agranular ventral de l'escorça prefrontal lateral
<b>AMPA</b>	Àcid $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiònic
<b>APV</b>	Àcid D,L-2-amino-5-fosfonovaleric
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ASM</b>	Àrea septal medial
<b>BDBh</b>	Banda diagonal de broca, branca horitzontal
<b>BDBv</b>	Banda diagonal de broca, branca vertical
<b>BDNF</b>	Factor neurotròfic derivat del cervell
<b>CAM</b>	Tasca combinada que avalua memòria de treball i atenció
<b>CPP</b>	Àcid 3-(2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfònic
<b>CREB</b>	Proteïna d'unió a l'element de resposta a l'AMP cíclic
<b>CS<sub>2</sub></b>	Disulfur de carboni
<b>EIC</b>	Estimulació elèctrica intracerebral
<b>EEG</b>	Electroencefalograma
<b>EPF(m)/(dl)</b>	Escorça prefrontal (medial)/(dorsolateral)
<b>EV2</b>	Evitació activa de dos sentits
<b>GABA</b>	Àcid $\gamma$ -aminobutíric
<b>GAL-tg</b>	Ratolins transgènics que sobreexpressen galanina
<b>GD</b>	Gir dentat

<b>IgG</b>	Immunoglobulina G
<b>IL</b>	Àrea infralímbica de l'escorça prefrontal medial
<b>LC</b>	Locus coeruleus
<b>LDT</b>	Nucli laterodorsal tegmental
<b>mGluRs</b>	Receptors glutamatèrgics metabotròpics
<b>MK-801</b>	Dizocilpina
<b>MD</b>	Nucli mediodorsal del tàlem
<b>MM</b>	Nucli mamil·lar medial de l'hipotàlem
<b>MTt</b>	Feix mamil·lotalàmic
<b>NGF</b>	Factor de creixement nerviós
<b>NBM</b>	Nucli basal magnocel·lular
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>OFC</b>	Escorça prefrontal orbital (VLO+LO)
<b>PB</b>	Prosencèfal basal
<b>PF</b>	Nucli parafascicular
<b>PL</b>	Àrea prelímbica de l'escorça prefrontal medial
<b>PPT</b>	Nucli pedunculopòntic tegmental
<b>RD</b>	Rafe dorsal
<b>SCOP</b>	Escopolamina
<b>SI</b>	Substància innominada
<b>Syt</b>	Sinaptotagmina
<b>SM</b>	Septum medial
<b>TSPA</b>	Transmissió social de preferència alimentària
<b>VLO</b>	Àrea orbital ventrolateral de l'escorça prefrontal orbital
<b>VO</b>	Àrea orbital ventral de l'escorça prefrontal orbital

# Introducció



## I. INTRODUCCIÓ

L'objectiu general del treball de recerca presentat en aquesta tesi doctoral ha consistit en analitzar el substrat neural subjacent a l'aprenentatge de la **transmissió social de preferència alimentària (TSPA)**, una tasca d'aprenentatge relacional. Concretament, hem estudiat la participació de les projeccions colinèrgiques corticals del **nucli basal magnocel·lular (NBM)** en aquesta tasca. Per aquest motiu, s'han avaluat, en primer lloc, els efectes conductuals de l'estimulació elèctrica intracerebral (EIC) de l'NBM sobre l'adquisició i la retenció de la TSPA. En segon lloc, per poder determinar a través de quines àrees cerebrals l'EIC de l'NBM podria exercir el seu efecte modulador dels processos cognitius, s'han estudiat a nivell molecular, mitjançant l'anàlisi de l'expressió de la proteïna c-Fos, les àrees cerebrals activades pel tractament d'estimulació. Finalment, per confirmar la participació de les projeccions colinèrgiques corticals, s'han investigat els efectes del bloqueig amb escopolamina dels receptors muscarínics del **còrtex prelímbic (PL)**, una de les regions cerebrals diana activada durant el tractament d'EIC de l'NBM, en l'aprenentatge i la memòria de la TSPA.

Aquest objectiu experimental s'ha emmarcat dins les línies generals de recerca del nostre laboratori denominades *Mecanismos neurofisiológicos implicados en la reversión funcional, mediante estimulación eléctrica del cerebro, de alteraciones cognitivas en modelos animales de Alzheimer y amnesia diencefálica (BSO2002-03441)* i *Mecanismos neurofisiológicos implicados en la modulación de los procesos cognitivos complejos por los sistemas de arousal del prosencéfalo basal y el tálamocortical (SEJ2005-02518)* dirigides per la professora Margarita Martí Nicolovius. Aquestes línies d'investigació plantegen com una de les seves principals finalitats establir models de facilitació de l'aprenentatge i la memòria de diferents tipus de tasques mitjançant l'estimulació d'estructures que, com l'NBM, formen part dels sistemes neuromoduladors del cervell. Alhora que pretenen explorar els mecanismes neurofisiològics subjacents a la modulació dels processos cognitius complexos que exerceixen dos sistemes d'atenció i activació cerebral, el del prosencèfal basal i el tàlem cortical.

Els treballs d'aquesta tesi doctoral es presenten en forma de compendi de publicacions. El primer dels articles porta per títol *Effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on a socially transmitted food preference and c-Fos expression* i ha estat publicat a la revista *Learning and Memory* (2006), 13(6):783-93. En aquest treball s'han realitzat dos experiments en els quals s'han estudiat els efectes de l'EIC de l'NBM aplicada preentrenament sobre la TSPA, en dos intervals de retenció (immediat i 24 hores), i els

efectes d'aquest mateix tractament en l'activació de diferents àrees cerebrals mitjançant l'anàlisi de l'expressió de c-Fos. Els resultats mostren que l'EIC de l'NBM provoca un efecte facilitador de la TSPA en els dos intervals de retenció analitzats i un augment de l'expressió de c-Fos en diferents regions prefrontals i en algunes regions de la formació hipocampal.

El segon article, que porta per títol *Muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat prelimbic cortex impairs the social transmission of food preference* i ha estat publicat a la revista *Neurobiology of Learning and Memory* (2007), doi:10.1016/j.nlm.2006.12.003, té com objectiu principal avaluar l'efecte del bloqueig muscarínic preentrenament del còrtex PL sobre la TSPA. Els resultats d'aquest treball mostren un impediment sever de la retenció de la TSPA mesurada en dos intervals, immediatament i 24 hores després de l'entrenament.

La present tesi doctoral està organitzada en quatre seccions principals. En la primera part, es presenta el plantejament i els objectius generals dels diversos experiments realitzats emmarcats dins del context experimental en el qual s'inscriu la tesi. En segon lloc, s'exposa una revisió dels antecedents experimentals existents a la literatura científica referents a la tasca de TSPA, i a les estructures cerebrals NBM i PL. En concret, en aquest apartat es descriu, per una banda, el fenomen de la TSPA i les àrees cerebrals que s'han vist implicades en la seva adquisició i retenció, i per l'altra, les principals característiques neuroanatòmiques i neuroquímiques de l'NBM i el PL, així com la seva participació en la modulació de les funcions cognitives. En la tercera part, es presenten els dos treballs experimentals publicats acompanyats d'un breu resum dels objectius, de la metodologia utilitzada i dels principals resultats obtinguts. Finalment, es presenta un apartat de discussió final i de conclusions generals en el qual es realitza una anàlisi conjunta dels resultats obtinguts, englobant-los dins el marc general d'identificació i descripció de sistemes cerebrals implicats en la facilitació d'aprenentatges i la formació de memòries.

# Plantejament i Objectius

## II. PLANTEJAMENT i OBJECTIUS

L'**NBM** forma part del prosencèfal basal (PB) i proporciona la major font d'innervació colinèrgica a les àrees prefrontal, frontal i parietal del còrtex cerebral (Casamenti *i col.*, 1986; Johnston *i col.*, 1979; Kurosawa *i col.*, 1989; Lehmann *i col.*, 1980; Mesulam *i col.*, 1983b; Wenk *i col.*, 1980; Woolf *i col.*, 1983), alhora que envia extenses projeccions a l'amígdala (Mesulam *i col.*, 1983b). Una de les funcions generals atribuïdes a l'**NBM**, i especialment a les seves neurones colinèrgiques, és la modulació de les funcions cognitives (Everitt i Robbins, 1997; Gold, 2003; McGaughy *i col.*, 2002; Sarter *i col.*, 2003; Wenk, 1997). Nombrosos treballs proposen que les neurones colinèrgiques de l'**NBM** participen en la mediació dels processos atencionals (Baxter i Chiba, 1999; Chiba *i col.*, 1995; Gill *i col.*, 2000; Himmelheber *i col.*, 2000; Himmelheber *i col.*, 2001; Lehmann *i col.*, 2003; McGaughy *i col.*, 2002; Sarter *i col.*, 2001). No obstant, cada cop hi ha més evidències que impliquen també les projeccions colinèrgiques de l'**NBM** en funcions cognitives diferents de l'atenció i que poden ser categoritzades com a mnemòniques (Bailey *i col.*, 2003; Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Butt *i col.*, 2003; Chudasama *i col.*, 2004; Fine *i col.*, 1997; Ridley *i col.*, 2005; Ridley *i col.*, 1999; Vale-Martinez *i col.*, 2002a), recolzant estudis inicials que mostraven una contribució de l'**NBM** en l'aprenentatge i memòria. Malgrat tot, aquests primers estudis havien avaluat els efectes de les lesions inespecífiques de l'**NBM**, que danyen neurones colinèrgiques i no colinèrgiques, en tasques principalment espacials (p.ex., Langlais *i col.*, 1993; Wenk *i col.*, 1989).

La modulació dels processos d'**aprenentatge i memòria** per part de l'**NBM** i de l'acetilcolina (ACh) sembla estar estretament lligada al seu paper en la regulació de l'**activitat cortical** (Detari, 2000; Duque *i col.*, 2000; Semba, 2000) i en certes formes de **plasticitat sinàptica** (Mesulam, 2004; Rasmusson, 2000; Verdier i Dykes, 2001; Weinberger, 2003). Aquesta interrelació ha estat tradicionalment investigada mitjançant estudis de lesions de l'**NBM**. En aquest sentit, s'ha vist que les lesions colinèrgiques de l'**NBM** redueixen significativament l'activitat electroencefalogràfica (EEG) cortical (Berntson *i col.*, 2002) i alteren la morfologia de les dendrites del còrtex frontal (Works *i col.*, 2004) alhora que interrompen la reorganització del mapa cortical durant l'entrenament d'una resposta motora, impeding-ne el seu aprenentatge (Conner *i col.*, 2003). Tot i així, l'**EIC** de l'**NBM** també ha estat un mètode útil per a investigar la implicació funcional d'aquest nucli en els processos d'aprenentatge (Miasnikov *i col.*, 2006; Zhang *i col.*, 2005). L'estimulació de l'**NBM** provoca una activació generalitzada del còrtex concomitant a l'alliberació d'ACh cortical (Buzsaki *i col.*, 1988; Casamenti *i col.*, 1986; Jimenez-Capdeville *i col.*, 1997;

Kurosawa *i col.*, 1989; McLin *i col.*, 2002a; McLin *i col.*, 2003; Metherate i Ashe, 1991; Metherate *i col.*, 1992; Rasmusson, 2000) que correlaciona amb un millor processament d'informació sensorial (Bringmann i Klingberg, 1990; Edeline *i col.*, 1994; Hars *i col.*, 1993; Mercado *i col.*, 2001). A més, estudis electrofisiològics han mostrat que l'EIC de l'NBM indueix processos de plasticitat neuronal al còrtex similars als canvis plàstics que es produeixen en situacions naturals d'aprenentatge (Bakin i Weinberger, 1996; Bjordahl *i col.*, 1998; Dimyan i Weinberger, 1999; Kilgard i Merzenich, 1998; Kilgard *i col.*, 2001; Miasnikov *i col.*, 2006; Miasnikov *i col.*, 2001; Pandya *i col.*, 2005; Weinberger, 2003; Weinberger, 2004).

Malgrat tot, pocs treballs han avaluat les conseqüències, tant a nivell conductual com a nivell molecular, de l'EIC de l'NBM. Alguns estudis han mostrat que l'EIC de l'NBM aparellada amb un to indueix la formació de memòria associativa específica, mesurada per canvis conductuals, com el ritme cardíac i respiratori (McLin *i col.*, 2002b; McLin *i col.*, 2003; Miasnikov *i col.*, 2006). A més, l'EIC de l'NBM aplicada preentrenament també s'ha demostrat que facilita l'adquisició d'una tasca d'aprenentatge implícit, com l'evitació activa de dos sentits (EV2). En canvi, l'estimulació aplicada postadquisició té un efecte modulador, facilitador o impeditiu, de la retenció que depèn dels paràmetres d'estimulació usats. El tractament, però, no afecta la recuperació de la informació apresada si s'aplica immediatament abans de la sessió de retenció (Montero-Pastor *i col.*, 2004; Montero-Pastor *i col.*, 2001).

En aquest context, ens vam plantejar si l'estimulació de l'NBM aplicada preentrenament podria **modular altres tipus d'aprenentatges** i no només els implícits com l'EV2 i, en cas positiu, a través de quines **vies cerebrals** es podria produir aquesta modulació. Per aquest motiu, vam escollir la tasca de **TSPA**, una tasca de memòria relacional sensible a les lesions colinèrgiques de l'NBM (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a). La TSPA és una tasca social, olfactiva i no espacial (Alvarez *i col.*, 2002) en la qual una rata observadora interacciona amb una altra anomenada demostradora que prèviament ha menjat un aliment aromatitzat (Galef i Wigmore, 1983). La TSPA requereix l'associació natural entre dues olors ja que durant la interacció social els observadors associen l'olor de l'aliment amb un constituent de l'alè dels demostradors (Galef *i col.*, 1988), expressant la seva memòria a través d'un augment de la preferència per l'aliment que ha menjat el demostrador (Galef *i col.*, 1985). La TSPA presenta diferents característiques que fan que es defineixi com una forma de memòria relacional: la informació s'aprèn ràpidament fins i tot en un únic episodi, i implica l'expressió de la memòria en una situació d'elecció de menjar que és molt diferent del context social en el que es produeix l'episodi d'aprenentatge. A més, els subjectes observadors han de fer un

ús flexible de la informació olfactiva ja que només un dels dos estímuls que han format l'associació durant l'aprenentatge (l'aroma de l'aliment) és present en el test de preferències per poder guiar el comportament del subjecte. S'ha proposat, doncs, que l'expressió flexible de la memòria ha de ser considerada com una part inherent de l'execució de la TSPA (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995).

Posteriorment, per tal d'explorar les àrees cerebrals que podrien estar relacionades amb la millora de la TSPA, vam examinar l'expressió de la proteïna c-Fos en diferents àrees cerebrals després del tractament d'EIC de l'NBM. El gen de resposta immediata *c-fos* es considera un indicador d'activació neural involucrat en els canvis del funcionament cel·lular lligats a la plasticitat i a l'aprenentatge (Herdegen i Leah, 1998; Herrera i Robertson, 1996). Tot i que no es coneix exactament el mecanisme a través del qual aquest gen participa en les modificacions associades a l'activació neuronal, l'estudi de la seva expressió s'ha utilitzat àmpliament com a marcador d'activitat neuronal (Sagar *i col.*, 1988). A més, degut al fet que l'expressió basal de c-Fos cerebral és força baixa es pot considerar una mesura prou selectiva per estudiar l'activació neuronal després d'un estímul específic (Herdegen *i col.*, 1995; Morgan i Curran, 1991). No obstant, només un únic estudi ha caracteritzat la inducció de RNAm de *c-fos* al còrtex cerebral després de l'estimulació de l'NBM, però en aquest cas en resposta a la infusió unilateral d'àcid kaïníc a l'NBM (Wood i de Belleruche, 1991).

De les diferents àrees activades pel tractament d'EIC a l'NBM, vam considerar d'especial interès l'escorça prefrontal (EPF) ja que els dèficits cognitius observats en els diferents paradigmes d'aprenentatge després de la lesió de l'NBM s'atribueixen a una denervació colinèrgica cortical. Aquesta atribució és deguda al fet que els dèficits correlacionen amb la disminució dels marcadors colinèrgics en les dianes corticals de les neurones de l'NBM (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Muir *i col.*, 1994; Muir *i col.*, 1995). A més, les lesions de l'EPF reproduïen els efectes de les lesions de l'NBM (Dalley *i col.*, 2004b; Muir *i col.*, 1996). Per exemple, la depleció colinèrgica del còrtex orbitofrontal, la part més ventral de l'EPF, provoca dèficits en l'execució de la TSPA similars als dèficits observats després de la lesió colinèrgica de l'NBM (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a).

Un component de l'escorça prefrontal medial, el **còrtex PL**, podria ser una estructura diana de l'NBM candidata a mitjançar els efectes de les manipulacions d'aquest nucli sobre la TSPA. El PL es relaciona amb àrees implicades en el processament d'olors ja que rep projeccions des del bulb olfactiv (Neafsey *i col.*, 1986) i amb la consolidació de l'aprenentatge olfactiv ja que l'expressió de c-Fos augmenta en aquesta àrea després de l'entrenament d'una tasca de discriminació olfactiva (Tronel i Sara, 2002). Així mateix, el

PL rep aferències des de l'hipocamp i el subicle (revisat a Heidbreder i Groenewegen, 2003), el qual s'ha vist que és una de les àrees que s'activen durant el record de la TSPA poc després de l'entrenament (Ross i Eichenbaum, 2006). Tot i que no hi ha treballs que estudiïn la participació del PL a la TSPA, nombrosos estudis han senyalat la contribució d'aquesta àrea a diferents funcions necessàries per l'aprenentatge relacional com és la flexibilitat cognitiva (Dias i Aggleton, 2000; Ragozzino *i col.*, 1999a; Ragozzino *i col.*, 2003), la memòria de treball i l'atenció (Dalley *i col.*, 2004a), permetent així l'organització i l'expressió d'un comportament adaptatiu en circumstàncies noves (Dalley *i col.*, 2004b; Gisquet-Verrier i Delatour, 2006). D'especial rellevància per aquest treball és el fet que les infusions al PL d'escopolamina, un antagonista colinèrgic muscarínic, produeixen dèficits en l'execució d'una tasca que mesura atenció visual i memòria de treball, dèficits similars als que produeixen les lesions colinèrgiques de l'NBM (Chudasama *i col.*, 2004).

En aquest sentit, estudis amb escopolamina demostren que aquesta substància impedeix l'adquisició de nova informació i interromp el procés de consolidació de la memòria en humans (Broks *i col.*, 1988; Drachman i Leavitt, 1974; Jones *i col.*, 1979; Petersen, 1977) i, a més, perjudica l'execució de tasques que requereixen processos d'atenció sostinguda (Broks *i col.*, 1988; Colquhoun, 1962; Wesnes i Warburton, 1983; Wesnes i Warburton, 1984). En rosegadors, les infusions d'escopolamina en el còrtex prefrontal provoquen dèficits de memòria de treball (Granon *i col.*, 1995; Ragozzino i Kesner, 1998), memòria espacial (Nieto-Escamez *i col.*, 2002) i increment de respostes atencionals incorrectes (Williams *i col.*, 1999). A més, els ratolins genoanul·lats, *knock-out*, del receptor muscarínic M1 mostren dèficits pronunciats en la consolidació i alteracions de memòria de treball (Anagnostaras *i col.*, 2003). Aquests resultats, doncs, recolzen la idea que la activació colinèrgica muscarínica té un paper important en la regulació dels processos cognitius.

L'alteració de la funció colinèrgica també s'ha vist fortament implicada en el deteriorament de diferents formes de memòria olfactiva. Per exemple, les lesions colinèrgiques de diferents nuclis del PB produeixen dèficits en tasques olfactives com la TSPA i augmenten la generalització entre olors similars (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Linster *i col.*, 2001; Vale-Martinez *i col.*, 2002a). Així mateix, l'administració sistèmica o al bulb olfatori d'escopolamina deteriora també diverses tasques de base olfactiva com la discriminació olfactiva, l'habitució simple, l'aparellament demorat amb una olor i l'aprenentatge d'estratègies (De Rosa i Hasselmo, 2000; Fletcher i Wilson, 2002; Hunter i Murray, 1989; Ravel *i col.*, 1994; Ravel *i col.*, 1992; Saar *i col.*, 2001) sense afectar la sensibilitat olfactiva (Doty *i col.*, 2003). D'altra banda, l'administració sistèmica de fisostigmina, un inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa (l'enzim que degrada l'ACh),

augmenta la discriminació d'olors i millora l'aprenentatge d'estratègies olfactòries (Doty *i col.*, 1999), mentre que la infusió d'ACh directament al bulb olfactori produeix un augment immediat de la seva excitabilitat (Elaagouby *i col.*, 1991) que, a més, perdura en el temps (Elaagouby i Gervais, 1992). Aquests resultats experimentals evidencien, doncs, la implicació de les projeccions colinèrgiques en la modulació de la memòria olfactiva (Sanchez-Andrade *i col.*, 2005).

En resum, les dades presents a la literatura ens indiquen 1) que la deaferentització colinèrgica cortical de l'NBM impedeix una tasca explícita com la TSPA, 2) que l'EIC de l'NBM és capaç de facilitar tasques implícites com l'EV2, probablement incrementant l'alliberació d'ACh cortical i facilitant mecanismes de plasticitat sinàptica, 3) que el còrtex PL, una de les regions diana de les projeccions de l'NBM, és necessari per funcions implicades en l'adquisició de tasques relacionals, com la memòria de treball, la flexibilitat cognitiva i l'atenció, 4) que les projeccions colinèrgiques estan implicades en la modulació de la memòria olfactiva, i 5) que l'antagonisme muscarínic mitjançant la infusió d'escopolamina sistèmica o intracerebral és capaç d'impedir processos d'aprenentatge i memòria. Així doncs, tenint en compte aquests antecedents, en la present tesi doctoral ens vam plantejar la hipòtesi que **els receptors muscarínics del PL podrien participar en l'aprenentatge de la TSPA**. Per investigar aquesta hipòtesi ens vam plantejar els següents objectius generals:

1. Investigar si l'EIC de l'NBM aplicada preentrenament és capaç de facilitar l'aprenentatge de la TSPA, avaluada en dos intervals de retenció (immediat i 24 hores després de l'adquisició).
2. Analitzar l'expressió de c-Fos per identificar les regions cerebrals activades per l'estimulació elèctrica de l'NBM.
3. Avaluat si l'antagonisme muscarínic mitjançant la infusió d'escopolamina en una de les regions cerebrals activades durant l'EIC de l'NBM, el còrtex PL, impedeix l'aprenentatge de la TSPA.



**Antecedents Experimentals**

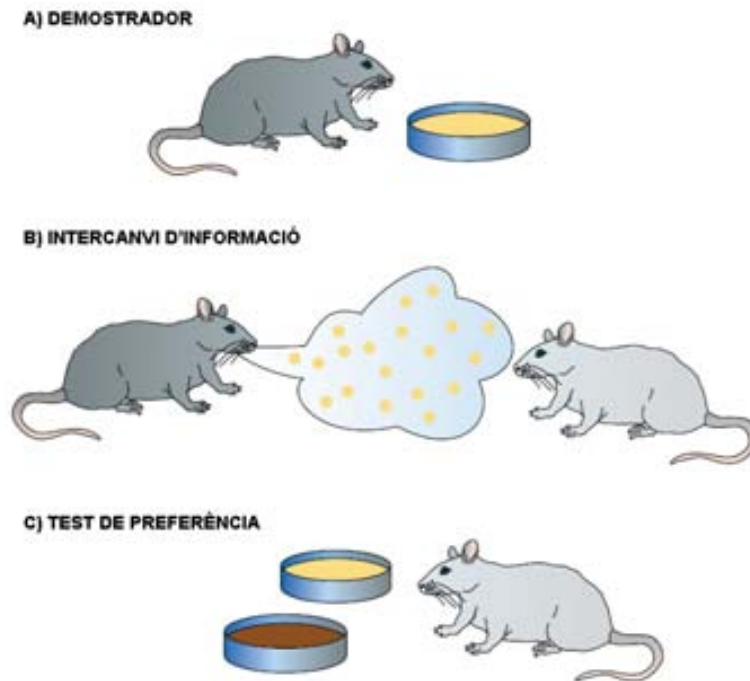
### III. ANTECEDENTS EXPERIMENTALS

## 1. LA TRANSMISSIÓ SOCIAL DE PREFERÈNCIA ALIMENTÀRIA I ELS SEUS CIRCUITS NEURALS

### 1.1 Transmissió Social de Preferència Alimentària

A la natura, quan un rosegador interacciona amb un membre de la mateixa espècie que acaba de menjar, preferirà posteriorment el mateix menjar que ha ingerit el seu igual. Es pensa que aquesta interacció i la posterior preferència del menjar els permet disminuir el risc de menjar nous aliments que podrien no ser segurs (Galef i Wigmore, 1983). Aquesta **Transmissió Social de Preferència Alimentària (TSPA)**, que ocorre de manera natural, pot ser estudiada en el laboratori permetent explorar els mecanismes cerebrals i els processos de comportament d'aquesta forma de memòria naturalista (revisat a Galef, 1990; Galef, 2005).

La TSPA va ser desenvolupada, per primera vegada, per l'equip de Bennett G. Galef l'any 1983 (Galef i Wigmore, 1983) i, de manera paral·lela i independent, Posadas-Andrews i Roper (Posadas-Andrews i Roper, 1983) van descriure el mateix fenomen. En aquests estudis, un subjecte interacciona amb un altre de la mateixa espècie (demostrador) que ha menjat recentment un aliment aromatitzat. Durant aquesta exposició, l'observador forma una associació entre l'olor de l'aliment aromatitzat i un component natural i volàtil de l'alè del demostrador, el disulfur de carboni (CS<sub>2</sub>) (Galef *i col.*, 1988). Posteriorment a aquest episodi d'aprenentatge social, els subjectes observadors escolliran menjar més quantitat d'aliment amb l'olor del que prèviament ha menjat el demostrador en preferència a un altre aliment amb una aroma diferent (Galef *i col.*, 1985) (Figura 1.1.1).



**Figura 1.1.1 Tasca de transmissió social de preferència alimentària.** A) Inicialment una rata demostradora menja un aliment aromatitzat. B) Després, durant la interacció social, el demostrador intercanvia informació sobre el menjar aromatitzat amb el subjecte observador. C) Seguidament, al subjecte observador se li dona a escollir, en un test de preferència, entre l'aliment aromatitzat que havia menjat el demostrador i un altre aliment aromatitzat. Modificat de Eichenbaum, 2000.

Els resultats dels primers treballs indicaven que l'observador utilitza senyals olfactoris emesos pels demostradors per identificar els aliments que aquest havia menjat, ja que la influència dels demostradors en la selecció de la dieta dels observadors es mantenia encara que durant el període d'interacció una xarxa impedis el contacte físic entre el demostrador i l'observador. En canvi, els observadors no desenvolupaven preferència per l'aliment que havia consumit el demostrador si estaven separats per una partició de Plexiglàs transparent que no permetia el pas de les olors (Galef i Wigmore, 1983). A més, els observadors als quals se'ls havia bloquejat el sentit de l'olfacte no adquirien la preferència per l'aliment que els demostradors havien consumit (Galef i Wigmore, 1983). Tot i així, l'augment de la preferència alimentària no era resultat d'una simple exposició a l'aroma sinó que calia l'olor associada a l'aliment més algun senyal produït pel demostrador (Galef *i col.*, 1985). Els subjectes observadors que simplement havien olorat un aliment no desenvolupaven la preferència per aquest, i sí que ho feien, en canvi, aquells subjectes que oloraven l'aliment que havia estat aplicat al cap d'una rata anestesiada (Galef *i col.*, 1985). Aquests resultats els van portar a aïllar el CS<sub>2</sub> de l'alè de la rata demostradora com l'element necessari perquè es produís l'associació. Rates exposades a un tros de cotó empolsat amb una dieta aromatitzada i humitejat amb unes gotes de solució de CS<sub>2</sub> diluït

mostraven un augment significatiu de la seva preferència per la mateixa dieta aromatitzada, fet que no succeïa si el cotó es mullava amb aigua destil·lada (Galef *i col.*, 1988). Els canvis en les preferències de la dieta dels observadors eren, doncs, resultat de l'exposició a la dieta en un context social i no a l'exposició de la dieta simplement.

La TSPA és suficientment robusta com per mitigar els efectes d'altres factors determinants en l'elecció de la dieta, com pot ser el seu sabor (Galef, 1989). Tot i així, l'efecte de la influència social depèn de la diferència en l'atractiu inicial dels aliments que s'ofereixen per escollir, és a dir, quan major sigui la diferència en quant a saborosos són els elements a escollir menor serà l'efecte del context social en l'elecció (Galef i Whiskin, 1998). L'augment de la preferència també es veu influenciat per la familiaritat de la dieta que hagin menjat els demostradors. Les rates observadores aprenen millor la preferència per una dieta no familiar que per una dieta familiar (Galef, 1993). A més, l'experiència individual de l'observador amb un menjar interfereix en la inducció social de la preferència per aquest menjar, com a mínim durant uns dies després que l'hagi consumit (Galef i Whiskin, 1994). Aquest fet suggereix que els rosegadors usen la informació social quan seleccionen nous aliments per incorporar-los a la seva dieta i, per tant, els permet expandir el seu repertori alimentari sense córrer el risc d'anar provant aliments que no hagin tastat abans (Forkman, 1991; Galef i Whiskin, 1994; Murttton, 1971).

La preferència d'una dieta adquirida en un context social no és transitòria sinó que es produeix de manera duradora i estable (Galef, 1989; Galef i Whiskin, 2003). Les rates poden recordar la preferència per un aliment almenys tres mesos després de l'aprenentatge fins i tot amb una única interacció de 10 minuts amb el demostrador (Clark *i col.*, 2002). A més, es manté tot i que l'animal rebi informació d'altres aliments durant l'interval entre l'aprenentatge social i la trobada de l'aliment (Galef *i col.*, 2005). Aquest fet fa que la tasca de TSPA sigui també un procediment adequat per estudis de memòria a llarg termini en rosegadors.

La influència social en la selecció de la dieta s'ha vist en una gran varietat de situacions: en rates de totes les edats, en ambdós sexes, en rates privades i no privades d'aliment, amb aliments líquids i sòlids, en parelles de demostrador-observador familiars i no familiars i en diferents soques de rates (Galef *i col.*, 1984; Grover *i col.*, 1988). Però no només les rates mostren un augment de la preferència per un aliment després d'haver interaccionat amb un demostrador que ha menjat recentment. També s'ha trobat en moltes altres espècies de rosegadors, incloent el ratolí (*Mus musculus*) (Valsecchi i Galef, 1989), l'esquirol de terra (*Spermophilus beldingi*) (Peacock i Jenkins, 1988), el jerbu petit de Mongòlia (*Meriones unguiculatus*) (Galef *i col.*, 1998; Valsecchi *i col.*, 1996), les rates-talp (*Heterocephalus glaber*) (Faulkes, 1999), el ratolí dels pins (*Microtus pinetorum*) (Solomon

*i col.*, 2002), l'hàmmster daurat (*Mesocricetus auratus*) i l'hàmmster rus (*Phodopus campbelli*) (Lupfer *i col.*, 2003). I en d'altres espècies d'animals com en l'ocell merla d'ales vermelles (*Agelaius phoeniceus*) (Mason *i col.*, 1984) i en gossos (*Canis lupus familiaris*) (Lupfer-Johnson i Ross, 2007). Tot i així, són molts menys els treballs que s'han fet amb aquests altres animals.

La TSPA s'ha de considerar com una forma de memòria relacional ja que mostra algunes de les característiques claus d'aquest tipus de memòria: la informació és apresada ràpidament en un únic episodi i requereix l'expressió de la memòria en una situació d'elecció de menjar que és molt diferent de l'episodi d'aprenentatge, que ocorre en un context social. A més, els subjectes observadors han de fer un ús flexible de la informació olfactiva ja que només un dels dos estímuls que han format l'associació durant l'aprenentatge (l'aroma de l'aliment) és present en el test de preferències per poder guiar el comportament del subjecte. Per aquest motiu, s'ha proposat que l'expressió flexible de la memòria ha de ser considerada com una part inherent de l'execució de la memòria en la TSPA (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995). Com altres aprenentatges relacionals, la TSPA és dependent d'hipocamp i àrees relacionades del lòbul temporal medial (veure apartat 1.2.1), tot i que no presenta un component espacial rellevant (Alvarez *i col.*, 2002). És a dir, el context espacial on es realitza el test no afecta l'execució de la tasca, suggerint que la memòria olfactiva no depèn d'una representació de l'entorn on s'ha fet l'entrenament. Així doncs, el requeriment crític de memòria en la TSPA suposa l'expressió flexible de l'associació apresada entre l'olor de l'aliment i el component de l'alè del demostrador i no implica la memòria del context espacial en el qual l'aprenentatge ha tingut lloc.

## 1.2 Circuits Neurals Implicats

### **1.2.1 Sistema Hipocampal**

L'hipocamp i les estructures anatòmicament relacionades (gir dentat, subicle, escorça entorrinal, peririnal i postrinal/parahippocampal) són importants per múltiples tasques de memòria en humans, mones i rosegadors (per exemple, Squire, 1992). En humans, es considera que aquestes estructures mitjancen la memòria anomenada declarativa, explícita o relacional (Schacter i Tulving, 1994; Squire, 1993). En canvi, en els animals no hi ha un acord general en el paper d'aquestes estructures. Una hipòtesi que ha tingut molta influència (Nadel, 1991; O'Keefe i Nadel, 1978) limita el paper de l'hipocamp en animals a la memòria espacial. Altres autors consideren, en canvi, que el paper de l'hipocamp s'estendria a altres aprenentatges no únicament espacials (Eichenbaum *i col.*, 1992; Sutherland i Rudy, 1989). En aquesta línia, varis estudis han mostrat que el dany a l'hipocamp, a les seves connexions o a estructures relacionades produeixen dèficits en tasques de memòria no espacial en les quals els animals han d'aprendre a codificar les relacions entre estímuls i / o mostrar flexibilitat de resposta durant l'expressió de la memòria (Alvarez *i col.*, 1995; Dusek i Eichenbaum, 1997; Dusek i Eichenbaum, 1998; Moyer *i col.*, 1990).

Degut al fet que la TSPA sembla ser una tasca relacional no espacial, nombrosos treballs han determinat el paper del sistema hipocampal en aquesta tasca realitzant diferents tipus de lesions abans i després de l'entrenament a diferents àrees de la formació hipocampal (hipocamp pròpiament, gir dentat i subicle). Winocur (1990) va mostrar per primera vegada que les lesions electrolítiques de l'hipocamp dorsal, practicades abans de l'entrenament, produïen un impediment en la retenció de la TSPA a partir de les 48 hores, però que no afectaven un test realitzat immediatament després de l'entrenament. Altres estudis han confirmat aquests resultats però amb algunes diferències quant a l'àrea afectada i al període de retenció. Per exemple, les lesions neurotòxiques preentrenament de l'hipocamp dorsal i ventral limitades a CA1, CA3 i gir dentat (GD) no causen impediment en la retenció de la TSPA avaluada 1 o 7 dies després de l'entrenament (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995) o només l'afecten lleugerament, en aquest cas a partir dels 4 dies després de l'entrenament (Winocur *i col.*, 2001). En canvi, si el dany preentrenament a l'hipocamp inclou, a més, el subicle dorsal i ventral, el dèficit és molt major (Alvarez *i col.*, 2001; Alvarez *i col.*, 2002; Bunsey i Eichenbaum, 1995; Clark *i col.*, 2002). En general, les lesions que afecten a tota la formació hipocampal causen dèficits quan s'avalua al subjecte en un test 1 o 2 dies després de l'aprenentatge, però no en un

test immediat. A diferència d'aquests resultats, Burton i col. (Burton *i col.*, 2000) no van observar dèficits en l'aprenentatge de la TSPA de subjectes amb grans lesions que incloïen tota la formació hipocampal en cap dels moments avaluats. Tot i així, aquest estudi mostra moltes diferències en el protocol de la tasca respecte els treballs que troben impediment i sembla que la baixa intensitat de l'entrenament inicial podria haver determinat aquests resultats contradictoris. Les diferències en l'entrenament de la TSPA en tots aquests treballs suggereixen que quant més duradores i repetides són les sessions d'entrenament major és l'aprenentatge de la preferència alimentària i la seva persistència (comparar Bunsey i Eichenbaum, 1995; Burton *i col.*, 2000; Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001).

Les manipulacions farmacològiques de l'hipocamp també afecten la retenció de la TSPA. En aquest sentit, s'ha observat que la infusió preentrenament d'APV (àcid D,L-2-amino-5-fosfonovaleric), antagonista dels receptors glutamatèrgics N-metil-D-aspartat (NMDA), a CA1 dorsal impedeix la TSPA en un test realitzat a les 24 hores i a les 72 hores (Roberts i Shapiro, 2002). A més, la injecció intraperitoneal preentrenament d'altres antagonistes del receptor NMDA com el CPP (àcid 3-(-2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfònic) i la dizocilpina (MK-801), provoca dèficits en la TSPA avaluada en un test a les 72 hores, però no als 15 minuts o a les 24 hores de l'aprenentatge (Roberts i Shapiro, 2002). S'ha de tenir en compte, però, que tot i que els receptors NMDA estan fortament concentrats a l'hipocamp, el fet que en aquests últims experiments s'hagin realitzat injeccions sistèmiques no permet concretar quines àrees cerebrals han estat afectades de manera crucial per causar el dèficit. Malgrat tot, aquests resultats indiquen que els receptors NMDA a l'hipocamp han d'estar actius durant l'entrenament de la TSPA per a la persistència de la preferència alimentària però no per a la seva adquisició.

A banda, diferents mutacions que afecten al funcionament de l'hipocamp també impedeixen la retenció de la TSPA. Els ratolins que els manca la subunitat NMDAR1, una subunitat clau del receptor NMDA, específicament a CA1, mostren dèficits en la TSPA en un test realitzat 24 hores després de l'entrenament (Rampon i Tsien, 2000). A més, s'ha observat que la sobreexpressió prèvia a l'entrenament a l'hipocamp dorsal i ventral d'una forma mutant de la proteïna CREB (proteïna d'unió a l'element de resposta a l'AMP cíclic) que no pot ser activada per fosforilació, impedeix un test als 11 dies, però no afecta a un test immediat (Brightwell *i col.*, 2005). En aquest sentit, l'expressió del gen de resposta primerenca *c-fos* també s'ha vist necessària per la memòria més a llarg termini de la TSPA ja que la inhibició preentrenament de la seva expressió a l'hipocamp dorsal i ventral, mitjançant la infusió d'una seqüència nucleotídica antisentit, no afecta a un test realitzat immediatament després de l'entrenament però sí que impedeix un test realitzat 14 dies després (Countryman *i col.*, 2005a).

Així mateix, els ratolins que només expressen el subtipus 1 del receptor metabotrópic del glutamat (mGluR1) al cerebel (mGluR1-*rescue*), i no a l'hipocamp, mostren impediment de la memòria de la TSPA en un test a les 24 hores però no en un test als 30 minuts (Kishimoto *i col.*, 2002). Malgrat tot, el fet que no expressin mGluR1 en cap àrea cerebral, excepte el cerebel, podria també explicar part dels dèficits a banda del paper de l'hipocamp. A més, l'alteració de les propietats de conductibilitat de les neurones piramidals de CA1, mitjançant la deleció de la subunitat Kvb1.1 dels canals de K<sup>+</sup> tipus A, també impedeix la TSPA 24 hores després de la interacció (Giese *i col.*, 1998). Kvb1.1 s'expressa de manera restringida al cervell (Rettig *i col.*, 1994), en el qual la seva màxima expressió es concentra a la regió CA1 de l'hipocamp i al nucli estriat (Butler *i col.*, 1998; Rettig *i col.*, 1994), no obstant, igual que en l'estudi anterior el fet que la deleció no sigui específicament a l'hipocamp no permet atribuir el dèficits exclusivament a una alteració hipocampal. En canvi, a diferència dels treballs anteriors, els ratolins que no expressen Thy1, una proteïna d'adhesió cel·lular que s'expressa fortament en neurones ja madures i l'absència de la qual provoca una excessiva inhibició GABAèrgica (GABA, àcid  $\gamma$ -aminobutíric) de la neurotransmissió específicament al GD, mostren dèficits en la TSPA, però en aquest cas, en un test realitzat immediatament després de l'entrenament (Mayeux-Portas *i col.*, 2000). Malgrat tot, per explicar les discrepàncies, s'haurien de considerar altres àrees extra-hipocampals o altres sistemes de neurotransmissió a part del GABAèrgic, a través de les quals l'absència de la Thy-1 també pogués haver afectat l'adquisició de la TSPA.

Per tant, resumint els resultats anteriors, sembla que les rates amb dany hipocampal preentrenament poden adquirir i recordar preferències alimentàries com una rata normal en intervals curts de temps però obliden més ràpidament a mesura que augmenta l'interval de temps entre l'aprenentatge i el test de preferència. Per tant, circuits extrahipocampals podrien estar més implicats en les primeres fases de la formació de la memòria tot i que la persistència de la mateixa sembla dependre de la formació hipocampal.

A banda, diferents treballs han avaluat els efectes de les lesions a la formació hipocampal produïdes després de l'entrenament. En general, les lesions postentrenament provoquen amnèsia retrògrada gradual, és a dir pèrdua de memòria de fets previs a la lesió, de manera que la informació adquirida recentment està més impedida que la informació més remota. En aquest sentit, Winocur *i col.* (Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001) van mostrar que les lesions electrolítiques de l'hipocamp dorsal immediatament, 1 o 2 dies després de la interacció social impediè el record de la TSPA, però que les lesions 5 dies després de l'aprenentatge ja no tenien efecte. No obstant, en el cas de les lesions



produïdes immediatament després de l'entrenament podria ser, però, que el simple trauma associat a qualsevol cirurgia cerebral fos suficient per fer oblidar experiències molt recents i que aquests resultats no fossin deguts a la lesió de l'hipocamp específicament. Així mateix, les lesions amb NMDA de l'hipocamp dorsal i ventral 1 o 2 dies després de l'entrenament també impedeixen el record de la TSPA, però, igual que en el treball anterior, les lesions practicades 5 dies després ja no tenen efecte (Winocur *i col.*, 2001). Altres estudis de lesions per aspiració de la formació hipocampal ventral i dorsal amplien el període d'afectació fins als 10 dies després l'entrenament, però el limiten abans dels 30 (Clark *i col.*, 2002). Seguint aquests resultats, un estudi recent mostra que la lesió per radiofreqüència de la formació hipocampal ventral i dorsal 1 dia després de la interacció social impedeix l'execució en un test als 30 dies, però en canvi no té efecte si la lesió es produeix als 21 dies de l'aprenentatge (Ross i Eichenbaum, 2006). Aquestes diferències en el marc temporal de la consolidació de la TSPA, sembla que serien degudes a l'extensió de la lesió. És a dir, el període de temps que es veu afectat per la lesió després de l'entrenament és més llarg quan major és el dany de la formació hipocampal.

En estudis farmacològics, en canvi, les injeccions intraperitoneals de CPP immediatament o 24 hores després de l'entrenament no tenen efectes en la retenció de la TSPA, en un test realitzat a les 72 hores (Roberts i Shapiro, 2002). Aquests estudis, indicarien, doncs, que els receptors NMDA serien necessaris en el moment de l'entrenament de la tasca, com mostren els resultats anteriors d'antagonisme preentrenament, però no sembla que la seva funció hagi d'estar disponible contínuament després de l'aprenentatge perquè la memòria de la TSPA es mantingui. Tot i així, algunes limitacions tècniques podrien explicar les diferències en els resultats entre aquest treball i els de lesions hipocampals postentrenament. El temps que passa entre la injecció de la droga i el bloqueig dels receptors NMDA juntament amb la breu durada de l'eficàcia del fàrmac podria permetre certa consolidació i per tant explicar la manca d'impediment.

Altres estudis han mostrat la implicació de l'hipocamp en la consolidació de la TSPA analitzant la seva activitat neural mitjançant l'expressió de c-Fos. Countryman *i col.* (2005b) van observar un augment de l'expressió de c-Fos en l'hipocamp, i especialment l'hipocamp ventral després de l'adquisició i el record de la TSPA. A més, segons l'expressió de c-Fos sembla que el subicle ventral també tindria un paper destacat en la TSPA ja que s'activa significativament durant un test just després de l'aprenentatge, però el seu nivell d'activació va disminuint progressivament amb el temps. Per contra, regions de l'escorça olfàctòria com són l'escorça piriforme, entorrinal i orbitofrontal mostren el patró invers augmentant la seva activació en diferents tests consecutius en el temps (Ross i Eichenbaum, 2006). De manera similar, les rates entrenades a la TSPA mostren un augment de la fosforilació de

CREB especialment en l'hipocamp ventral i de manera més marcada després del record de la tasca (Countryman *i col.*, 2005b). Per tant, segons aquests resultats, sembla que l'hipocamp dorsal i ventral podrien contribuir de manera diferencial en la codificació de diferents aspectes de la memòria, essent l'hipocamp ventral especialment rellevant per l'aprenentatge social (Countryman *i col.*, 2005b).

Altres treballs han relacionat la TSPA i l'hipocamp analitzant la neurogènesi en l'edat adulta. Les tasques d'aprenentatge dependents d'hipocamp modifiquen, augmenten o disminueixen depenent dels treballs, la vida mitjana de les noves neurones generades en el gir dentat (Ambrogini *i col.*, 2000; Ambrogini *i col.*, 2004; Dobrossy *i col.*, 2003; Gould *i col.*, 1999; Leuner *i col.*, 2004; Snyder *i col.*, 2005). L'entrenament a la TSPA també provoca canvis en la vida d'aquestes cèl·lules. Un sol dia d'entrenament provoca un augment de la supervivència d'aquestes neurones; en canvi, dos dies d'entrenament de TSPA la disminueix. Sembla que l'entrenament inicial augmentaria la supervivència de les cèl·lules granulars joves, però si l'entrenament continua provoca que aquestes morin (Olariu *i col.*, 2005).

En resum, doncs, diverses manipulacions experimentals aplicades pre- i post-entrenament han demostrat la implicació funcional de l'hipocamp en la TSPA (taules 1.2.1.1, 1.2.1.2 i 1.2.1.3). Tot i que els primers estudis van mostrar dèficits en la TSPA lesionant només l'hipocamp dorsal (Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001), estudis més precisos indiquen la implicació de tot l'hipocamp juntament amb les seves àrees relacionades (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995) en la consolidació o expressió de la TSPA. D'altra banda, el fet que els subjectes amb lesions hipocampals extenses puguin recordar la TSPA durant un curt període de temps (Bunsey i Eichenbaum, 1995; Clark *i col.*, 2002; Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001), suggereix que circuits extrahipocampals podrien ser rellevants per les primeres fases de la formació de la memòria de la TSPA.

ADQUISICIÓ I RETENCIÓ DE LA TSPA (Manipulacions preentrenament)

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
H dorsal	Lesió electrolítica	0 1 dia 2 dies 4 dies 8 dies	= = ↓ ↓ ↓	Winocur, 1990
H+ GD + S ventral i dorsal	Lesió àc. ibotènic	0 1 dia	= ↓	Bunsey i Eichenbaum, 1995
H + GD ventral i dorsal		0 1 dia	= =	
S ventral i dorsal		0 1 dia	= =	
H +GD+ S ventral i dorsal	Lesió àc. ibotènic	0 1 dia	= =	Burton <i>i col.</i> , 2000
H + GD ventral i dorsal	Lesió àc. ibotènic	15 min 7 dies	= =	Alvarez <i>i col.</i> , 2001
H +GD+ S ventral i dorsal	Lesió àc. ibotènic	15 min 7 dies	↓ ↓	
PHR	Lesió per aspiració	15 min 7 dies	↓ ↓	
H + S	Lesió àc. ibotènic	2.5 h	↓	Alvarez <i>i col.</i> , 2002
H +GD+ S Ventral i dorsal	Lesió àc. ibotènic	2 dies	↓	Clark <i>i col.</i> , 2002
H + GD ventral i dorsal	Lesió NMDA	0 2 dies 4 dies 8 dies	= = ↓ ↓	Winocur <i>i col.</i> , 2001
CA1	<i>Knock-out</i> NMDAR1	1 dia	↓	Rampon i Tsien, 2000
Inhibició GABAèrgica al GD	<i>Knock-out</i> Thy-1	0	↓	Mayeux-Portas <i>i col.</i> , 2000
Alteració neurones piramidals de CA1	Deleció Kvβ1.1	0 1 dia	= ↓	Giese <i>i col.</i> , 1998
Només s'expressa mGluR1 a les cèl·lules de Purkinje	mGluR1- <i>rescue</i>	30 min 1 dia	= ↓	Kishimoto <i>i col.</i> , 2002
H + GD ventral i dorsal	Infusió HSV-mCREB (sobrexpressió mutant de CREB)	0 11 dies	= ↓	Brightwell <i>i col.</i> , 2005
H + GD ventral i dorsal	Infusió de <i>c-fos</i> antisentit	0 14 dies	= ↓	Countryman <i>i col.</i> , 2005a
CA1 dorsal	Infusió: APV	24h 72 h	↓ ↓	Roberts i Shapiro, 2002
	Injecció i.p: CPP	15 min 24 h	= =	
	MK801	48 h	∇	
	(Antagonista R-NMDA)	72	↓	

**Taula 1.2.1.1 Efectes de diferents tractaments experimentals en diferents àrees de la formació hipocampal sobre l'adquisició i retenció de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [àc.: àcid, GD: Gir Dentat, H: hipocamp, i.p: intraperitoneal, PHR: regió parahipocampal, res. entr.: respecte entrenament, Syt IV: sinaptotagmina, S: Subicula] [0 immediatament, ↓ deteriora, = no afecta, ∇ tendència a deteriorar però no significativa].

CONSOLIDACIÓ DE LA TSPA (Manipulacions postentrenament)

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT MANIPULACIÓ (res. entr.)	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
H dorsal	Lesió electrolítica	0 2 dies 5 dies 10 dies	10 dies 12 dies 15 dies 20 dies	↓ ↓ = =	Winocur, 1990
H + GD ventral i dorsal	Lesió NMDA	1 dia 2 dies 5 dies 10 dies	11 dies 12 dies 15 dies 20 dies	↓ ↓ = =	Winocur <i>i col.</i> , 2001
H +GD+ S Ventral i dorsal	Lesió per aspiració	1 dia 10 dies 30 dies	11 dies 20 dies 40 dies	↓ ▽ =	Clark <i>i col.</i> , 2002
H +GD+ S Ventral i dorsal	Lesió per radiofreqüència	1 dia 21 dies	30 dies 30 dies	↓ =	Ross i Eichenbaum, 2006
	Injecció i.p: CPP MK801 (Antagonista R-NMDA)	0 1 dia	72 h	= =	Roberts i Shapiro, 2002

**Taula 1.2.1.2 Efectes de diferents tractaments experimentals en diferents àrees de la formació hipocampal sobre la consolidació de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball, en la columna "Moment Manipulació" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar la manipulació experimental i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [H: hipocamp, i.p: intraperitoneal, res. entr.: respecte entrenament, S: Subicle] [0 immediatament, ↓ deteriora, = no afecta, ▽ tendència a deteriorar però no significativa].

ESTRUCTURA	ÀNALISI	MOMENT ANÀLISI (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
H ventral	marcatge de pCREB	0 1 dia 2 dies	= = ↑	Countryman <i>i col.</i> , 2005b
GD ventral		0 1 dia 2 dies	↑ = ↑	
H dorsal		0 1 dia 2 dies	= = =	
GD dorsal		0 1 dia 2 dies	= = =	
H ventral	marcatge de c-Fos	0 1 dia 2 dies	↑ = ↑	
GD ventral		0 1 dia 2 dies	↑ = ↑	
H dorsal		0 1 dia 2 dies	= = =	
GD dorsal		0 1 dia 2 dies	= = =	

Subicle ventral	marcatge de c-Fos	0 1 dia 2 dies 21 dies	↑ ↑ = =	Ross i Eichenbaum, 2006
	marcatge de BrdU	1 sessió d'entrenament TSPA: 1 dia 3 dies 8 dies	= = ↑	Olariu <i>i col.</i> , 2005
		2 sessions d'entrenament TSPA: 3 dies (després de la segona sessió d'entrenament)	↓	
		2 sessions d'entrenament TSPA + 2 Tests: 3 dies (després de la segona sessió d'entrenament)	↓	

**Taula 1.2.1.3 Efectes de diferents àlisis en diferents àrees de la formació hipocampal sobre la consolidació de la TSPA.** En la columna "Anàlisi" s'indiquen els anàlisis específics de cada treball i en la columna "Moment de l'anàlisi" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar l'anàlisi. [BrdU: bromodeoxiuridina, H: hipocamp, pCREB: fosforilació de la proteïna d'unió a l'element de resposta a l'AMP cíclic, res. entr.: respecte entrenament][0 immediatament, ↑ augmenta, ↓ disminueix, = no afecta].

### 1.2.2 Prosencèfal Basal i Amígdala

El PB és una regió fonamentalment colinèrgica (Fibiger, 1982; Mesulam, 2004; Semba i Fibiger, 1989; Woolf, 1991) (veure apartat 2.1 per una descripció completa) i es considera un dels sistemes de neuromodulació del cervell. Molts estudis evidencien que el sistema colinèrgic central està críticament involucrat en el processament de senyals olfactoris i en la formació i el record de memòries de reconeixement social (Ferreira *i col.*, 2001; Gheusi *i col.*, 1994; Levy *i col.*, 1997; Perio *i col.*, 1989; Ravel *i col.*, 1994; Winslow i Camacho, 1995). Per aquest motiu, s'ha estudiat el paper del PB, i especialment de les seves neurones colinèrgiques, en la tasca de TSPA.

La majoria de treballs s'han realitzat mitjançant lesions colinèrgiques específiques utilitzant la immunotoxina colinèrgica 192 immunoglobulina G (IgG) saporina<sup>1</sup>. El primer estudi que va relacionar la TSPA i el PB va estudiar els efectes d'aquestes lesions colinèrgiques selectives produïdes abans de l'entrenament (Berger-Sweeney *i col.*, 2000). En aquest treball, es van realitzar lesions diferenciades de la part més rostral del PB (Septum Medial/Banda Diagonal de Broca branca vertical, SM/BDBV), les neurones colinèrgiques de la qual projecten principalment a l'hipocamp, i de la part més caudal (Nucli Basal Magnocel·lular/Substància Innominada, NBM/SI), que és una de les principals fonts d'ACh del neocòrtex. Ambdues lesions van impedir la retenció de la TSPA a les 24 hores, però no van afectar un test realitzat immediatament després de l'entrenament. Tot i així, la preferència pel menjar entrenat en el test a les 24 hores va correlacionar fortament amb l'activitat colinèrgica en el neocòrtex però no amb la de l'hipocamp, fet que suggereix que el sistema colinèrgic cortical podria ser més important que l'hipocampal en la adquisició o consolidació de les memòries socials relacionades amb la preferència alimentària. Malgrat tot, la preferència dels animals control per l'aliment entrenat en el test immediat en aquest estudi va ser més baixa que l'obtinguda en d'altres treballs (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995) fet que dificulta la interpretació dels resultats. A més, es van mostrar

---

<sup>1</sup> La 192 immunoglobulina G (IgG) saporina és un compost constituït per una molècula de saporina, toxina que inactiva els ribosomes cel·lulars, combinada amb un anticòs monoclonal pel receptor de baixa afinitat del factor de creixement nerviós p75 (p75 NGF). Un elevat percentatge de neurones colinèrgiques del PB, a diferència de les cèl·lules colinèrgiques d'altres regions cerebrals, expressen receptors de p75 NGF (Batchelor, *i col.*, 1989; Book, *i col.*, 1994). Per aquest motiu, utilitzant la immunotoxina 192 IgG-saporina es poden lesionar específicament les neurones colinèrgiques del PB, excepte les que projecten a l'amígdala.

diferències entre els animals lesionats i controls en el consum total d'aliment que podrien ser degudes a una alteració en la motivació per menjar.

Altres estudis que han realitzat lesions similars no han trobat, però, els mateixos resultats. Vale-Martinez *i col.* (2002a) mostra efectes diferenciats de les lesions colinèrgiques de SM/BDBv i NBM/SI. En aquest treball les lesions preentrenament de NBM/SI van impedir el test de preferència en tots els intervals de temps observats (test immediat, 24 hores i 3 setmanes), en canvi les lesions de SM/BDBv no van afectar cap d'aquests intervals. Per tant, aquest treball suggereix que les lesions a NBM/SI impedeixen l'adquisició i, per tant, la retenció de la TSPA i que, en canvi, les lesions en SM/BDBv no provocarien dèficits en l'adquisició ni en la memòria de la tasca. Les discrepàncies amb els resultats de Berger-Sweeney podrien ser degudes a diferències en el procediment de la tasca ja que el primer treball va realitzar un menor nombre d'interaccions entre la rata demostradora i l'observadora. Aquestes diferències permetrien observar els dèficits en la retenció de TSPA associats a la lesió de SM/BDBv, que no es mostrarien amb un major entrenament. Ambdós estudis, però, coincideixen en mostrar una correlació entre la preferència per l'aliment entrenat i l'activitat colinèrgica cortical. Aquest fet que suggereix que les projeccions colinèrgiques des de l'NBM/SI al neocòrtex estarien més involucrades en la formació de memòries socials relacionades amb la preferència alimentària que les projeccions des de SM/BDBv a l'hipocamp. Aquests resultats contrasten amb els treballs que mostren que el dany de la formació hipocampal abans de l'entrenament produeix dèficits importants en la retenció de la TSPA (veure apartat 1.2.1). Una possible explicació podria ser que les projeccions no colinèrgiques des de SM/BDBv a l'hipocamp, que no han estat danyades amb 192 IgG-saporina, serien suficients per mantenir la TSPA.

L'estudi de Vale-Martínez *i col.* (2002a) mostra, també, que quan les rates tenen experiència en la tasca prèvia a la lesió, les lesions del PB no produeixen dèficits en la TSPA ni immediatament ni 24 hores després de l'entrenament. Tot i així, si s'augmenta la dificultat de la tasca introduint un tercer aliment aromatitzat en el test d'elecció i per tant augmentant el nombre d'alternatives de resposta, s'observen lleugers dèficits en subjectes lesionats a NBM/SI quan s'avalua en un test a les 24 hores. Per tant, segons aquests resultats, sembla que la familiaritat i la dificultat de la tasca serien factors importants, indicant que un cop la tasca ha estat apresada, l'ACh del PB no seria crítica per establir noves memòries de TSPA si no és que les condicions d'aprenentatge canvien.

La funció del PB en la TSPA també s'ha vist necessària en estudis a més llarg termini. La infusió de 192 IgG-saporina intracerebroventricular en el període neonatal provoca degeneració del PB i dèficits de memòria de la TSPA en l'edat adulta, ja que quan els subjectes són adults mostren preferència per l'aliment entrenat en un test immediat,

però que obliden ràpidament ja que la preferència no es mostra 4 hores després de l'entrenament. Aquest dèficit mnemònic s'acompanya, alhora, d'una disminució dels marcadors colinèrgics al còrtex i a l'hipocamp i d'alteracions de l'EEG cortical (Ricceri *i col.*, 2004). Els resultats d'aquest treball, doncs, impliquen també el sistema colinèrgic del PB en la TSPA, malgrat que els resultats no coincideixen exactament amb els estudis anteriors. Per tant, sembla, que les lesions del PB produïdes neonatalment no tindrien els mateixos efectes sobre la memòria social en la vida adulta que les lesions realitzades un cop el subjecte és adult.

D'altra banda, s'ha realitzat un únic estudi sobre la participació del PB en la consolidació de la TSPA practicant lesions després de l'entrenament (Vale-Martinez *i col.*, 2002a). En aquest treball també s'observa un efecte diferenciat de les lesions colinèrgiques de SM/BDBv i NBM/SI. Els subjectes lesionats a SM/BDBv van mostrar dèficits en l'execució d'un test de TSPA quan la preferència per l'aliment havia estat adquirida 5 dies, però no 1 dia, abans de la lesió. A més, es va observar una correlació entre l'activitat colinèrgica hipocampal i la retenció de la preferència adquirida 5 dies abans de la lesió. Per tant, a diferència dels treballs de lesions hipocampals postadquisició (veure apartat 1.2.1), aquest treball suggereix que els animals lesionats a SM/BDBv tenen més problemes quan han de recordar fets produïts 5 dies abans de la lesió que 1 dia abans. No obstant, els treballs de lesions hipocampals postentrenament difereixen amb aquest en varis aspectes com són el tipus de lesions (colinèrgiques a SM/BDBv *versus* excitotòxiques o electrolítiques a l'hipocamp) i el disseny dels experiments, fet que limita les comparacions. D'altra banda, els subjectes amb lesions a NBM/SI postentrenament no van mostrar dèficits en la TSPA adquirida 1 o 5 dies abans de la lesió, no obstant, la seva execució va ser pitjor en el retest que en el test prelesió. Per tant, segons aquests resultats, i els obtinguts prèviament en els treballs de lesions preentrenament, sembla que el rol de les neurones colinèrgiques de NBM/SI seria més crític per l'adquisició de la TSPA que per la recuperació de la informació rellevant per la tasca. En canvi, les neurones colinèrgiques de SM/BDBv no semblen ser tan essencials per l'aprenentatge de la TSPA però sí que serien necessàries per la recuperació i/o la consolidació de la TSPA apresada abans de la lesió. Segons aquest punt de vista, les projeccions septohipocampals no colinèrgiques podrien recuperar nous aprenentatges de TSPA produïts després de la lesió colinèrgica però, en canvi, no podrien recuperar la TSPA apresada en presència d'aquestes neurones colinèrgiques intactes (taules 1.2.2.1 i 1.2.2.2).



ADQUISICIÓ I RETENCIÓ DE LA TSPA (Manipulacions preentrenament)

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
NBM/SI	Lesió 192 IgG-saporina	0 1 dia	= ↓	Berger-Sweeney <i>i col.</i> , 2000
SM/BDBv		0 1 dia	= ↓	
NBM/SI	Lesió 192 IgG-saporina	0 1 dia 3 setmanes	↓ ↓ ↓	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002a
SM/BDBv		0 1 dia 3 setmanes	= = =	
NBM/SI	Lesió 192 IgG-saporina (experiència prèvia amb la TSPA)	0 1 dia	= =	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002a
SM/BDBv		0 1 dia	= =	
NBM/SI	Lesió 192 IgG-saporina (experiència prèvia amb la TSPA i 3 opcions de resposta)	0 1 dia	= ∇	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002a
SM/BDBv		0 1 dia	= =	
PB	Infusió i.c.v. 192IgG-saporina ( 7 dies p.n.)	0 4 hores 1 dia (6 mesos p.n.)	= ↓ ↓	Ricceri <i>i col.</i> , 2004

**Taula 1.2.2.1. Efectes de diferents manipulacions experimentals en diferents àrees del PB sobre l'adquisició i retenció de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [BDBv: banda diagonal de Broca, branca vertical, i.c.v.: intracerebroventricular, NBM: Nucli Basal Magnocel·lular, p.n.: postnatal, res. entr.: respecte entrenament, SI: substància innominada, SM: Septum Medial] [0 immediatament, ↓ deteriora, = no afecta, ∇ tendència a deteriorar però no significativa].

CONSOLIDACIÓ DE LA TSPA (Manipulacions postentrenament)

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT MANIPULACIÓ (res. entr.)	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
NBM/SI	Lesió 192 IgG-saporina	1 dia 5 dies	11 dies 15 dies	∇ =	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002a
SM/BDBv		1 dia 5 dies	11 dies 15 dies	= ↓	

**Taula 1.2.2.2. Efectes de diferents tractaments experimentals en diferents àrees del PB sobre la consolidació de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball, en la columna "Moment Manipulació" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar la manipulació experimental i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [BDBv: banda diagonal de Broca, branca vertical, NBM: Nucli Basal Magnocel·lular, res. entr.: respecte entrenament, SI: substància innominada, SM: Septum Medial] [↓ deteriora, = no afecta, ∇ tendència a deteriorar però no significativa].

L'amígdala basolateral (ABL) és una de les àrees que rep denses projeccions colinèrgiques del PB (veure apartat 2.1), i en rosegadors, es considera un dels principals nuclis receptors d'informació olfactiva i gustativa ja que rep aferències olfactives des de l'escorça piriforme i gustatives des del nucli parabraquial i des del còrtex insular (Pare, 2003). No obstant, la seva implicació en la TSPA ha estat poc estudiada i alhora contradictòria (Burton *i col.*, 2000; Wang *i col.*, 2006). El primer treball que va relacionar l'amígdala i la TSPA va ser el realitzat per Burton *i col.* (2000). En aquest estudi, les lesions preentrenament amb àcid ibotènic de tots els nuclis de l'amígdala no van provocar dèficits ni en un test realitzat immediatament després de l'entrenament ni 24 hores després. En canvi, els resultats observats en un treball recent indiquen la implicació de la ABL en l'adquisició de la TSPA (Wang *i col.*, 2006). En aquest darrer treball, la inactivació farmacològica de l'ABL mitjançant la infusió de muscimol, un agonista GABAèrgic, prèvia a l'entrenament va impedir la TSPA avaluada en un test realitzat 24 hores i 7 dies després de l'entrenament. No obstant, els subjectes que van rebre infusions de muscimol abans de la sessió de test a les 24 hores, i no en la sessió d'interacció, van mostrar una memòria normal de la TSPA tant en aquest mateix test com en el test realitzat 7 dies després. Per aquest motiu, els autors conclouen que l'ABL és necessària per l'adquisició de la TSPA però no per la seva retenció.

La divergència d'aquests resultats respecte els obtinguts per Burton *i col.* (2000) podria ser deguda a la diferència entre la inactivació de l'ABL i la lesió amb àcid ibotènic d'una major extensió de l'amígdala. Una altra explicació podria ser que en el treball de Burton *i col.* (2000) les parelles demostrador-observador interaccionen varies vegades abans de l'entrenament per tal que es familiaritzin un amb l'altre i, a més, cada observador realitza 4 sessions de test cadascuna amb una parella d'olors diferents. La realització d'interaccions prèvies a l'entrenament i per tant, l'exposició repetida a l'estímul CS<sub>2</sub>, podria haver reduït l'eficàcia d'aquest estímul alhora de guiar l'aprenentatge (Wang *i col.*, 2006). És possible, doncs, que l'aprenentatge dels animals no hagi estat suficient com per detectar dèficits induïts per la lesió de l'ABL. Una dada que podria recolzar aquesta interpretació, és que el percentatge de preferència dels animals controls és més baix que l'observat en altres treballs (veure Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995; Clark *i col.*, 2002). Per tant, segons les dades més recents, l'ABL participaria en l'adquisició de la TSPA (taules 1.2.2.3 i 1.2.2.4).

**ADQUISICIÓ I RETENCIÓ DE LA TSPA (Manipulacions preentrenament)**

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
ABL, ABM, ACE, LA	Lesió àc. ibotènic	0 1 dia	= =	Burton <i>i col.</i> , 2000
ABL	Infusió muscimol	1 dia 7 dies	↓ ↓	Wang <i>i col.</i> , 2006

**Taula 1.2.2.3 Efectes de diferents manipulacions experimentals en l'amígdala sobre l'adquisició i retenció de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [ABL: amígdala basolateral, ABM: amígdala basomedial, ACE: amígdala central, LA: amígdala lateral, res. entr.: respecte entrenament] [0 immediatament, ↓ deteriora, = no afecta].

**CONSOLIDACIÓ DE LA TSPA (Manipulacions postentrenament)**

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT MANIPULACIÓ (res. entr.)	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
ABL	Infusió muscimol	1 dia	1 dia 7 dies	= =	Wang <i>i col.</i> , 2006

**Taula 1.2.2.4 Efectes de diferents tractaments experimentals en l'amígdala sobre la consolidació de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball, en la columna "Moment Manipulació" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar la manipulació experimental i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [ABL: amígdala basolateral, res. entr.: respecte entrenament] [= no afecta].

### 1.2.3 Escorça Frontal

El lòbul frontal està constituït per l'escorça motora primària, l'escorça motora d'associació i, rostral a aquestes àrees, l'EPF. Les escorces motores participen en la selecció i generació de moviments, mentre que la prefrontal està principalment implicada en processos cognitius i motivacionals/emocionals, i presenta unes fronteres anatòmiques imprecises en les diverses espècies de mamífers (Fuster, 1997).

Una primera aproximació per estudiar la participació de l'escorça frontal en la TSPA va ser el treball realitzat per Winocur i Moscovitch (1999) en el qual van mostrar que les lesions per aspiració del còrtex frontal, tant prèvies com posteriors a l'entrenament, no impedièn la TSPA quan només es presentaven dos aliments aromatitzats en el test d'elecció. En canvi, si s'introduïa una tercera opció de resposta en el test, les lesions preentrenament de l'escorça frontal impedièn la TSPA a partir de 4 dies des de l'entrenament, però no abans, i el dèficit augmentava quan major era l'interval de temps entre l'entrenament i el test. D'altra banda, les lesions produïdes després de l'entrenament, en qualsevol interval de temps, també van afectar la TSPA en aquest test de triple elecció. Malgrat tot, el dany en l'escorça frontal en aquest estudi era considerablement gran incloent l'escorça motora primària i secundària i amb part del còrtex cingulat per tant és difícil determinar els efectes concrets de cada àrea frontal.

Més recentment, Ross *i col.* (2005) s'han centrat en el paper de l'EPF en la TSPA. L'EPF és una de les principals àrees de projecció colinèrgica del PB (Luiten *i col.*, 1987; Wainer i Mesulam, 1990) i per tant susceptible a contribuir en la formació de la TSPA (veure 1.2.2). Malgrat tot, la seva implicació en la TSPA ha estat poc estudiada. En aquest treball, Ross *i col.* (2005) van demostrar que la depleció colinèrgica preentrenament restringida al còrtex orbitofrontal, la part més ventral de l'EPF, impedia la TSPA en un test realitzat 2 dies després de l'entrenament (taules 1.2.3.1. i 1.2.3.2). Aquests resultats impliquen, doncs, l'ACh del còrtex orbitofrontal en l'adquisició i/o el record de la preferència alimentària, però altres àrees corticals podrien ser rellevants per la TSPA. En aquest sentit, un estudi recent analitza els patrons d'activació del gen de resposta primerenca *c-fos* en regions corticals olfactòries com l'escorça orbitofrontal, piriforme i entorrinal, mostrant un activació creixent d'aquestes àrees en tests successius respecte l'entrenament, patró invers al que presentava la regió hipocampal en aquest mateix estudi (veure apartat 1.2.1) (Ross i Eichenbaum, 2006). Així doncs, aquests resultats confirmarien el paper de l'escorça orbitofrontal en el record de la TSPA però, alhora suggereixen que altres àrees corticals podrien ser necessàries per la expressió de la TSPA.

ADQUISICIÓ I RETENCIÓ DE LA TSPA (Manipulacions preentrenament)

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
Escorça Frontal	Lesió per aspiració	0 2 dies 8 dies	= = =	Winocur i Moscovitch, 1999
Escorça Frontal	Lesió per aspiració (3 opcions de resposta)	0 1 dia 2 dies 4 dies 8 dies	= = = ↓ ↓	Winocur i Moscovitch, 1999
OFC	Infusió 192IgG-saporina	2 dies	↓	Ross <i>i col.</i> , 2005

**Taula 1.2.3.1 Efectes de diferents manipulacions experimentals en diferents àrees de l'escorça frontal sobre l'adquisició i retenció de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [OFC: escorça prefrontal orbital, res. entr.: respecte entrenament] [0 immediatament, ↓ deteriora, = no afecta].

CONSOLIDACIÓ DE LA TSPA (Manipulacions postentrenament)

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT MANIPULACIÓ (res. entr.)	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
Escorça Frontal	Lesió per aspiració	2 dies 5 dies 10 dies	12 dies 15 dies 20 dies	= = =	(Winocur i Moscovitch, 1999)
Escorça Frontal	Lesió per aspiració (3 opcions de resposta)	1 dia 2 dies 5 dies 10 dies	11 dies 12 dies 15 dies 20 dies	↓ ↓ ↓ =	(Winocur i Moscovitch, 1999)

**Taula 1.2.3.2 Efectes de diferents manipulacions experimentals en diferents àrees de l'escorça frontal sobre la consolidació de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball, en la columna "Moment de la Manipulació" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [res. entr.: respecte entrenament] [↓ deteriora, = no afecta].

### 1.2.4 Diencèfal

El diencèfal està format principalment pel tàlem i l'hipotàlem, estructures que projecten fortament a l'escorça prefrontal, fet que ha afavorit l'estudi de la seva implicació en la TSPA.

Hi ha pocs treballs que estudiïn la contribució del tàlem en la TSPA però, tenint en compte els seus resultats, sembla que els diferents **nuclis talàmics** no contribuirien de la mateixa manera en la TSPA (taules 1.2.4.1 i 1.2.4.2). Les rates amb el nucli mediodorsal (MD) del tàlem lesionat electrolíticament abans de l'entrenament poden adquirir i recordar la tasca, en canvi, les lesions postentrenament afecten al record de la TSPA quan es produeixen immediatament després de la interacció social, però no més tard (Winocur, 1990). Malgrat tot, igual que en el cas de les lesions hipocampals produïdes immediatament després de l'entrenament (Winocur, 1990), podria ser que el simple trauma associat a la cirurgia cerebral fos suficient per fer oblidar les experiències més recents.

D'altra banda, les lesions preentrenament amb NMDA del nucli parafascicular (PF), estructura que forma part dels nuclis intralaminars del tàlem, sí que provoquen dèficits en la TSPA tant en un test immediat com en un test 24 hores després de l'entrenament (Quiroz-Padilla *i col.*, 2006), suggerint que aquest nucli podria modular l'adquisició de la TSPA probablement a través de les seves connexions al còrtex prefrontal. A més, la manca de diferència entre els subjectes lesionats i els controls en paràmetres com la percepció olfactiva, la neofòbia, la motivació per menjar, l'exploració i el grau d'interacció amb el demostrador durant l'entrenament confirma que el dèficit observat en la TSPA després de la lesió del PF és realment cognitiu.

El paper de l'hipotàlem en la TSPA també ha estat poc estudiat i s'ha centrat especialment en els cossos mamil·lars. En aquest sentit, Radyushkin *i col.* (2005) van mostrar que ratolins mutants que no desenvolupen el nucli mamil·lar medial (MM) i el feix mamil·lotalàmic (MTt), no mostren dèficits en la TSPA. Tot i que els **cossos mamil·lars** tenen connexions anatòmiques via fòrnix amb l'hipocamp (Aggleton i Brown, 1999; Aggleton i Saunders, 1997; Sziklas i Petrides, 1993; Tonkiss i Rawlins, 1992) i formen part d'un circuit cerebral que implica el nucli talàmic anterior i el còrtex prefrontal medial (Gonzalo-Ruiz *i col.*, 1992), els resultats suggereixen que la seva manca no produeix els dèficits en la TSPA que causen les lesions a l'hipocamp o a l'escorça prefrontal.

**ADQUISICIÓ I RETENCIÓ DE LA TSPA (Manipulacions preentrenament)**

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
MD	Lesió electrolítica	0 1 dia 2 dies 4 dies 8 dies	= = = = =	Winocur, 1990
PF	Lesió amb NMDA	0 1 dia	↓ ↓	Quiroz-Padilla <i>i col.</i> , 2006
MM MTt	Mutació <i>Foxb1</i>	1 dia	=	Radyushkin <i>i col.</i> , 2005

**Taula 1.2.4.1 Efectes de diferents manipulacions experimentals en diferents àrees diencefàliques sobre l'adquisició i retenció de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [MD: nucli mediodorsal del tàlem, MM: nucli mamil·lar medial, MTt: feix mamil·lotalàmic, PF: nucli parafascicular, res. entr.: respecte entrenament] [0 immediatament, ↓ deteriora, = no afecta].

**CONSOLIDACIÓ DE LA TSPA (Manipulacions postentrenament)**

ESTRUCTURA	MANIPULACIÓ	MOMENT MANIPULACIÓ (res. entr.)	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
MD	Lesió electrolítica	0 2 dies 5 dies 10 dies	10 dies 12 dies 15 dies 20 dies	↓ = = =	Winocur, 1990

**Taula 1.2.4.2. Efectes de diferents manipulacions experimentals en el nucli MD del tàlem sobre la consolidació de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball, en la columna "Moment Manipulació" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar la manipulació experimental i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [MD: nucli mediodorsal del tàlem, res. entr.: respecte entrenament] [↓ deteriora, = no afecta].

### 1.2.5 Altres Estudis

Diversos estudis de TSPA han estat realitzats modulant l'expressió de **galanina**, un neuropèptid amb múltiples accions inhibidores en la neurotransmissió i la memòria (Hokfelt *i col.*, 2000; Kask *i col.*, 1995), els receptors del qual es troben distribuïts en regions cerebrals que regulen els processos cognitius, com són el PB, l'hipocamp i el còrtex (Branchek *i col.*, 2000; O'Donnell *i col.*, 1999). El rol de la galanina en la cognició és d'interès clínic ja que la seva expressió en el PB augmenta notablement en la malaltia d'Alzheimer (Bowser *i col.*, 1997; Chan-Palay, 1988; Mufson *i col.*, 1993) i sembla que aquesta sobreexpressió contribuiria als dèficits cognitius característics d'aquesta malaltia (Counts *i col.*, 2001; Crawley i Wenk, 1989; Wrenn *i col.*, 2002). Diversos estudis han demostrat que la sobreexpressió de galanina en ratolins transgènics (GAL-tg) provoca un impediment de la memòria de la TSPA (Steiner *i col.*, 2001; Wrenn *i col.*, 2003; Wrenn *i col.*, 2002, veure Rustay *i col.*, 2005). Tot i que no s'observa cap correlació entre la concentració de galanina hipocampal i la TSPA, sí que s'ha observat una correlació negativa entre la concentració de galanina cortical i la TSPA en funció del protocol de la tasca utilitzat (Wrenn *i col.*, 2002). Segons Wrenn *i col.* (2003), l'impediment de la TSPA observat en els ratolins GAL-tg seria atribuïble als efectes inhibitoris de galanina sobre la funció colinèrgica ja que, entre d'altres efectes, inhibeix l'alliberament d'ACh. Tot i així, sembla que els receptors de la galanina tipus 1 no serien necessaris per la TSPA ja que ratolins que no expressen aquest receptors no mostren dèficits en la tasca (Wrenn *i col.*, 2004) (veure Rustay *i col.*, 2005). Fins el moment, però, no es coneix la implicació dels altres dos tipus de receptors de la galanina, el tipus 2 i el tipus 3.

Altres treballs s'han centrat en el paper de la **vasopressina** en la modulació de la TSPA (Strupp *i col.*, 1990), demostrant que la injecció subcutània d'aquesta hormona modula la TSPA en funció del grau de record que els subjectes presenten. La injecció de vasopressina just abans del test millora el record en condicions en les quals els subjectes controls mostren un record pobre, és a dir, quan hi ha hagut un llarg període de temps entre l'entrenament i el test. En canvi, el tractament impedeix la TSPA en condicions on els subjectes controls mostraven un bon record de la tasca, quan l'interval de retenció és curt.

D'altra banda, Sanchez-Andrade *i col.* (2005) han relacionat la TSPA amb la fluctuació de les **hormones sexuals** durant el cicle ovàric, demostrant una millora de l'aprenentatge durant la fase de proestre, probablement degut als canvis en els estrògens que es produeixen durant aquest període. Sembla, doncs, que la formació de la memòria olfactiva estaria facilitada en les femelles quan estan actives reproductivament.



Altres autors han avaluat la implicació de la proteïna **CREB**, un factor de transcripció important en la formació de la memòria a llarg termini, en la TSPA (veure apartat 1.2.1). En aquest sentit, s'ha observat que els ratolins que expressen una forma mutant de CREB presenten dèficits en la TSPA en un test a les 24 hores, però no en un test immediat (Kogan *i col.*, 1997), resultats que coincideixen amb els observats amb les manipulacions específiques de CREB a l'hipocamp (Brightwell *i col.*, 2005). En canvi, un estudi realitzat per Gass *i col.* (1998) utilitzant ratolins amb la mateixa mutació de CREB no mostra aquests dèficits, discrepància que els autors atribueixen a diferències en el *background* genètic dels animals ja que en aquest treball, a diferència de l'anterior, només es van utilitzar individus híbrids de primera generació (F1).

Per altra banda, Ruiz-Opazo *i col.* (2004) han demostrat la modulació de l'aprenentatge i la memòria de la TSPA a través de la **ingesta de sal** a la dieta. La restricció de sal produeix un dèficit sever en la tasca de TSPA en rates Dahl S (model de rates sensibles a la sal per desenvolupar hipertensió), les quals són incapaces de recordar el menjar entrenat, fins i tot després de breus intervals de retenció. Malgrat tot, no està clar el mecanisme a través del qual la ingesta de sal a la dieta modula l'aprenentatge de la TSPA tot i que sembla que el receptor de la Angiotensina II a través de la via de senyalització CREB-AMPC hi podria participar.

A banda, altres autors han estudiat la implicació de la proteïna **sinaptotagmina IV** (Syt IV), una proteïna de les vesícules sinàptiques, en la TSPA. Els ratolins mutants per Syt IV mostren dèficits en la TSPA en un test realitzat 24 hores després de l'entrenament però no en un test immediat (Ferguson *i col.*, 2000). La Syt IV s'expressa de manera basal al cervell, i la seva expressió s'indueix fortament després d'un tractament sistèmic d'àcid kaínic a l'escorça piriforme i a l'hipocamp (Vician *i col.*, 1995), per aquest motiu els autors suggereixen que els dèficits podrien ser deguts a una afectació hipocampal però no descarten que altres estructures també siguin responsables del dèficit.

Els resultats d'aquest conjunt d'estudis es resumeixen a la taula 1.2.5.1.

**ADQUISICIÓ I RETENCIÓ DE LA TSPA (Manipulacions preentrenament)**

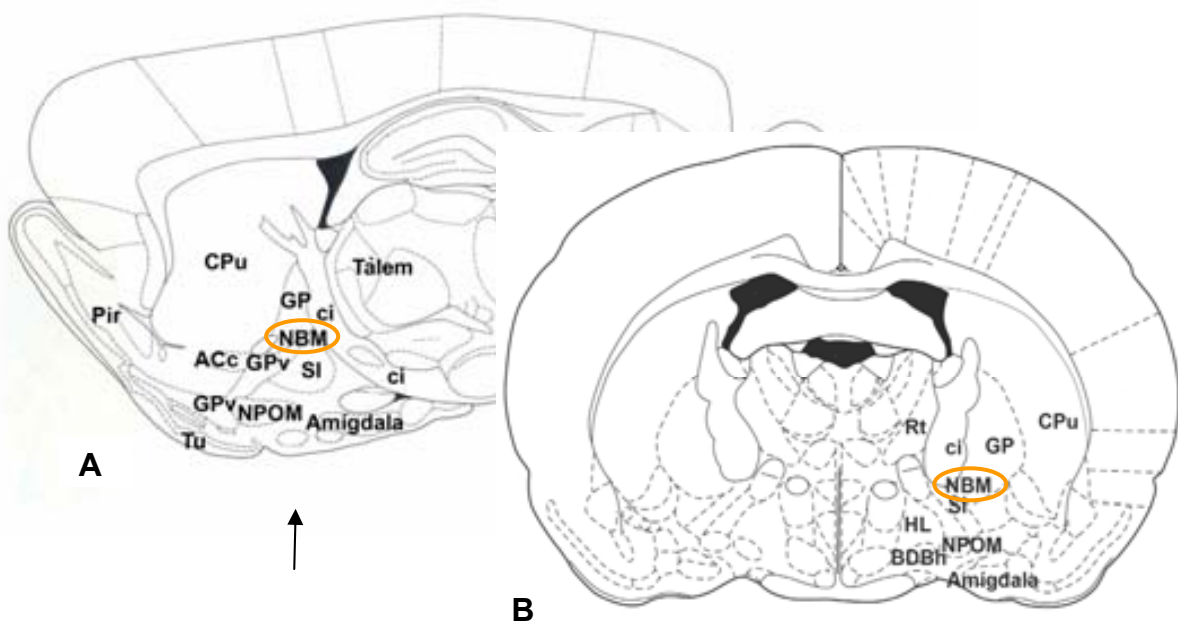
MANIPULACIÓ	MOMENT TEST (res. entr.)	RESULTATS	ESTUDIS
Ratolins GAL-tg	1 dia	↓	Steiner <i>i col.</i> , 2001
Ratolins GAL-tg	1 dia	↓	Wrenn <i>i col.</i> , 2002
Ratolins GAL-tg	1 dia	↓	Wrenn <i>i col.</i> , 2003
<i>Knock-out</i> GAL-R1	1 dia	=	Wrenn <i>i col.</i> , 2004
Injecció subcutània de AVP <sub>4-9</sub>	8 10 14	↓ = ↑	Strupp <i>i col.</i> , 1990
Rates en el període proestre	1 dia	↑	Sanchez-Andrade <i>i col.</i> , 2005
Mutació CREB <sup>αΔ-</sup>	0 1 dia	= ↓	Kogan <i>i col.</i> , 1997
Mutació CREB <sup>αΔ-</sup>	1 dia	=	Gass <i>i col.</i> , 1998
Restricció de sal en rates Dahl S	5 min 3 hores 1 dia	↓ ↓ ↓	Ruiz-Opazo <i>i col.</i> , 2004
<i>Knock-out</i> Syt IV	0 1 dia	= ↓	Ferguson <i>i col.</i> , 2000

**Taula 1.2.5.1 Efectes de diferents manipulacions experimentals sobre l'adquisició i retenció de la TSPA.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les manipulacions experimentals específiques de cada treball i en la columna "Moment del Test" s'indica el temps respecte l'entrenament en el qual es va realitzar el test. [min: minut, res. entr.: respecte entrenament] [0 immediatament, ↓ deteriora, ↑ millora, = no afecta].

## 2. NUCLI BASAL MAGNOCEL·LULAR

### 2.1 Neuroanatomia i Neuroquímica

L'**NBM** forma part del PB, regió localitzada a la base del cervell, en posició anterior a l'hipotàlem i ventral als ganglis basals. A nivell frontal, limita amb el tubercle olfatori i el nucli *accumbens* i lateralment amb el complex amigdaloide i el còrtex piriforme (Detari *i col.*, 1999; Semba, 2000). El PB està constituït per tres grans àrees: la primera, localitzada més rostralment, és l'àrea septal medial (ASM) i inclou el SM i la BDBv. La segona regió està formada per la branca horitzontal de la banda diagonal de Broca (BDBh) i el nucli preòptic magnocel·lular (Givens i Sarter, 1997; Semba, 2000; Wenk, 1997; Woolf, 1991). La tercera, la més caudal, correspon a l'**NBM** i inclou també la SI i el globus pàlid ventral (Figura 2.1.1). L'organització anatòmica del PB és similar entre espècies animals, tot i que existeixen certes diferències sobretot en l'**NBM**. En les rates i els gats, l'**NBM** és més difús (Szymusiak, 1995) en comparació als primats i als humans, en els quals aquest nucli es denomina nucli basal de Meynert (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Mesulam, 1995a; Mesulam, 1995b).



**Figura 2.1.1 Localització anatòmica de l'NBM i de les principals estructures circumdants.** En una secció sagital (2.40 mm lateral a Bregma) (A) i en una coronal (1.30 mm posterior a Bregma) (B) del cervell de rata. [Acc: nucli acumbens, *cuore*; BDBh: Banda Diagonal de Broca, branca horitzontal; ci: capsula interna; CPu: nuclis caudat i putamen; GP: globus pàlid; GPv: globus pàlid ventral; HL: hipotàlem lateral; NBM: nucli basal magnocel·lular; NPOM: nucli preòptic magnocel·lular; Pir: còrtex piriforme; Rt: nucli reticular talàmic; SI: substància innominada; Tu: tubercle olfatori]. Modificat de Paxinos i Watson, 1997.

L'NBM està format per una població heterogènia de neurones tant per la seva morfologia com per el seu contingut de neurotransmissors. No obstant, des de principis dels anys 80 s'ha considerat una regió fonamentalment **colinèrgica** (Fibiger, 1982; Mesulam, 2004; Semba i Fibiger, 1989; Woolf, 1991). Estructuralment, les neurones colinèrgiques es caracteritzen per la seva grandària (magnocel·lulars) i per tenir llargs axons i extensos arbres dendrífics. Aquestes cèl·lules formen una constel·lació neuronal al llarg de tots els nuclis del PB (Butcher, 1995; Mufson *i col.*, 2003; Semba, 2000; Wenk, 1997) configurant el denominat complex nuclear colinèrgic basal (Butcher, 1995).

A més de les neurones colinèrgiques, l'NBM conté altres poblacions neuronals, entre les quals destaca la constituïda per neurones **GABAèrgiques** (Gritti *i col.*, 1993; Gritti *i col.*, 1997; Sarter i Bruno, 2002; Semba, 2000). Morfològicament, aquestes cèl·lules són de menor grandària i, possiblement, moltes d'elles funcionen com interneurons. Malgrat tot, una important subpoblació d'aquestes cèl·lules són tan grans com les magnocel·lulars colinèrgiques i es consideren neurones de projecció cortical (Fisher *i col.*, 1988; Gritti *i col.*, 1993). Les neurones colinèrgiques i GABAèrgiques es troben entremesclades en l'NBM, si bé, la proporció de cada població neuronal varia segons els diferents estudis. La majoria d'autors consideren que aproximadament un 80-90% de neurones de l'NBM són colinèrgiques (Givens i Sarter, 1997; Mesulam, 2004), en canvi, altres resultats indiquen que el nombre de cèl·lules colinèrgiques i GABAèrgiques estaria més igualat (Gritti *i col.*, 2006; Sarter i Bruno, 2002).

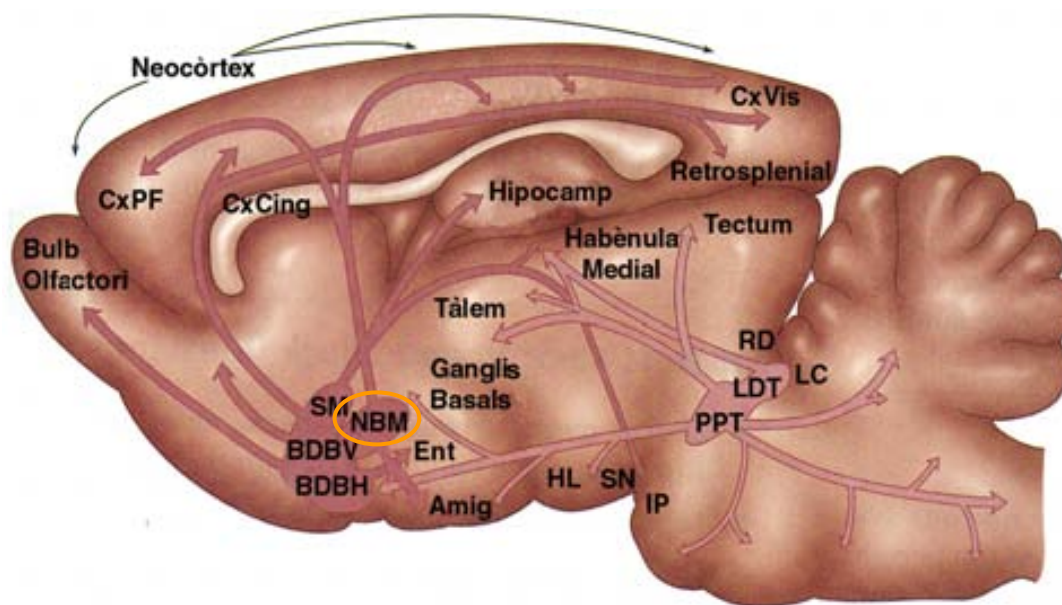
Juntament amb aquestes poblacions neuronals, l'NBM també conté neurones **glutamatèrgiques** (Detari *i col.*, 1999; Gritti *i col.*, 2006; Manns *i col.*, 2003; Manns *i col.*, 2001; Semba, 2000) i **neuropeptidèrgiques**, incloent aquestes últimes neuropèptids com la galanina, la somatostatina, el neuropèptid Y, la neurotensina, la substància P, les orexines o les encefalines (Detari *i col.*, 1999; Eggermann *i col.*, 2001; Gritti *i col.*, 2003; Jones i Mühlenthaler, 1999; Mesulam, 1995b; Mufson *i col.*, 2000; Reiner i Fibiger, 1995; Semba, 2000; Zaborszky i Duque, 2000). De tots els neuropèptids, la galanina és el més freqüent en l'NBM, destacant pel seu efecte inhibitori sobre la transmissió colinèrgica (Hokfelt *i col.*, 1987; Semba, 2000) (veure apartat 1.2.5).

L'heterogeneïtat neuroquímica de l'NBM es mostra, no només per la presència de diferents neurotransmissors, sinó també per les diverses substàncies químiques que solen colocalitzar-se amb determinats neurotransmissors. Aquest és el cas de les **proteïnes d'unió al calci**, com la parvalbúmina, la calbindina o la calretinina, que es troben colocalitzades principalment en subpoblacions de neurones GABAèrgiques i colinèrgiques, tot i que també s'ha associat la calbindina i calretinina a les neurones glutamatèrgiques (Celio, 1990; Gritti *i col.*, 2003; Semba, 2000; Zaborszky i Duque, 2000). Aquestes

proteïnes tindrien la funció d'amortir els nivells d'ions  $Ca^{++}$ , i per tant regular la concentració i la distribució de calci intracel·lular. D'altra banda, també s'ha demostrat la presència en l'NBM de diverses **neurotrofines**, incloent el factor de creixement nerviós (NGF), el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) o la neurotrofina-3, que actuen com a factors tròfics per diferents subpoblacions de neurones colinèrgiques del PB induint una gran varietat de canvis bioquímics i morfològics per promoure el seu desenvolupament i la seva supervivència (Ward i Hagg, 2000). Totes aquestes neurotrofines s'uneixen als receptors de baixa afinitat de p-75, que expressen selectivament les neurones colinèrgiques del PB, amb l'excepció d'aquelles que projecten a l'amígdala. A més, l'NBM també conté receptors per la serotonina (5HT), la dopamina, la noradrenalina i els estrògens (Mesulam, 2004; Mufson *i col.*, 2003).

L'NBM rep **aferències** d'una gran heterogeneïtat de sistemes de neurotransmissió de diverses estructures troncoencefàliques, diencefàliques i corticals (Carnes *i col.*, 1990; Semba i Fibiger, 1989; Zaborszky *i col.*, 1991; Zaborszky *i col.*, 1999), però, i a diferència de l'abundància de dades sobre les projeccions eferents de l'NBM, la informació en relació a les connexions aferents és significativament menor. Del tronc de l'encèfal, destaquen les aferències noradrenèrgiques provinents del *locus coeruleus* (LC) (Jones i Cuello, 1989; Losier i Semba, 1993), les colinèrgiques i glutamatèrgiques procedents del nucli laterodorsal tegmental (LTD) i del pedunculopòntic tegmental (PPT) (Jones i Cuello, 1989; Woolf i Butcher, 1986) i les glutamatèrgiques i serotoninèrgiques del rafe dorsal (RD) (Carnes *i col.*, 1990). A més, l'NBM també rep aferències de diverses estructures prosencefàliques. En concret, rep *inputs* histaminèrgics i neuropeptidèrgics (orexina) dels nuclis tuberomamil·lars i perifornicals de l'hipotàlem, GABAèrgics i neuropeptidèrgics (substància P) del nucli *accumbens*, i aferències des dels nuclis caudat i putamen, dels nuclis intralaminars del tàlem i de nuclis subtalàmics de les quals no es coneix bé la naturalesa química però sembla que podria ser glutamatèrgica (Carnes *i col.*, 1990; Detari *i col.*, 1999; Eggermann *i col.*, 2001; Gaykema *i col.*, 1991; Zaborszky *i col.*, 1997). Des del còrtex, l'NBM només rep projeccions de les regions límbiques i paralímbiques, incloent el còrtex prefrontal i el còrtex insular alhora que també rep aferències des de l'amígdala central i basolateral. En canvi, no sembla que l'NBM rebi projeccions directes des d'àrees sensorials i motores primàries o des d'àrees d'associació sensorial (Carnes *i col.*, 1990; Detari *i col.*, 1999; Gaykema *i col.*, 1991; Givens i Sarter, 1997; Mesulam i Mufson, 1984; Sarter i Bruno, 2000; Semba, 2000; Zaborszky *i col.*, 1997). Les aferències des del còrtex sembla que són principalment glutamatèrgiques, tot i que poden ser també GABAèrgiques. I, almenys en rates, aquestes projeccions glutamatèrgiques corticals sinapsen quasi exclusivament amb neurones GABAèrgiques en l'NBM (Zaborszky *i col.*, 1997).

D'altra part, l'NBM projecta a nombroses estructures encefàliques mitjançant diversos sistemes de neurotransmissió, però les **efèrencies** que han rebut més atenció han estat les projeccions colinèrgiques al neocòrtex (Figura 2.1.2) (Johnston *i col.*, 1979; Lehmann *i col.*, 1980; Wenk *i col.*, 1980; Woolf *i col.*, 1983). A diferència de les aferències corticals que rep, l'NBM projecta a totes les àrees corticals (Detari *i col.*, 1999; Gaykema *i col.*, 1991; Ghashghaei i Barbas, 2001; Mesulam, 2004; Mesulam *i col.*, 1983a; Szymusiak, 1995; Zaborszky *i col.*, 1999).



**Figura 2.1.2 Sistema colinèrgic de la rata.** [Amig: amígdala; BDBh: banda diagonal de Broca, branca horitzontal; BDBv: banda diagonal de Broca, branca vertical; Cx.Cing: còrtex cingulat; Cx.PF: còrtex prefrontal; Cx.Vis: còrtex visual; Ent: còrtex entorrinal; HL: hipotàlem lateral; IP: nucli interpeduncular; LC: *locus coeruleus*; LTD: nucli laterodorsal mesencefàlic; NBM: nucli basal magnocel·lular; PPT: nucli pedunculopòntic tegmental mesencefàlic; RD: rafe dorsal; SM: septum medial; SN: substància negra]. Modificat de Kalat, 2001.

Les projeccions colinèrgiques corticals de l'NBM proporcionen la principal font d'ACh alliberada al còrtex cerebral. L'ACh alliberada exerceix la seva influència en el còrtex cerebral interactuant amb neurones que expressen receptors muscarínics i nicotínics (Schroder *i col.*, 1990; Schroder *i col.*, 1989), essent el subtipus muscarínic m1 el receptor més comú en el còrtex de mamífers (revisat a Eglén, 2006; Oki *i col.*, 2005). A nivell cortical, les neurones colinèrgiques formen amplies arboritzacions al llarg de totes les capes corticals (Woolf, 1991) establint sinapsis amb cèl·lules piramidals i amb interneurons excitatòries i inhibidores (Semba, 2000).

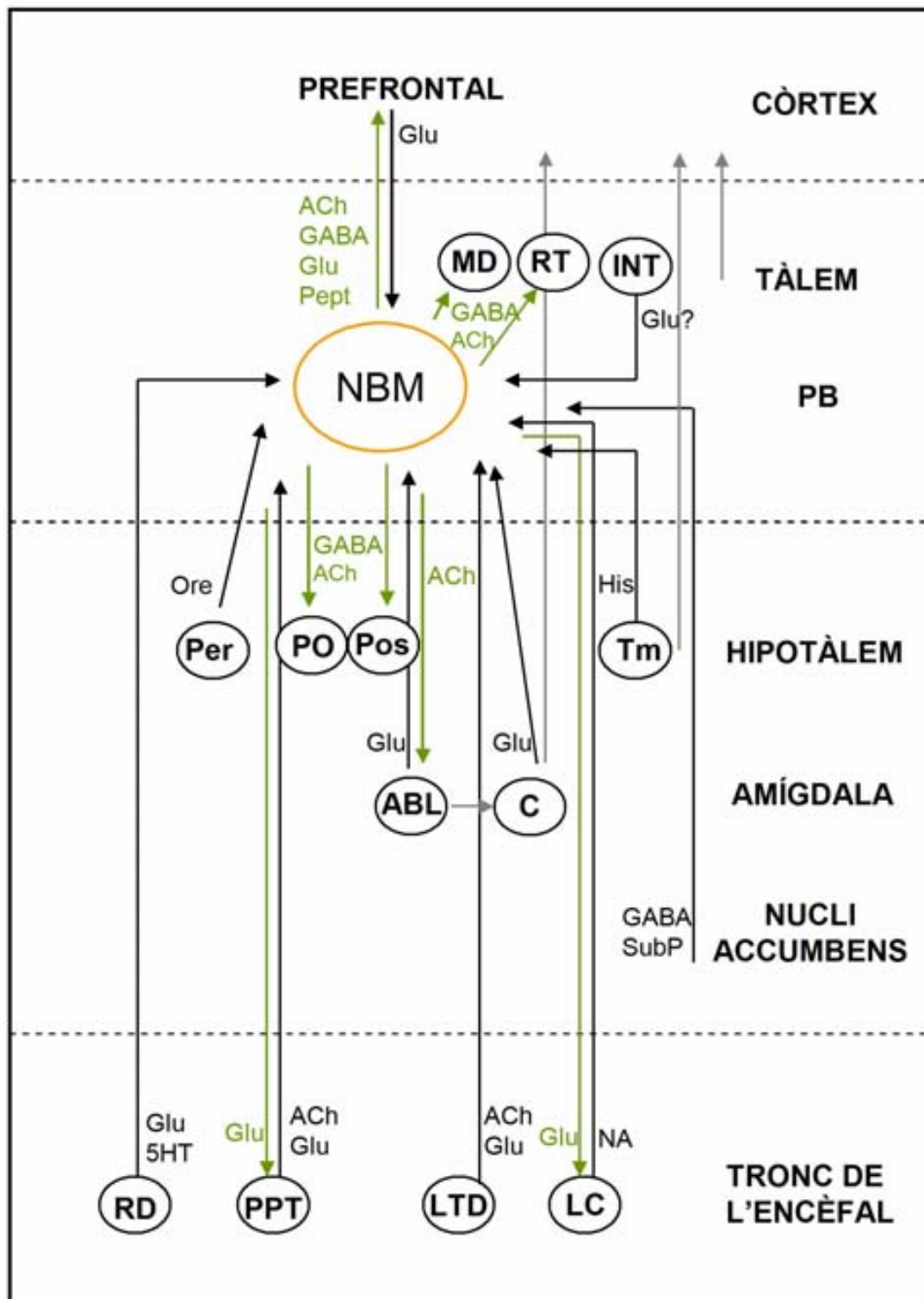
Paral·lelament a les projeccions colinèrgiques corticals, les grans neurones GABAèrgiques també projecten des de l'NBM a l'escorça. S'ha pogut comprovar que aquestes neurones estableixen sinapsis principalment amb interneurons GABAèrgiques del neocòrtex (Freund i Meskenaite, 1992; Gritti *i col.*, 2003; Jimenez-Capdeville *i col.*,

1997). Per aquest motiu, generalment s'ha suggerit que l'estimulació de les projeccions GABAèrgiques corticals de l'NBM inhibeix l'excitabilitat de les interneurons corticals i, d'aquesta manera, permet una desinhibició cortical generalitzada, actuant així de forma sinèrgica a l'efecte excitador de les neurones colinèrgiques (Detari *i col.*, 1999; Givens i Sarter, 1997; Gritti *i col.*, 1997; Rasmusson, 2000; Semba, 2000; Verdier i Dykes, 2001). Tot i així, les interaccions entre les projeccions colinèrgiques i GABAèrgiques, i les interrelacions dels seus efectes en l'excitabilitat neural cortical són molt complexes i no estan completament determinades (Sarter i Bruno, 2002). A més, projeccions corticals d'altres sistemes de neurotransmissió com el glutamatèrgic sembla que també podrien contribuir a la modulació de l'activitat cortical de manera significativa (Jones, 2003; Manns *i col.*, 2003). És important destacar, però, que les neurones de l'NBM no només poden regular l'activitat de les neurones corticals a través de les seves projeccions directes al neocòrtex, sinó que també ho fan indirectament a través de determinats nuclis del tàlem com els nuclis reticular i MD. Aquestes projeccions talàmiques comprenen també diferents sistemes de neurotransmissió, però, en aquest cas, el component colinèrgic és relativament menor (Asanuma, 1997; Bickford *i col.*, 1994; Cornwall *i col.*, 1990; Jones, 2003; Semba, 2000).

A banda de les projeccions corticals i talàmiques, una altra de les principals regions diana de l'NBM és ABL, regió relacionada amb la consolidació de la memòria emocional i motivacional (McGaugh, 2002; Power i McGaugh, 2002). El feix basaloamigdalari és principalment colinèrgic (Nagai *i col.*, 1982; Woolf i Butcher, 1982) i sembla que a través seu l'NBM podria modular indirectament l'activitat de l'amígdala central, principal via de sortida de la informació del complex amigdaloi (Semba, 2000).

A més, l'NBM també projecta fibres descendents, principalment no colinèrgiques, a l'hipotàlem i al tronc de l'encèfal. A l'hipotàlem, l'NBM envia eferències fonamentalment a dues àrees: a la regió de l'hipotàlem posterior (Gritti *i col.*, 1994; Semba, 2000) i a l'àrea preòptica anterior incloent el nucli supraquiasmàtic i el supraòptic (Bina *i col.*, 1993; Madeira *i col.*, 2004; Semba, 2000) en les quals el component GABAèrgic és el predominant tot i que també hi participa el sistema colinèrgic (Gritti *i col.*, 1994; Madeira *i col.*, 2004; Semba, 2000). Respecte al tronc de l'encèfal, diferents estructures com el PPT (Semba i Fibiger, 1992; Steininger *i col.*, 1992) i el LC (Semba, 2000), nuclis implicats en la regulació del cicle de son/vigília, reben eferències de l'NBM (Semba, 2000).

En resum, l'NBM és una font de múltiples projeccions ascendents i descendents neuroquímicament heterogènies que col·lectivament arriben a un gran nombre de dianes localitzades per tot l'encèfal des del còrtex fins al tronc cerebral. La figura 2.1.3 resumeix les principals connexions aferents i eferents de l'NBM.



**Figura 2.1.3 Resum de les principals aferències i eferències de l'NBM amb els principals sistemes de neurotransmissió implicats.** [ABL: amígdala basolateral, C: amígdala central, Int: nuclis intralaminars, LC: locus coeruleus, LTD: nuclis laterodorsal, MD: nuclis mediodorsal, PB: prosencèfal basal, Per: nuclis perifornicals, PO: nuclis preòptic, Pos: nuclis posterior, PPT: pedunculopòntic tegmental, RD: rafe dorsal, Rt: nuclis reticular, Tm: nuclis tuberomamilar. 5HT: Serotonina, ACh: acetilcolina; Glu: glutamat; His: Histamina, NA: Noradrenalina, Ore: Orexina, Pept: neuropeptids, SubP: substància P]. Modificat de Zaborszky i Duque, 2000.



## 2.2. Modulació dels Processos Cognitius

L'NBM ha estat relacionat amb funcions diverses com la regulació de la son i de la temperatura, no obstant, el principal focus d'atenció l'ha rebut per la seva implicació en la modulació de les funcions cognitives (Detari *i col.*, 1999; Szymusiak, 1995; Szymusiak *i col.*, 2000). És conegut que el nombre de cèl·lules magnocel·lulars del nucli basal de Meynert de pacients amb la malaltia d'Alzheimer disminueix significativament (Candy *i col.*, 1983; Whitehouse *i col.*, 1982) i que els marcadors colinèrgics en les dianes corticals de les neurones basals estan reduïts (Davies i Maloney, 1976; Perry *i col.*, 1977), correlacionant amb el grau de demència que presenten els pacients (Perry *i col.*, 1978). Aquest fet ha propiciat nombrosos estudis que avaluen la implicació d'aquesta estructura en diferents processos cognitius (Dringenberg, 2000; Weinberger, 2003; Wenk, 1997). Una de les funcions atribuïdes a l'NBM, i especialment a les seves neurones colinèrgiques, és la modulació del processament de la informació sensorial i l'associació entre estímuls, fet que sembla conduir a un rendiment cognitiu eficaç (Everitt i Robbins, 1997; Gold, 2003; McGaughy *i col.*, 2002; Sarter i Bruno, 1997; Sarter *i col.*, 2003; Wenk, 1997). Així doncs, les projeccions corticals de l'NBM sembla que podrien estar críticament involucrades en la modulació de funcions com l'aprenentatge i la memòria i els processos atencionals (Baxter i Chiba, 1999; Dunnett *i col.*, 1991; Richardson i DeLong, 1988).

Els intents experimentals per determinar la contribució de l'NBM en les funcions cognitives s'han centrat, en gran part, en valorar les conseqüències de destruir les eferències de l'NBM en l'execució de diferents proves conductuals en models animals (veure Dunnett *i col.*, 1991). Els estudis que han realitzat lesions electrolítiques de l'NBM han observat dèficits principalment en l'adquisició (Popovic *i col.*, 1996) i retenció de l'EV2 (Sos-Hinojosa *i col.*, 2003; Vale-Martinez *i col.*, 2002b). No obstant, els seus resultats són més difícils d'interpretar perquè les lesions electrolítiques no discriminen les fibres de pas dels cossos cel·lulars. Un dels mètodes de lesió més utilitzats ha estat la infusió d'anàlegs d'aminoàcids excitatoris que produeixen lesions específiques dels cossos cel·lulars sense afectar als axons. Les lesions excitotòxiques de l'NBM produïdes amb àcid ibotènic, agonista dels receptors NMDA, o amb els agonistes dels receptors no-NMDA, l'àcid quisquàlic i l'AMPA (àcid  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiònic), impedeixen l'execució de nombroses tasques conductuals eminentment espacials (EV2, laberint aquàtic de Morris, laberint radial), fet que molts autors han atribuït a una disrupció dels processos d'**aprenentatge i memòria** (Bailey i Thomas, 2001; Bartus *i col.*, 1985; Butt i Hodge, 1995; Connor *i col.*, 1991; Dokla i Thal, 1988; Flicker *i col.*, 1983; Langlais *i col.*, 1993; Lerer *i col.*, 1985; Mandel *i col.*, 1989; Mandel i Thal, 1988; Santucci i Haroutunian,

1989; Vale-Martinez *i col.*, 2002b). No obstant, també s'han observat dèficits en alguns estudis que han utilitzat paradigmes no espacials com la discriminació de brillantor, suggerint que els dèficits induïts per la lesió de l'NBM no es limiten a les tasques espacials (Santucci i Haroutunian, 1989).

Part d'aquests dèficits es van atribuir a la disrupció de mecanismes colinèrgics ja que aquests es podien atenuar amb la infusió de substàncies estimulants colinèrgiques, com la fisostigmina, un inhibidor de l'acetilcolinesterasa, o la pilocarpina, un agonista muscarínic (Dokla i Thal, 1988; Mandel *i col.*, 1989; Mandel i Thal, 1988; Murray i Fibiger, 1986). Malgrat tot, altres estudis suggerien que els dèficits mnemònics observats després de les lesions de l'NBM amb diferents neurotoxines no necessàriament correlacionaven amb la depleció colinèrgica cortical (Ammassari-Teule *i col.*, 1993; Dunnett *i col.*, 1991; Page *i col.*, 1991). Per exemple, alguns estudis van mostrar que les lesions de l'NBM produïdes amb àcid quisquàlic, que indueix una major degeneració colinèrgica, produïen dèficits menors en l'aprenentatge i memòria que les lesions amb àcid ibotènic que produeixen una menor reducció colinèrgica cortical però més dany neuronal no específic (Dunnett *i col.*, 1987; Markowska *i col.*, 1990; Riekkinen *i col.*, 1991; Steckler *i col.*, 1993; Wenk *i col.*, 1989).

En aquest context, una eina important per avaluar el paper de les neurones colinèrgiques de l'NBM va ser el desenvolupament de la immunotoxina 192-IgG saporina, que permet realitzar lesions colinèrgiques selectives (Wiley *i col.*, 1991; Wrenn i Wiley, 2001) (Taula 2.2.1). Les lesions colinèrgiques de l'NBM, però, no van afectar a la majoria d'aprenentatges de tipus espacial avaluats (Baxter *i col.*, 1995; Dornan *i col.*, 1996; Galani *i col.*, 2002; Lehmann *i col.*, 2003; Torres *i col.*, 1994; Wenk *i col.*, 1994) o només van provocar dèficits menors (Berger-Sweeney *i col.*, 1994; Waite i Thal, 1996), de manera que no es van poder replicar els dèficits descrits anteriorment amb les lesions més inespecífiques (revisat a Everitt i Robbins, 1997; Gallagher i Colombo, 1995; McGaughy *i col.*, 2000). Aquests resultats, doncs, van suggerir que alguns processos de memòria eren insensibles o es veien poc afectats per la pèrdua selectiva de neurones colinèrgiques de l'NBM (Baxter *i col.*, 1995; Galani *i col.*, 2002; Torres *i col.*, 1994) i que, per tant, altres neurotransmissors diferents de l'ACh podrien ser els causants del dèficit cognitiu observat amb les lesions més inespecífiques. Altres autors, en canvi, suggerien que aquests dèficits observats amb lesions no selectives podrien ser resultat de problemes atencionals i no mnemònics (Baxter i Chiba, 1999; Gill *i col.*, 2000; Sarter i Bruno, 2000; Sarter *i col.*, 2003; Sarter *i col.*, 2001). Per aquest motiu, un tema destacat en la literatura ha estat la dissociació entre el paper del sistema colinèrgic de l'NBM en l'atenció i el seu paper en l'aprenentatge i la memòria.

	Hipocamp	Còrtex	Amígdala	No-específic	Referències
• Immunolesió (192 IgG-Sap)	-	+++	-	-	Berger-Sweeney <i>i col.</i> , 1994; Heckers <i>i col.</i> , 1994; Torres <i>i col.</i> , 1994; Wenk <i>i col.</i> , 1994
• Altres neurotoxines:					
IBO	-	++	++	++	Boegman <i>i col.</i> , 1992; Hagan <i>i col.</i> , 1988; Riekkinen <i>i col.</i> , 1990b; Wenk <i>i col.</i> , 1992
AMPA	-	++	+	++	Boegman <i>i col.</i> , 1992; Muir <i>i col.</i> , 1994
QUIS	-	+++	+	++	Boegman <i>i col.</i> , 1992; Muir <i>i col.</i> , 1994; Robbins <i>i col.</i> , 1989; Wenk <i>i col.</i> , 1992

**Taula 2.2.1. Resum de l'extensió i la localització del dany colinèrgic produït per la immunolesió de l'NBM amb 192 IgG-saporina comparada amb la produïda per altres neurotoxines.** Extensió del dany colinèrgic: - no observat, + menor, ++ significatiu, +++ extens. 192 IgG-Sap: 192 IgG-saporina, AMPA: Àcid  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiònic; IBO: àcid ibotènic; QUIS: àcid quisqualic.

La participació de l'NBM en processos *d'arousal* i **atenció** ha estat demostrada per molts estudis en els quals s'han avaluat els efectes de les lesions de l'NBM en tasques que requereixen demandes específiques d'atenció. Per exemple, els subjectes lesionats a l'NBM amb àcid ibotènic, quisqualic o AMPA mostren dèficits severos en la tasca de *five-choice serial reaction time* (5-CSRT) (Balducci *i col.*, 2003; Muir *i col.*, 1994; Muir *i col.*, 1995; Robbins *i col.*, 1989), tasca que presenta una elevada demanda de processos atencionals ja que l'animal ha de discriminar un estímul visual breu presentat aleatòriament en una de les cinc posicions possibles (revisat a Robbins, 2002). Aquests dèficits, però, es poden revertir mitjançant l'administració d'inhibidors de l'acetilcolinesterasa com la fisostigmina o el donepezil, o mitjançant la infusió de nicotina (Balducci *i col.*, 2003; Muir *i col.*, 1992a; Muir *i col.*, 1995; Muir *i col.*, 1992b), demostrant així la participació del sistema colinèrgic. A més, el trasplantament de neurones colinèrgiques fetals al còrtex de rates amb lesions a l'NBM també millora els dèficits de precisió en aquesta tasca (Muir *i col.*, 1992a).

Així mateix, els treballs que han realitzat lesions colinèrgiques de l'NBM amb la immunotoxina selectiva 192 IgG-saporina han obtingut els mateixos resultats (Chiba *i col.*, 1995; Lehmann *i col.*, 2003; McGaughy *i col.*, 2002; McGaughy *i col.*, 1996; McGaughy i Sarter, 1998; Risbrough *i col.*, 2002; Turchi i Sarter, 1997; Waite *i col.*, 1999). En aquests treballs es mostra com diferents tasques atencionals, principalment aquelles que mesuren atenció sostinguda (com la 5-CSRT) (Lehmann *i col.*, 2003; McGaughy *i col.*, 2002; McGaughy *i col.*, 1996; Risbrough *i col.*, 2002; Robbins, 2002) o paradigmes d'atenció dividida (Turchi i Sarter, 1997) són sensibles a les lesions colinèrgiques de l'NBM. En canvi,

les lesions colinèrgiques de l'NBM no afecten tasques de baixa demanda atencional (Himmelheber *i col.*, 2001). A més, els dèficits observats depenen de la dosi de 192 IgG-saporina utilitzada, alhora que correlacionen amb la pèrdua de neurones colinèrgiques a l'NBM i amb la disminució d'ACh cortical (McGaughy *i col.*, 2002). Aquests resultats es veuen confirmats, a més, per estudis de microdialisi *in vivo* que mostren que l'alliberació d'ACh en el còrtex prefrontal augmenta durant l'execució de tasques atencionals (Arnold *i col.*, 2002; Dalley *i col.*, 2001; Himmelheber *i col.*, 2000; Himmelheber *i col.*, 2001; Passetti *i col.*, 2000) i com aquest augment d'ACh correlaciona amb el nivell de demanda atencional de la tasca (McGaughy *i col.*, 2002). Així doncs, els efectes de les lesions amb la immunotoxina selectiva 192 IgG-saporina, juntament amb les tècniques de microdialisi *in vivo*, que permeten avaluar els canvis en l'alliberament cortical d'ACh durant l'execució de tasques conductuals, atribueixen a les projeccions colinèrgiques corticals un paper important en la mediació dels processos atencionals (veure Everitt i Robbins, 1997; Sarter *i col.*, 2003; Sarter *i col.*, 2001).

No obstant, no es pot descartar la possible implicació d'altres sistemes de neurotransmissió com el GABAèrgic (Holley *i col.*, 1995; Muir *i col.*, 1992b; Pang *i col.*, 1993) o el glutamatèrgic (Turchi i Sarter, 2001) en processos d'atenció. En aquest sentit, un estudi comparatiu dels efectes de les lesions de l'NBM amb àcid ibotènic o amb 192-IgG saporina en una tasca operant d'atenció sostinguda va mostrar que el dèficit atencional era molt més sever en els subjectes lesionats amb àcid ibotènic que en els subjectes amb lesió colinèrgica específica (Burk i Sarter, 2001). Segons els autors, el dèficit atencional podria ser atribuït a la disminució de neurones GABAèrgiques observada en els animals lesionats amb àcid ibotènic, fet que recolzaria la hipòtesi que les neurones GABAèrgiques de l'NBM intervindrien, almenys, en alguns processos d'atenció.

Així doncs, els diferents treballs esmentats coincideixen en considerar que l'NBM participa fortament en processos d'atenció. No obstant, actualment s'està reconsiderant el paper de l'NBM en processos d'**aprenentatge i memòria**. Cal tenir en compte que els aprenentatges usats per avaluar les lesions colinèrgiques de l'NBM han estat principalment de tipus espacial, com el laberint radial i el de Morris (Berger-Sweeney *i col.*, 1994; Dornan *i col.*, 1996; Everitt i Robbins, 1997; Galani *i col.*, 2002; Lehmann *i col.*, 2003; Torres *i col.*, 1994; Wenk *i col.*, 1994). Aquestes tasques depenen en gran mesura de la formació hipocampal, estructura que no rep projeccions directes de l'NBM sinó d'altres regions del PB com l'ASM (veure apartat 2.1). Els estudis més recents d'infusió de 192 IgG-saporina a l'NBM impliquen les projeccions colinèrgiques corticals en funcions cognitives que no poden ser classificades com atencionals, com són la formació de memòries socials (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a) (veure apartat 1.2.2),

l'aprenentatge visual discriminatiu (Fine *i col.*, 1997; Ridley *i col.*, 2005; Ridley *i col.*, 1999), la formació del *learning set* ("aprendre a aprendre") (Bailey *i col.*, 2003) o l'aprenentatge operant de transferència apetitiu-aversiu (Butt *i col.*, 2003). A més, els resultats mostren una correlació entre la densitat de neurones colinèrgiques a l'NBM, la densitat de marcadors colinèrgics al còrtex i l'habilitat d'aprenentatge dels animals (Fine *i col.*, 1997). En aquests aprenentatges, l'hipocamp no sembla ser la única estructura crítica sinó que altres estructures implicades en processos mnemònics, com el neocòrtex o l'amígdala, que sí que són projeccions directes de l'NBM, podrien aportar una contribució molt important. Per aquest motiu, aquests resultats aporten noves evidències de la contribució de les projeccions colinèrgiques corticals de l'NBM a certs tipus d'aprenentatge.

Aquest ventall d'efectes conductuals produïts després de les manipulacions de l'NBM ha fet que diversos autors intentessin trobar una possible explicació que unifiqués el paper de l'NBM en els processos cognitius (Sarter i Bruno, 1997; Sarter *i col.*, 2001). Per aquest motiu, Chudasama *i col.* (2004) van avaluar els dèficits produïts per la reducció colinèrgica cortical, mitjançant lesions colinèrgiques de l'NBM i inactivació muscarínica de l'EPF medial (EPFm), en una tasca combinada de memòria de treball i atenció (CAM) que permet separar les capacitats atencionals de les mnemòniques. En aquest treball, la infusió de 192 IgG-saporina en l'NBM no va afectar l'execució de la tasca en condicions de baixa demanda atencional. En canvi, en augmentar les demandes d'atenció, l'execució de la tasca de memòria es va impedir, fet que implicava les projeccions colinèrgiques corticals en funcions mnemòniques, sobretot quan les demandes d'atenció eren elevades. A banda, el bloqueig muscarínic a l'EPFm va provocar dèficits mnemònics que no es podien atribuir a simples problemes atencionals. Ambdós resultats, doncs, demostraven que les neurones colinèrgiques corticofugals de l'NBM afavorien processos tant d'atenció com de memòria.

En canvi, en un estudi recent, Cabrera *i col.* (2006) proposa la hipòtesi que el conjunt de dèficits observats en els diferents paradigmes sensibles a la lesió selectiva de l'NBM podrien reflectir un dèficit subjacent comú en un conjunt d'habilitats relacionades amb la **flexibilitat cognitiva**, entesa com la capacitat de canviar el focus d'atenció, de respondre a diferents condicions o configuracions d'estímuls segons les demandes de la tasca, o d'adaptar-se a regles de resposta canviants. Segons aquesta definició, molts dels paradigmes conductuals que s'han vist afectats per la lesió colinèrgica de l'NBM requereixen diferents aspectes de flexibilitat cognitiva, com per exemple, paradigmes d'atenció dividida (Turchi i Sarter, 1997; Waite *i col.*, 1999), la formació del *learning set* ("aprendre a aprendre") (Bailey *i col.*, 2003), l'aprenentatge de transferència (Butt *i col.*, 2003) o la TSPA (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a). A més, s'ha demostrat que les lesions de l'NBM provoquen dèficits en la reversió i l'extinció

d'aprenentatges discriminatius que es manifesten amb perseverança en respondre a l'estímul prèviament reforçat (Cabrera *i col.*, 2006; Fine *i col.*, 1997; Ridley *i col.*, 1985; Wilson i Cook, 1995). En canvi, sembla que l'NBM no seria tan necessari per l'aprenentatge d'associacions simples on la flexibilitat cognitiva no sembla necessària (Butt i Bowman, 2002; Butt *i col.*, 2003; Cabrera *i col.*, 2006). Per tant, segons Cabrera *i col.* (2006) la modulació colinèrgica cortical de l'NBM estaria especialment implicada en la flexibilitat cognitiva, especialment a través de la seva influència al còrtex prefrontal, regió que rep extenses projeccions colinèrgiques des de l'NBM (Mayo *i col.*, 1984) (veure apartat 2.1 i 3.1) i que és crítica en tasques que requereixen flexibilitat cognitiva (McAlonan i Brown, 2003; Ragozzino *i col.*, 1999b).

Contràriament a aquesta idea, però, l'atenció sostinguda, que depèn clarament del sistema colinèrgic de l'NBM (veure McGaughy *i col.*, 2002; Sarter *i col.*, 2001), no sembla que requereixi flexibilitat cognitiva. En tasques d'atenció sostinguda com la 5-CSRT, canvis en l'atenció o variacions flexibles en les respostes als estímuls discriminatius no són necessaris; en canvi, l'atenció sostinguda requereix la capacitat de detectar senyals breus i impredecibles i ignorar els estímuls distractors (veure McGaughy *i col.*, 1996; McGaughy i Sarter, 1998). D'altra banda, tasques de memòria implícita com l'EV2, que no requereixen flexibilitat cognitiva, també s'han mostrat sensibles a la lesió de l'NBM (Vale-Martinez *i col.*, 2002b), alhora que l'estimulació elèctrica de l'NBM n'ha facilitat l'aprenentatge (Montero-Pastor *i col.*, 2004; Montero-Pastor *i col.*, 2001). Per tant, el concepte de flexibilitat cognitiva podria ser útil per interpretar alguns dels efectes de les lesions de l'NBM, però no altres funcions com l'atenció sostinguda o certs aprenentatges que no requereixen flexibilitat.

La participació de l'NBM en processos d'aprenentatge i memòria sembla estar estretament lligada al seu paper en la **modulació de l'activitat cortical** (Detari, 2000; Duque *i col.*, 2000; Semba, 2000) i en certes formes de **plasticitat sinàptica** (Mesulam, 2004; Rasmusson, 2000; Verdier i Dykes, 2001; Weinberger, 2003). Diversos treballs han mostrat que les projeccions colinèrgiques de l'NBM tenen un paper important en la regulació de l'activació cortical, definida com un augment en la capacitat de resposta de les neurones corticals als *inputs* que els arriben a través de les vies sensorials o d'altres vies (Steriade, 2000). El mètode més usat per avaluar l'activació cortical és el registre de l'EEG cortical (Detari *i col.*, 1999). En aquest sentit, s'ha vist que les neurones colinèrgiques de l'NBM que projecten al còrtex varien el seu patró de descàrrega segons el nivell d'alerta i d'activació cortical, essent major durant la vigília i el son REM i menor durant el son d'ones lentes (Buzsaki *i col.*, 1988; Detari, 2000; Detari i Vanderwolf, 1987; Duque *i col.*, 2000; Manns *i col.*, 2000). A més, l'estimulació de l'NBM també provoca una activació cortical concomitant a l'alliberació d'ACh cortical (Casamenti *i col.*, 1986; Kurosawa *i col.*, 1989;

Metherate *i col.*, 1992; Rasmusson *i col.*, 1994) que correlaciona amb un millor processament sensorial (Bringmann i Klingberg, 1990; Edeline *i col.*, 1994; Hars *i col.*, 1993; Mercado *i col.*, 2001). En canvi, les lesions de l'NBM impedeixen l'activació de l'EEG cortical (Berntson *i col.*, 2002; Buzsaki *i col.*, 1988; Riekkinen *i col.*, 1990a), igual que l'administració de l'antagonista muscarínic atropina (Bakin i Weinberger, 1996; Metherate *i col.*, 1992). Per aquest motiu, es considera que les projeccions colinèrgiques de l'NBM cap al còrtex proporcionen les condicions neurals òptimes, alliberació d'ACh i desincronització de l'EEG, perquè es produeixin determinats esdeveniments fisiològics relacionats amb els mecanismes de plasticitat sinàptica subjacents als processos d'aprenentatge i memòria (Gill *i col.*, 2000; Sarter *i col.*, 2003; Weinberger, 2003).

La contribució de l'NBM en la inducció de plasticitat neural ha estat estudiada fonamentalment a través de l'EIC. En aquests treballs s'han usat paradigmes d'aprenentatge associatiu en els quals s'emparella l'EIC de l'NBM amb la presentació d'un estímul sensorial i posteriorment s'avaluen els canvis plàstics en el còrtex sensorial primari (Bjordahl *i col.*, 1998; Kilgard i Merzenich, 1998; McLin *i col.*, 2002a; McLin *i col.*, 2002b; McLin *i col.*, 2003; Rasmusson, 2000; Verdier i Dykes, 2001; Weinberger, 2003). Per exemple, l'aparellament d'un estímul auditiu d'una determinada freqüència amb l'estimulació elèctrica de l'NBM provoca una reorganització del còrtex auditiu primari de manera que l'àrea que respon de manera òptima a la freqüència del to aparellat augmenta considerablement (Kilgard i Merzenich, 1998). En canvi, la presentació d'un estímul sensorial de manera passiva és insuficient per generar aquesta reorganització cortical (Recanzone *i col.*, 1992; Recanzone *i col.*, 1993). Aquest tipus de plasticitat tampoc s'observa després de la lesió colinèrgica selectiva de l'NBM (Kilgard i Merzenich, 1998). De manera similar, les lesions colinèrgiques de l'NBM també impedeixen la reorganització cortical associada a un aprenentatge motor (Conner *i col.*, 2003), i la plasticitat en el còrtex somatosensorial en un paradigma d'aparellament (Baskerville *i col.*, 1997; Sachdev *i col.*, 1998), un efecte igual al provocat a la injecció d'atropina (Maalouf *i col.*, 1998). Aquests resultats mostren, doncs, que l'activació de l'NBM indueix processos de plasticitat neuronal al còrtex similars als canvis plàstics que es produeixen en situacions naturals d'aprenentatge (Bakin i Weinberger, 1996; Bjordahl *i col.*, 1998; Kilgard *i col.*, 2001; Metherate i Ashe, 1991; Miasnikov *i col.*, 2006; Miasnikov *i col.*, 2001; Pandya *i col.*, 2005; Weinberger, 2003; Weinberger, 2004; Weinberger i Bakin, 1998; Zhang *i col.*, 2005).

Malgrat tot, s'han realitzat pocs estudis avaluant els efectes de l'EIC de l'NBM a nivell conductual. Algun d'aquests treballs han mostrat que l'EIC de l'NBM aparellada amb un to indueix la formació de memòria associativa específica, mesurada per canvis en el ritme cardíac i respiratori (McLin *i col.*, 2002a; McLin *i col.*, 2003), que es desenvolupa

ràpidament (Miasnikov *i col.*, 2006). A banda, estudis d'EIC de l'NBM realitzats al nostre laboratori han mostrat que aquest nucli sembla intervenir en la adquisició i la consolidació de tasques d'aprenentatge implícit (Montero-Pastor *i col.*, 2004; Montero-Pastor *i col.*, 2001). En aquests treballs, els primers en la literatura científica que van analitzar els efectes de l'estimulació de l'NBM sobre una tasca d'aprenentatge instrumental, es va observar que aquest tractament administrat preadquisició facilitava l'adquisició de la tasca d'EV2, però, que si l'estimulació s'aplicava postadquisició, aquesta tenia un efecte modulador de la retenció, facilitador o impeditiu, que depenia dels paràmetres d'estimulació usats. En canvi, l'activació de l'NBM no afectava la recuperació de la informació de la tasca apresada si s'aplicava immediatament abans de la sessió de retenció. Segons aquests resultats, doncs, sembla que l'NBM tindria un paper important en els estadis inicials de l'aprenentatge, durant els processos d'adquisició i consolidació inicial de la memòria però no semblaria crític per la recuperació d'informació adquirida amb anterioritat, almenys en aquesta tasca d'aprenentatge implícit.

Així doncs, la modulació colinèrgica per part de l'NBM de l'activitat neural en el neocòrtex (Detari *i col.*, 1999) estaria implicada en diferents processos com l'atenció (Sarter *i col.*, 2001), la flexibilitat cognitiva (Cabrera *i col.*, 2006), la regulació de l'activitat neural i la inducció de plasticitat sinàptica (Kilgard i Merzenich, 1998; Weinberger, 2003) tots ells relacionats amb l'aprenentatge i la memòria (Baxter i Chiba, 1999; Givens i Sarter, 1997) (Taula 2.2.2). En general, es considera que l'ACh alliberada per l'NBM modula l'eficàcia del processament sensorial i de l'associació entre estímuls, afavorint que la informació es codifiqui als circuits neurals apropiats (Baxter i Chiba, 1999; Everitt i Robbins, 1997). Tot i així, no es pot menystenir el paper de les neurones no colinèrgiques, ja que també podria ser important.



PARADIGMA	MANIPULACIÓ	RESULTATS	ESTUDI
Evitació passiva	Lesió AMPA (Agonista R. AMPA)	↓ adquisició ↓ retenció (4 dies)	Page <i>i col.</i> , 1991
	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ retenció (1h i 1 dia després de l'entrenament)	Flicker <i>i col.</i> , 1983
		= adquisició	Connor <i>i col.</i> , 1991
		= adquisició ↓ retenció (4 dies)	Page <i>i col.</i> , 1991
		↓ adquisició ↓ retenció	Riekkinen <i>i col.</i> , 1991
	Lesió àc. Quisquàlic (Agonista R. AMPA)	= adquisició	Connor <i>i col.</i> , 1991
		↓ adquisició ↓ retenció	Riekkinen <i>i col.</i> , 1991
	Lesió àc. Kaínic (Agonista dels receptors Kainat)	= adquisició ↓ retenció (1 dia)	Lerer <i>i col.</i> , 1985
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ execució	Torres <i>i col.</i> , 1994
		= execució	Wenk <i>i col.</i> , 1994
Evitació activa d'un sentit	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ adquisició = extinció	Flicker <i>i col.</i> , 1983
Evitació activa de dos sentits	Lesió electrolítica	↓ adquisició	Popovic <i>i col.</i> , 1996
		= adquisició ↓ retenció (10 dies)	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002b
		= adquisició = retenció (1 dia) ↓ retenció (10 dies)	Sos-Hinojosa <i>i col.</i> , 2003
	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↑ adquisició ↓ retenció (10 dies)	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002b

Discriminació visual	Lesió electrolítica	↑ respostes perseverants en la reversió	Wilson i Cook, 1995
	ME20.4 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva, primats)	Discriminació visual senzilla: = retenció de la tasca apresada prelesió = nova adquisició postlesió (↓ si s'administra escopolamina) = reversió (↓ si s'administra escopolamina) = retenció de la tasca apresada postlesió	Fine <i>i col.</i> , 1997
		Discriminació visual complicada: = retenció de la tasca apresada prelesió ↓ nova adquisició postlesió = retenció de la tasca apresada postlesió	
		↓ adquisició	Ridley <i>i col.</i> , 1999
	↓ adquisició	Ridley <i>i col.</i> , 2005	
Discriminació visual condicionada	Infusió Muscimol (Agonista R. GABA A)	↓ precisió ↑ latència de resposta (Revertit per la bicuculina)	Muir <i>i col.</i> , 1992b
Discriminació de brillantor	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ adquisició ↓ reversió	Santucci i Haroutunian, 1989
Discriminació operant simple	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ adquisició	Butt i Hodge, 1995
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	= adquisició ↓ reversió de la discriminació (↑ perseverança)	Cabrera <i>i col.</i> , 2006
Formació del <i>learning set</i> (Discriminacions olfactòries)	Lesió àc. Quisquàlic (Agonista R. AMPA)	↓ formació del <i>learning set</i>	Bailey i Thomas, 2001
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ inicial en l'adquisició, però tots els animals acaben formant el <i>learning set</i>	Bailey <i>i col.</i> , 2003
Aprenentatge d'associació simple	192 IgG-Saporina (neurotoxina)	= execució	Butt i Bowman, 2002

Aprenentatge d'associació complex	colinèrgica selectiva)	↓ execució	
Alternança en un laberint en T	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ adquisició (reversible amb la infusió de fisostigmina o pilocarpina)	Murray i Fibiger, 1986
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	= execució	Wenk <i>i col.</i> , 1994
		= execució	Galani <i>i col.</i> , 2002
Tasca de discriminació condicionada demorada en un laberint en T	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ adquisició ↓ reversió de la discriminació	Langlais <i>i col.</i> , 1993
Tasca de discriminació espacial simple (dreta vs esquerra)	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	= adquisició = retenció (1 dia)	Santucci i Haroutunian, 1989
Tasca de discriminació espacial complexa de cerca de menjar (30 opcions)	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ retenció (reversible amb la infusió de fisostigmina o pilocarpina)	Murray i Fibiger, 1986
		↓ execució fins i tot 4 mesos després de recuperació postoperatòria ↑ perseverança	Santucci i Haroutunian, 1989
Laberint aquàtic de Morris	Lesió AMPA (Agonista R. AMPA)	= adquisició	Page <i>i col.</i> , 1991
	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ adquisició (dèficit atenuat amb la infusió de fisostigmina)	Dokla i Thal, 1988
		↓ adquisició (reversible amb la infusió d'una dosi moderada de fisostigmina)	Mandel i Thal, 1988
		↓ adquisició ↓ retenció (reversible amb la infusió contínua 1 setmana de fisostigmina)	Mandel <i>i col.</i> , 1989
		↓ adquisició	Connor <i>i col.</i> , 1991
		↓ adquisició	Page <i>i col.</i> , 1991
		↓ adquisició	Riekkinen <i>i col.</i> , 1991
	Lesió àc. Quisquàlic	↓ adquisició	Connor <i>i col.</i> , 1991

	(Agonista R. AMPA)	= adquisició	Riekkinen <i>i col.</i> , 1991
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	= execució	Torres <i>i col.</i> , 1994
		- paradigma espacial (plataforma invisible): ↓ execució en totes les fases (des del dia 1 fins el dia 6) - paradigma <i>cued</i> (plataforma visible): = execució en totes les fases (des del dia 1 fins el dia 4)	Berger-Sweeney <i>i col.</i> , 1994
		Aprentatge espacial: = adquisició Aparellament amb la posició: ↓ menor en memòria de treball	Baxter <i>i col.</i> , 1995
		= execució	Dornan <i>i col.</i> , 1996
		↓ <i>menor</i> en el paradigma de memòria de referència (en les primeres fases del test) = en el paradigma de memòria de treball	Galani <i>i col.</i> , 2002
Laberint radial	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ <i>menor</i> execució	Dornan <i>i col.</i> , 1996
		= execució	Lehmann <i>i col.</i> , 2003
		= execució ( 0 min, 2 min, 2h de demora) ↓ <i>menor</i> execució (6 h de demora) (en les primeres fases del test)	Galani <i>i col.</i> , 2002
TSPA	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	= test immediat ↓ retest 1 dia	Berger-Sweeney <i>i col.</i> , 2000
		↓ test immediat, retest 1 dia, retest 3 dies	Vale-Martinez <i>i col.</i> , 2002a
Tasca operant de transferència operant apetitiva-aversiva	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	= adquisició de la fase apetitiva ↓ transferència de la fase apetitiva a l'aversiva	Butt <i>i col.</i> , 2003
No aparellament demorat amb la mostra	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ retenció (majors dèficits d'aprenentatge que amb lesió àc. quisquàlic)	Markowska <i>i col.</i> , 1990

		↓ execució que es recupera al llarg del temps	Bartus <i>i col.</i> , 1985
	Lesió àc. Quisquàlic (Agonista R. AMPA)	= retenció (menors dèficits d'aprenentatge que amb lesió àc. ibotènic)	Markowska <i>i col.</i> , 1990
Aparellament demorat amb la mostra	Lesió àc. Quisquàlic (Agonista R. AMPA)	= execució	Bailey i Thomas, 2001
<i>Serial reversal learning</i>	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ execució	Ridley <i>i col.</i> , 1985
Tasca combinada d'atenció i memòria (CAM)	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	= execució en condicions de baixa demanda atencional ↓ execució en la fase de memòria en condicions d'alta demanda atencional	Chudasama <i>i col.</i> , 2004
5-CSRT	Lesió AMPA (Agonista R. AMPA)	↓ precisió ↑ latència de resposta ↑ respostes perseverants (reversible amb la infusió d'una dosi moderada de fisostigmina)	Muir <i>i col.</i> , 1994
		↓ precisió ↑ latència de resposta (reversible amb fisostigmina o nicotina però no amb de d-amfetamina)	Muir <i>i col.</i> , 1995
		↓ precisió (reversible amb <i>donepezil</i> ) ↑ latència de resposta ↑ respostes perseverants i prematures	Balducci <i>i col.</i> , 2003
	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R. NMDA)	↓ precisió ↑ latència de resposta (el dèficit augmenta amb estímuls de curta durada i amb la introducció de distractors)	Robbins <i>i col.</i> , 1989
	Lesió àc. Quisquàlic (Agonista R. AMPA)	↓ precisió ↑ latència de resposta (el dèficit augmenta amb estímuls de curta durada i amb	Robbins <i>i col.</i> , 1989

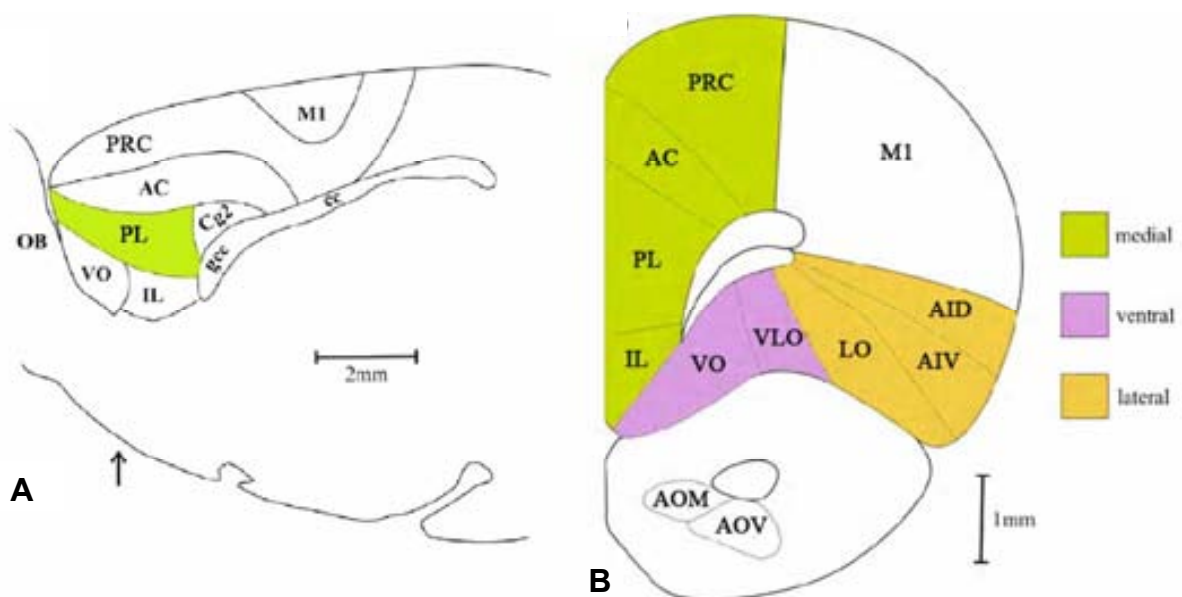
		la introducció de distractors) (efectes menors que lesió amb àc. ibotènic)	
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ execució, sobretot en altes demandes atencionals, dosi-depenent	McGaughy <i>i col.</i> , 2002
		↓ execució, sobretot en altes demandes atencionals	Risbrough <i>i col.</i> , 2002
		↓ precisió ↑ latència de resposta	Lehmann <i>i col.</i> , 2003
	Infusió Muscimol (Agonista R. GABA A)	↓ precisió ↑ latència de resposta (Revertit per la bicuculina i la fisostigmina)	Muir <i>i col.</i> , 1992b
2-CRT	Infusió Muscimol (Agonista R. GABA A)	↓ precisió ↑ latència de resposta	Pang <i>i col.</i> , 1993
Tasca visual d'atenció selectiva	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ execució	McGaughy <i>i col.</i> , 1996
Tasca operant d'atenció dividida (estímuls visuals i auditius)		↓ execució quan la modalitat sensorial és imprevisible	Turchi i Sarter, 1997
Tasca operant de baixa demanda atencional		= execució	Himmelheber <i>i col.</i> , 2001
Tasca operant d'atenció sostinguda	Infusió APV (Antagonista R NMDA)	↓ precisió	Turchi i Sarter, 2001
	Infusió NMDA (Agonista R NMDA)	= precisió	
Detecció d'un estímul predictor de la ocurrència d'altres en un aprenentatge associatiu	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ processos atencional	Chiba <i>i col.</i> , 1995

**Taula 2.2.2 Efectes de diferents manipulacions experimentals en l'NBM sobre l'execució de diferents tasques conductuals.** En la columna "Paradigma" s'indica la tasca conductual que s'ha realitzat i en la columna "Manipulació" s'indiquen les diferents substàncies utilitzades a cada treball [5-CSRT: Tasca de *five-choice serial reaction time*, 2-CRT: Tasca de *two-choice reaction time*].

### 3. CÒRTEX PRELÍMBIC

#### 3.1 Neuroanatomia i Neuroquímica

El PL forma part de l'EPF, regió localitzada en el lòbul frontal, en posició rostral a l'escorça motora, premotora i motora suplementària. L'EPF s'ha definit de manera general com la part del lòbul frontal que rep la majoria de projeccions talàmiques des del nucli MD (Rose i Woolsey, 1948). Segons aquesta definició, la majoria d'espècies de vertebrats contenen una regió prefrontal en la part rostral de l'encèfal. En rosegadors, l'EPF es pot subdividir en tres regions principals: la lateral (àrees insular agranular dorsal i ventral (AID, AIV)), l'orbital o ventral (localitzada ventralment al cos callós) i la medial. A la vegada, aquesta última, es divideix en tres zones (de dorsal a ventral): cingulada anterior (AC), PL i infralímbica (IL) (Dalley *i col.*, 2004a; Granon i Poucet, 2000; Heidbreder i Groenewegen, 2003) (Figura 3.1.1). Segons els estudis anatòmics, l'àrea PL es considera, en general, l'àrea homòloga de l'escorça prefrontal dorsolateral (EPFdl) d'humans i primats no humans (Granon i Poucet, 2000).



**Figura 3.1.1 Còrtex Prefrontal de la rata: (A) secció sagital, (B) secció coronal** [AC: còrtex cingulat anterior; AID: còrtex insular agranular part dorsal; AIV: còrtex insular agranular part ventral; AOM: nucli olfatori anterior part medial; AOV: nucli olfatori anterior part ventral; Cg2: còrtex cingulat àrea 2; cc: cos callós; ggc: genoll del cos callós; IL: còrtex infralímbic; LO: còrtex orbital lateral; M1: còrtex motor primari; MO: còrtex orbital medial; OB: bulb olfatori; PRC: còrtex precentral; PL: còrtex prefrontal; VLO: còrtex orbital ventrolateral; VO: còrtex orbital ventral]. Adaptat de Dalley *i col.*, 2004a.

Tenint en compte la seva citoarquitectura, el PL de la rata es defineix com una àrea agranular, és a dir, una regió sense la capa 4 cel·lular (Pandya i Yeterian, 1990). A l'escorça, les neurones piramidals són la població neuronal majoritària i representen al voltant d'un 75-80 % del total, i són **glutamatèrgiques**. A part de les neurones piramidals, el PL també conté interneurons **GABAèrgiques** que representen aproximadament el 15-20% de la població neuronal i proporcionen un control local inhibitori. A més, la majoria d'aquestes interneurons també expressen diferents neuropèptids i proteïnes d'unió al calci com la calretinina, la parvalbúmina i la calbindina D-28k. En general, es pensa que les neurones en el PL, igual que a d'altres àrees corticals, s'organitzen en múltiples i repetitius microcircuitos formats per un conjunt de connexions molt específiques entre una neurona piramidal i diferents interneurons GABAèrgiques. Malgrat tot, degut a la complexitat dels circuits locals i a les diferències entre espècies, és difícil dibuixar un únic diagrama de microcircuitos corticals vàlid per totes les espècies animals i per totes les àrees corticals (Beaulieu, 1993; DeFelipe, 2002; DeFelipe *i col.*, 2002; Douglas i Martin, 1991; Gabbott *i col.*, 2005; Somogyi *i col.*, 1998).

El patró de connectivitat del còrtex PL és molt extens i complex, ja que presenta nombroses connexions amb altres àrees corticals, així com també amb diferents estructures diencefàliques i troncoencefàliques (revisat a Gabbott *i col.*, 2005; Heidbreder i Groenewegen, 2003; Vertes, 2004) (Figura 3.1.2). De l'escorça, el PL rep **aferències** principalment del còrtex piriforme, entorrinal, perirrinal i del còrtex insular agranular, alhora que la seva part més dorsal també rep inputs d'àrees sensorials com el còrtex visual secundari, i del còrtex restrosplènic (Conde *i col.*, 1995; Datiche i Cattarelli, 1996; Reep i Winans, 1982; Van Eden *i col.*, 1992). A més, el PL també rep connexions d'estructures olfactòries com el bulb olfatori (Neafsey *i col.*, 1986) i d'altres estructures límbiques incloent l'amígdala, predominantment la part caudal del complex amigdaloides basal, l'hipocamp (CA1) i el subicle, principalment la seva part ventral (Carr i Sesack, 1996; Conde *i col.*, 1995; Delatour i Witter, 2002; Gabbott *i col.*, 2002; Granon i Poucet, 2000; Jay *i col.*, 1989; Krettek i Price, 1977; McDonald, 1987; McDonald, 1991; Swanson, 1981; Uylings i van Eden, 1990). L'EPFm rep la major font d'aferències colinèrgiques del PB, essent l'NBM i la BDBh les regions principals que envien projeccions colinèrgiques al PL (Gaykema *i col.*, 1990; Saper, 1984; Woolf, 1991). Així mateix, el PL rep aferències probablement glutamatèrgiques del nucli estriat i del nucli accumbens (Van Eden i Buijs, 2000) a més d'*inputs* de diferents neurones de l'hipotàlem que contenen histamina i melanocortina (Saper, 1985). Del tronc de l'encèfal, el PL rep aferències dopaminèrgiques i GABAèrgiques de l'àrea tegmental ventral, serotoninèrgiques i noradrenèrgiques del RD i



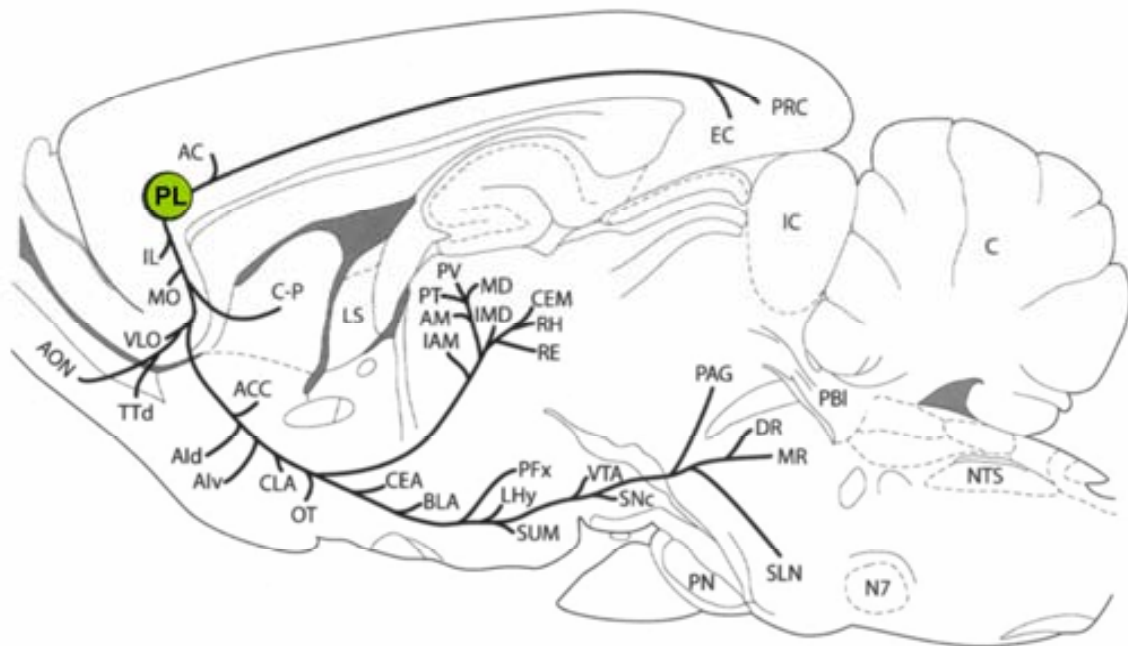
del LC i colinèrgiques del LTD (Berger *i col.*, 1991; Carr i Sesack, 2000; Satoh i Fibiger, 1986).

Alhora, existeixen denses projeccions recíproques i topogràficament organitzades des de diferents nuclis talàmics a l'EPFm, la principal característica definidora de l'EPF. La part més ventral del còrtex PL, juntament amb el còrtex IL, rep i envia projeccions als nuclis de la línia mitja (especialment al nucli paraventricular) i al segment medial del nucli MD del tàlem, mentre que la part més dorsal del PL, juntament amb AC, projecta al segment lateral de MD i als nuclis intralaminars. A més, existeixen fortes connexions entre totes les àrees de l'EPFm i el tàlem ventral, en particular amb el nucli reuniens de la línia mitja. Així mateix, també s'observen projeccions més esporàdiques amb els nuclis talàmics lateral, reticular i ventromedial (Groenewegen, 1988; Krettek i Price, 1977; Ray i Price, 1992; Sesack *i col.*, 1989; Vertes, 2002).

D'altra banda, el PL també envia **eferències** a nombroses estructures corticals generant importants interconnexions cortico-corticals. Dins de l'EPFm, el PL connecta amb el còrtex IL, amb AC i, amb menys mesura, amb l'àrea premotora i amb àrees cingulades caudals (Morecraft i Van Hoesen, 1993). A més, també projecta a àrees més laterals com AID i AIV, OFC i el còrtex perirrinal i, només la part més ventral del PL, també projecta al còrtex piriforme anterior (Datiche i Cattarelli, 1996). En canvi, la part més dorsal del PL envia lleugeres projeccions a les àrees sensorimotors en les regions frontals i parietals (Sesack *i col.*, 1989). Al PB, el PL gairebé no hi projecta (Room *i col.*, 1985) i només s'observen algunes poques projeccions colinèrgiques principalment a la BDBh, al nucli preòptic medial i a la SI (Gaykema *i col.*, 1991; Sesack *i col.*, 1989). A banda, altres neurones no colinèrgiques també innerven lleugerament les parts laterals del *bed nucleus* de l'estria terminal (Sesack *i col.*, 1989). A més, el PL també projecta a estructures olfàctòries com el tubercle olfatori i el nucli olfatori anterior (Sesack *i col.*, 1989) i a estructures límbiques com l'amígdala, principalment la part capsular del nucli central i ABL (McDonald, 1998; McDonald *i col.*, 1996). En canvi, tot i que el PL rep projeccions des de l'hipocamp, s'han descrit molt poques fibres de l'EPFm que projectin a aquesta estructura (Hurley *i col.*, 1991; Sesack *i col.*, 1989). D'altra banda, també s'han definit eferències del PL al claustr, als ganglis basals especialment als nuclis caudat-putamen i al nucli accumbens (*core i shell*) (Ding *i col.*, 2001; Gorelova i Yang, 1997; McGeorge i Faull, 1989), a la part més medial del nucli subtalàmic (Berendse i Groenewegen, 1991) i a diferents nuclis hipotalàmics especialment de l'hipotàlem medial i lateral (Sesack *i col.*, 1989). Alhora, el PL també envia nombrosos axons a diferents nuclis del tronc de l'encèfal, especialment a la substància gris periaqueductal, a l'àrea tegmental ventral, a la substància

negra, al RD, al LC, a la formació reticular pontina i al PPT (Carr i Sesack, 2000; Neafsey *i col.*, 1986; Reep *i col.*, 1987; Sesack *i col.*, 1989).

En resum, el PL és font de múltiples projeccions (Figura 3.1.2) que semblarien consistents amb el seu paper en funcions limbico-cognitives (veure apartat 3.2) i que es podrien considerar homòlogues al còrtex prefrontal dorsolateral dels primats (Vertes, 2004).



**Figura 3.1.2 Secció sagital esquemàtica resumint les principals projeccions del còrtex PL.** [AC: còrtex cingulat anterior; Ald: còrtex insular agranular part dorsal; Alv: còrtex insular agranular part ventral; AM: nuclis anteromedial del tàlem; AON: nuclis olfatori anterior; BLA: nuclis basolateral de l'amígdala; C: cerebel; C-P: nuclis caudat i putamen, estriat; CEA: nuclis central de l'amígdala; CEM: nuclis central medial del tàlem; CLA: claustre; EC: còrtex entorrinal; DR: nuclis dorsal del rafe; IAM: nuclis interanteromedial del tàlem; IL: còrtex infralímbic; IMD: nuclis intermediodorsal del tàlem; LHy: àrea hipotalàmica lateral; MD: nuclis mediodorsal del tàlem; MO: còrtex orbital medial; MR: nuclis mitjà del rafe; NTS: nuclis del tracte solitari; N7: nuclis facial; OT: tubercle olfatori; PAG: substància gris periaqüeductal; PBI: nuclis parabraquial lateral; PFX: regió perifornical de l'hipotàlem; PL: còrtex prelímbic; PN: nuclis pontí; PRC: còrtex perirínic; PT: nuclis parataenial del tàlem; PV: nuclis paraventricular del tàlem; RE: nuclis reuniens del tàlem; RH: nuclis romboide del tàlem; TTd: taenia tecta dorsal; VLO: còrtex orbital ventrolateral]. Adaptat de Vertes, 2004.

### 3.2. Modulació dels Processos Cognitius

L'EPF humana és una regió del còrtex cerebral íntimament relacionada amb funcions cognitives superiors com la memòria de treball, l'atenció, el control de la conducta, la presa de decisions i la selecció temporal d'estratègies (Fuster, 1997; Shallice i Burgess, 1991). La disfunció d'aquesta regió i dels circuits associats provoca molts dels dèficits cognitius i conductuals associats amb desordres neuropsiquiàtrics com el trastorn de dèficit d'atenció/hiperactivitat i l'esquizofrènia (Dalley *i col.*, 2004a). Els descobriments en rosegadors i primats no humans suggereixen, però, que les diferents subregions de l'EPF contribueixen de manera diferencial a les funcions cognitives (revisat a Dalley *i col.*, 2004a; Granon i Poucet, 2000; Kesner, 2000; Ragozzino, 2000). Tot i així, es coneixen poc els mecanismes a través dels quals cadascuna de les subàrees, i especialment el còrtex PL, contribueixen a funcions cognitives específiques.

Les lesions restringides al PL impliquen aquesta àrea en processos de **memòria de treball** (Brito i Brito, 1990; Brito *i col.*, 1982). La memòria de treball és un tipus de memòria temporal que permet mantenir activa la informació ja processada en la memòria a curt termini, mentre s'elabora nova informació rellevant de la tasca alhora que es recupera informació de la memòria a llarg termini. Per aquest motiu, les tasques que freqüentment s'utilitzen per avaluar la memòria de treball són paradigmes de resposta demorada (Ragozzino, 2000). Les lesions del PL afecten tasques com l'alternança demorada espacial (Brito i Brito, 1990; Kesner, 2000; Larsen i Divac, 1978; van Haaren *i col.*, 1985) i el no aparellament demorat amb la mostra (Brito i Brito, 1990; Dunnett *i col.*, 1990; Granon *i col.*, 1994; Joel *i col.*, 1997b; Kesner, 2000). Així mateix, les lesions del còrtex PL també augmenten el nombre d'errors en una tasca de no aparellament demorat amb la posició quan s'augmenta la demora entre la presentació de l'estímul i la resposta (Delatour i Gisquet-Verrier, 1996; Delatour i Gisquet-Verrier, 1999; Delatour i Gisquet-Verrier, 2000), tot i que no tots els treballs han obtingut aquests resultats (Gisquet-Verrier *i col.*, 2000). A més, les lesions del PL també produeixen un deteriorament de la memòria de treball en diferents paradigmes de laberints radials (Fritts *i col.*, 1998; Ragozzino *i col.*, 1998).

Diversos estudis han revelat la participació del sistema colinèrgic al còrtex PL en la modulació de la memòria de treball. En aquest sentit, s'ha observat que les infusions d'escopolamina al còrtex PL deterioren tasques de memòria de treball, sobretot quan s'augmenta la demora o la dificultat de la tasca (Brito *i col.*, 1989; Broersen *i col.*, 1995; Granon *i col.*, 1995; Ragozzino i Kesner, 1998). A més, el dèficit induït per l'escopolamina es reverteix amb infusions d'oxotremorina, un agonista muscarínic, suggerint que l'impediment es produiria específicament per un bloqueig muscarínic (Ragozzino i Kesner,

1998). En canvi, pocs estudis han avaluat el paper dels receptors nicotínics del còrtex PL en la memòria de treball, tot i que s'ha mostrat que el seu bloqueig també deteriora la memòria de treball en una tasca d'aparellament demorat amb la mostra però, en canvi, no en una tasca de no aparellament demorat amb la mostra (Granon *i col.*, 1995).

A part de la influència colinèrgica, altres estudis han mostrat que les aferències dopaminèrgiques al còrtex PL també participen en la modulació de la memòria de treball. Per exemple, s'ha observat que la depleció dopaminèrgica a l'EPFm amb 6-hidroxidopamina (6-OHDA) impedeix l'execució de tasques d'alternança demorada espacial (Bubser i Schmidt, 1990). A més, el bloqueig dels receptors dopaminèrgics D1 en el PL provoca dèficits dependents de la dosi en una tasca d'aparellament demorat amb la posició (Broersen *i col.*, 1995; Seamans *i col.*, 1998). Tot i així, una activitat dopaminèrgica realçada en l'EPF també impedeix les respostes demorades. Per exemple, l'administració d'agonistes dopaminèrgics D1 o la inducció farmacològica de nivells alts de dopamina en l'EPF impedeixen tasques d'alternança demorada en laberint radial (Arnsten, 1997; Murphy *i col.*, 1996a; Murphy *i col.*, 1996b; Zahrt *i col.*, 1997). Aquest fet indica que el manteniment de l'activitat dels receptors D1 en l'EPF dins un interval òptim és essencial per una correcta memòria de treball. D'altra banda, la majoria d'estudis no han trobat efecte del bloqueig dels receptors D2 en el PL sobre la memòria de treball (Brito *i col.*, 1989; Seamans *i col.*, 1998).

El paper del PL és, no obstant, més complex que una implicació general en totes les tasques que requereixen memòria de treball ja que augmentant la demora no sempre es produeixen dèficits majors en subjectes amb el PL lesionat (veure Chudasama *i col.*, 2004). En aquest sentit, un treball recent (Gisquet-Verrier i Delatour, 2006) mostra que les lesions del PL-IL només impedeixen l'execució de tasques demorades espacials sota circumstàncies específiques. Per exemple, les lesions del PL no afecten a l'execució d'una tasca demorada espacial encara que s'augmenti la demora, en canvi sí que provoquen dèficits quan els subjectes han de canviar d'un paradigma no demorat a demorat o quan se'ls hi presenta un element distractor durant el període de demora. Altres estudis, a més, mostren que el dèficit induït per les lesions del PL pot augmentar molt si es dificulta la selecció de resposta, per exemple augmentant el nombre d'alternatives de resposta (revisat a Granon i Poucet, 2000). A més, els dèficits induïts per les lesions del PL augmenten quan la tasca requereix canviar d'una estratègia a una l'altra un cop l'estratègia inicial ha estat apresada (Granon i Poucet, 1995; Ragozzino *i col.*, 1999a; Ragozzino *i col.*, 1999b) o canviar l'estratègia que l'animal utilitzaria de manera natural i espontània (Granon *i col.*, 1994). Per tant sembla que el PL no seria tant necessari pel simple manteniment d'una informació

específica sinó que intervindria, especialment, quan algun canvi, com la introducció d'una demora o d'un element distractor inesperat, alterés la situació inicial.

Per aquest motiu, alguns autors han implicat el còrtex PL en processos relacionats amb l'atenció i la flexibilitat conductual. Hi ha molt treballs que demostren el paper de l'EPF en **funcions atencionals** (Birrell i Brown, 2000; Broersen i Uylings, 1999; Bussey *i col.*, 1997; Chudasama *i col.*, 2003; Dalley *i col.*, 2004a; Dias *i col.*, 1996). Per exemple, Olton *i col.* (1988) van mostrar que les lesions de l'EPFm afectaven l'atenció dividida ja que els subjectes que havien estat lesionat en aquesta regió no podien posar atenció a diferents punts d'informació al mateix temps en un tasca operant. Més específicament, estudis que han realitzat lesions restringides al còrtex PL han observat dèficits en la tasca de 5-CSRT i en altres tasques similars (Broersen i Uylings, 1999; Muir *i col.*, 1996; Passetti *i col.*, 2003). En canvi, el dany al PL no sembla que provoqui dèficits quan la tasca es realitza amb condicions de baixa demanda atencional, per exemple presentant dos, i no cinc, estímuls visuals (Granon *i col.*, 1998). D'altra banda, aquest mateix estudi mostra un paper central del PL, no només en l'atenció selectiva, sinó també en el manteniment de l'atenció sostinguda, per exemple per detectar i reaccionar davant un canvi subtil en una intensitat lluminosa (Granon *i col.*, 1998). Aquests resultats suggereixen, doncs, que el PL està implicat en tasques que requereixen control dels processos atencionals, és a dir, tasques que són difícils o que exigeixen al subjecte centrar-se activament en un estímulo. En canvi, les tasques que impliquen una actuació atencional més automàtica sembla que no depenen tant del PL (Williams *i col.*, 1999).

S'ha suggerit que les projeccions colinèrgiques serien, en part, responsables del paper del còrtex PL en l'atenció. Tenint en compte que les lesions colinèrgiques específiques del PB produeixen dèficits en diferents tasques atencionals, i que aquestes neurones colinèrgiques projecten a l'EPFm (veure apartat 2.1 i 2.2) (Chiba *i col.*, 1995; McGaughy *i col.*, 1996; Turchi i Sarter, 1997) diferents estudis s'han centrat en el rol de les projeccions colinèrgiques al PL en l'atenció. En aquest sentit, les lesions colinèrgiques amb 192 IgG-saporina de l'EPFm deterioren certes tasques atencionals (Dalley *i col.*, 2004b), alteren l'atenció sostinguda especialment en condicions d'alta demanda atencional (Gill *i col.*, 1999) i disminueixen l'activitat de les neurones del còrtex PL durant l'execució d'una tasca d'atenció sostinguda (Gill *i col.*, 2000). A més, s'ha observat que les infusions d'escopolamina al còrtex PL deterioren tasques d'alta demanda atencional especialment quan els estímuls es presenten de manera aleatòria i no de manera predictable (Chudasama *i col.*, 2004; Williams *i col.*, 1999). D'altra banda, estudis de microdiàlisi *in vivo* han mostrat increments sostinguts de l'alliberació d'ACh al PL durant l'execució d'una tasca atencional (Dalley *i col.*, 2001; Passetti *i col.*, 2000) així com una correlació positiva entre

l'alliberació d'ACh en el còrtex PL i els nivells de demanda atencional de la tasca (McGaughy *i col.*, 2002) (veure apartat 2.2).

Alhora, altres sistemes de neurotransmissió prefrontal han estat involucrats en la modulació de les tasques atencionals. Per exemple, la infusió d'agonistes del receptor dopaminèrgic D1 al còrtex PL millora l'execució atencional, mentre que l'administració d'un antagonista D1 provoca dèficits atencionals i, en canvi, la infusió d'un antagonista de D2 no té efectes (Granon i Poucet, 2000). Altres estudis, a més, mostren un augment de l'alliberació de dopamina al PL durant l'execució de tasques atencionals (Dalley *i col.*, 2001). A banda, també s'ha demostrat la participació de la serotonina i la noradrenalina durant l'execució de tasques atencionals tot i que el seu paper ha estat menys estudiat (revisat a Dalley *i col.*, 2004b).

D'altra banda, diferents treballs mostren el paper del còrtex PL en la **flexibilitat cognitiva**. En aquest sentit, s'ha observat que la lesió o la inactivació temporal del còrtex PL dificulta el canvi a noves estratègies o regles que impliquen el canvi de modalitat sensorial (extra-modal), com el canvi de pistes espacials a visuals i a la inversa en el laberint aquàtic de Morris (de Bruin *i col.*, 1994) i en la tasca *Cheese-board*, un aparell circular amb 177 forats on s'ubica el reforç que l'animal ha de trobar (Ragozzino *i col.*, 1999b). Les lesions del PL també dificulten el canvi de pistes olfactòries a espacials i a la inversa en una tasca de discriminació (Ragozzino *i col.*, 2003), així com el canvi de paradigma de no aparellament a aparellament demorat amb la mostra (Dias i Aggleton, 2000; Joel *i col.*, 1997b). Així mateix, la inactivació o lesió del còrtex PL augmenta el nombre de respostes perseverants (Birrell i Brown, 2000; Dias i Aggleton, 2000; Granon *i col.*, 1994; Ragozzino *i col.*, 1999a), disminueixen la capacitat de planificar noves trajectòries en un laberint aquàtic (Granon i Poucet, 1995), i impedeixen la flexibilitat en diferents tasques espacials i visuals (Delatour i Gisquet-Verrier, 2000; Gisquet-Verrier i Delatour, 2006; Ragozzino *i col.*, 1999a; Seamans *i col.*, 1995). En canvi, els efectes de les lesions del PL són menys severs quan es requereix flexibilitat cognitiva en una mateixa modalitat sensorial (intra-modal) (Birrell i Brown, 2000; Chudasama *i col.*, 2001; de Bruin *i col.*, 1994; Joel *i col.*, 1997a; Ragozzino *i col.*, 1999a; Ragozzino *i col.*, 2003; Ragozzino *i col.*, 1999b), tot i que no tots els treballs coincideixen amb aquest resultat (Li i Shao, 1998) especialment si s'augmenta la dificultat de la tasca (Bussey *i col.*, 1997). Així mateix, el còrtex PL no sembla ser crític per l'aprenentatge de tasques espacials simples, per l'adquisició de discriminacions visuals, espacials ni olfactòries, ni per la discriminació condicional (Birrell i Brown, 2000; Botreau *i col.*, 2004; Brito i Brito, 1990; Bussey *i col.*, 1997; Chudasama *i col.*, 2001; de Bruin *i col.*, 1994; Delatour i Gisquet-Verrier, 2000;

Granon *i col.*, 1996; Joel *i col.*, 1997a; Lacroix *i col.*, 1998; Li i Shao, 1998; Ragozzino *i col.*, 1999a; Ragozzino *i col.*, 2003; Seamans *i col.*, 1995).

El fet que les lesions del PL provoquin respostes perseverants, suggereix que el PL és una àrea important en la **inhibició de conductes** prèviament apreses o que són innates per a resoldre alguna tasca o acció. En aquest sentit, les lesions del PL produeixen un deteriorament de l'evitació passiva (Jinks i McGregor, 1997), de l'evitació activa d'un sentit (Brito i Brito, 1990) i dels processos d'inhibició de resposta en una tasca de *visual timing* (Broersen i Uylings, 1999). Així mateix, les lesions que també involucren el còrtex IL produeixen un augment en la resistència a l'extinció en un condicionament de por (Morgan i LeDoux, 1995; Morgan *i col.*, 1993). No obstant, no tots els treballs coincideixen en el paper del PL en la inhibició de la por. Per exemple, en un treball realitzat per Gewirtz *i col.* (1997) els subjectes amb lesions electrolítiques del PL-IL no van mostrar dèficits en la inhibició de la por condicionada ni en la seva extinció. Els autors atribueixen les discrepàncies amb els anteriors treballs a diferències en els protocols utilitzats, per exemple la naturalesa de l'estímul condicionat utilitzat, suggerint que el rol de l'EPFm en la inhibició de la por condicionada seria molt específic.

La flexibilitat cognitiva és, a més, necessària per aprendre a realitzar accions dirigides a un objectiu, amb una intenció, i per tant per a planificar estratègies per arribar-hi. En aquest sentit, s'ha demostrat que el còrtex PL és una estructura necessària per a la detecció de **contingències instrumentals** d'acció-resultat, és a dir, per la detecció de relacions predictives entre les accions i els seus posteriors resultats, així com per a adaptar-se a les manipulacions d'aquestes contingències (Balleine i Dickinson, 1998; Killcross i Coutureau, 2003). Quan els subjectes aprenen noves respostes conductuals, responen inicialment de manera voluntària i dirigida a un objectiu concret, el que en humans es coneix com intenció. El sobreentrenament de la mateixa resposta, però, comporta el desenvolupament d'un hàbit, que ja no és voluntari ni dirigit i molt menys flexible. En rosegadors aquest pas d'una resposta dirigida a un hàbit s'avalua per la sensibilitat que mostren els animals als canvis en el valor del reforç. L'entrenament d'una resposta provoca que els subjectes ja no notin un canvi en el valor del reforç, indicant que la resposta s'ha convertit en un hàbit. Els subjectes amb lesions en el còrtex PL, però, no mostren aquesta sensibilitat al canvi en el valor del reforç, és a dir, no modifiquen la seva resposta encara que es devaluï el reforç. Aquest fet suggereix que els subjectes amb lesions al PL no poden actuar de manera dirigida a l'objectiu i que, per tant, el còrtex PL seria, en part, responsable de l'execució de respostes voluntàries dirigides (Killcross i Coutureau, 2003).

El mecanisme neuroquímic a través del qual el PL participa en la flexibilitat cognitiva és poc conegut, però un dels neurotransmissors que s'han proposat és l'ACh. En aquest sentit, s'han registrat alts nivells d'ACh en el còrtex PL durant l'extinció d'una resposta de prémer la palanca (Izaki *i col.*, 2001) i s'ha observat que el bloqueig dels receptors nicotínics en el PL just abans del primer assaig d'extinció impedeix la reducció de la resposta des de la primera sessió d'entrenament (Maruki *i col.*, 2003). En canvi, la infusió d'un antagonista muscarínic no afecta a l'extinció en el primer assaig però impedeix un segon assaig d'extinció un dia després, suggerint un efecte entre sessions (Maruki *i col.*, 2003). Així mateix, els ratolins *knock-out* pel receptor muscarínic M2 mostren dèficits de flexibilitat cognitiva per poder canviar d'estratègia alhora de realitzar una tasca en un laberint circular (Seeger *i col.*, 2004). D'altra banda, la funció dopaminèrgica també s'ha mostrat important per la flexibilitat al PL. Per exemple, el bloqueig dels receptors dopaminèrgics D1 al PL impedeix el canvi d'estratègia entre un paradigma de discriminació de resposta i un de discriminació visual (Ragozzino, 2002) i les lesions dopaminèrgiques de l'EPFm impedeixen l'extinció en un condicionament de por, tot i que no n'afecten la seva adquisició (Morrow *i col.*, 1999). Així mateix, estudis de microdiàlisi han registrat un augment de l'alliberació de dopamina al PL i a l'IL durant la sessió inicial d'extinció d'una tasca de condicionament a la por (Wilkinson *i col.*, 1998).

Finalment, alguns treballs han mostrat que el PL també participa en la modulació de la memòria a llarg termini. Estudis realitzats en el laboratori de Sara han demostrat que el PL és necessari per la consolidació d'una tasca de discriminació olfactiva. Per exemple, s'ha vist que l'expressió de c-Fos en aquesta àrea augmenta 90 minuts després de l'entrenament d'una tasca de discriminació olfactiva (Tronel i Sara, 2002). A més, estudis farmacològics han mostrat que els diferents tipus de receptors del PL tindrien una implicació temporal diferenciada en la consolidació de la tasca de discriminació olfactiva. En aquest sentit, la infusió d'APV, un antagonista dels receptors NMDA, immediatament després de l'entrenament provoca una amnèsia profunda i duradora d'aquesta tasca. En canvi, la infusió no té efecte si s'administra dues hores després de l'entrenament (Tronel i Sara, 2003). Contràriament, la infusió d'un antagonista noradrenèrgic impedeix la consolidació de la memòria si s'administra dues hores després de l'entrenament, però no si s'administra immediatament després (Tronel *i col.*, 2004).

En resum, sembla que el còrtex PL en rosegadors, igual que en les espècies superiors, estaria implicat en diversos processos cognitius incloent processos de memòria de treball i a llarg termini, funcions atencionals i flexibilitat cognitiva (Taula 3.2.1) que permetrien l'organització i l'expressió d'un comportament adaptatiu en circumstàncies noves (Dalley *i col.*, 2004b; Gisquet-Verrier i Delatour, 2006).



PARADIGMA	MANIPULACIÓ	RESULTATS	ESTUDI
Evitació passiva	Lesió electrolítica	↑ latència a la reixa electrificada (entrenament) = latència a la reixa electrificada (test)	Jinks i McGregor, 1997 (PL)
Evitació activa d'un sentit	Lesió electrolítica	↓ l'execució	Brito i Brito, 1990 (PL)
Resposta emocional condicionada	Lesió electrolítica	= adquisició ( <i>freezing</i> ) ↑ resistència a l'extinció	Morgan i LeDoux, 1995; Morgan <i>i col.</i> , 1993 (PL+IL)
		= adquisició = inhibició condicionada de la resposta de potenciació de l'ensurt ( <i>fear-potentiated startle</i> ) = extinció de la resposta de potenciació de l'ensurt ( <i>fear-potentiated startle</i> ) i de congelament ( <i>freezing</i> )	Gewirtz <i>i col.</i> , 1997 (PL+ <u>IL</u> )
	Lesió 6-OHDA	= adquisició ( <i>freezing</i> ) ↑ resistència a l'extinció	Morrow <i>i col.</i> , 1999 (EPFm)
Condicionament d'aversion al gust	Lesió electrolítica	↓ l'aprenentatge	Brito i Brito, 1990 (PL)
Gàbia operant	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R NMDA)	= adquisició ↓ sensibilitat a la devaluació del reforç	Killcross i Coutureau, 2003 (PL)
	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	= Entrenament d'extinció inicial ↓ Entrenament d'extinció 24 h	Maruki <i>i col.</i> , 2003 (PL)
	Mecamilamina (Antagonista R nicotínics)	↓ Entrenament d'extinció inicial ↓ Entrenament d'extinció 24 h	
Discriminació visual	Lesió mecànica	= adquisició ↓ reversió de l'aprenentatge	Li i Shao, 1998 (PL)
	Lesió electrolítica	= adquisició	Brito i Brito, 1990 (PL)
	Lesió NMDA (Agonista R NMDA)	= adquisició = reversió de l'aprenentatge	Chudasama <i>i col.</i> , 2001

			(PL)
	Lesió àc. Quinolínic (Agonista R NMDA)	= adquisició ↓ reversió quan els estímuls són difícils de discriminar	Bussey <i>i col.</i> , 1997 (EPFm)
	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	= adquisició	Brito <i>i col.</i> , 1989 (PL)
		= adquisició	Granon <i>i col.</i> , 1995 (PL)
	Bungarotoxina (Antagonista R nicotínics)	= adquisició	
	Sulpiride (Antagonista R D2)	= adquisició	Brito <i>i col.</i> , 1989 (PL)
Discriminació visual, olfactiva i de textura	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R NMDA)	= adquisició = reversió de l'aprenentatge ↓ l'execució al canviar de pistes visuals a olfactives i textures i viceversa	Birrell i Brown, 2000 (PL+IL)
Discriminació olfactiva	Bupivacaine 2% (Anestèsic local)	= adquisició = reversió de l'aprenentatge ↓ l'execució al canviar de pistes olfactives a espacials	Ragozzino <i>i col.</i> , 2003 (PL+IL)
Discriminació de lloc		= adquisició ↓ l'execució al canviar de pistes espacials a olfactives	
Discriminació visual i de resposta	SCH-23390 (SCH) (Antagonista R D1)	↓ l'execució al canviar d'un paradigma de discriminació de resposta a un de discriminació visual i viceversa. = adquisició ↑ Respostes perseverants	Ragozzino, 2002 (IL+PL)
Alternança demorada en laberint en T i radial	Lesió electrolítica	↓ l'execució, especialment en llargues demores	Brito i Brito, 1990 (PL)
	Lesió 6-OHDA	↓ l'execució	Bubser i Schmidt, 1990 (EPFm)
	SKF 81297 (Agonista total R D1)	↓ l'execució depenent de la dosi	Zahrt <i>i col.</i> , 1997 (PL)

Alternança no demorada laberint radial	Lesió 6-OHDA	= l'execució	Bubser i Schmidt, 1990 (EPFm)
Laberint aquàtic de Morris	Lesió per radiofreqüència	= adquisició i record de la tasca espacial = reversió de l'aprenentatge ↓ l'execució al canviar de pistes espacials a visuals	de Bruin <i>i col.</i> , 1994 (PL+IL)
		= aprenentatge si s'ha d'arribar a la localització fixada sortint des de 1 o 2 posicions diferents ↓ aprenentatge si s'ha d'arribar a la localització fixada sortint des de 4 posicions diferents (dèficit específic per les 2 noves posicions introduïdes)	Granon i Poucet, 1995 (PL)
Laberint radial	Lesió electrolítica	↓ adquisició	Fritts <i>i col.</i> , 1998 (PL)
		= adquisició = en la reversió de l'aprenentatge	Joel <i>i col.</i> , 1997a (PL)
	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R NMDA)	Estratègia de <i>win-shift</i> no demorada: = adquisició ↓ transitòria de l'execució al canviar a un paradigma demorat (introducció d'1 min de demora)	Gisquet-Verrier i Delatour, 2006 (PL+IL)
		Estratègia de <i>win-shift</i> demorada: = adquisició que no s'impedeix si s'augmenta la demora (de 5 a 30 min) ↓ de l'execució si s'introdueix un element distractor en el període de demora (col·locar l'animal en un entorn nou)	
	Lesió àc. Quinolinic (Agonista R NMDA)	↓ memòria de treball	Ragozzino <i>i col.</i> , 1998 (PL+IL)
	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	↓ memòria de treball depenent de la dosi, reversible amb l'administració concomitant d'oxotremorina	Ragozzino i Kesner, 1998 (PL+IL)
	SCH-23390 (SCH) (Antagonista R D1)	Tasca de cerca de menjar: - Estratègia de <i>win-shift</i>	Seamans <i>i col.</i> , 1998

		demorada: ↓ memòria de treball, depenent de dosi (test) - Estratègia de cerca a l'atzar no demorada: = adquisició	(PL)
	Sulpiride (Antagonista R D2)	Tasca de cerca de menjar: - Estratègia de <i>win-shift</i> demorada: = memòria de treball (test) - Estratègia de cerca a l'atzar no demorada: = adquisició	
	Lidocaina 2% (Anestèsic local)	Tasca de cerca de menjar: - Estratègia de <i>win-shift</i> demorada: = adquisició (entrenament) ↓ memòria de treball (test) - Estratègia de cerca a l'atzar no demorada: = adquisició ↓ l'execució al canviar d'un paradigma de <i>win-shift</i> demorada espacial a un de cerca de menjar a l'atzar	Seamans <i>i col.</i> , 1995 (PL)
Tasca espacial <i>Cheese-board.</i>	Tetracaina 2% (Anestèsic local)	= adquisició (espacial i visual) ↓ l'execució al canviar de pistes espacials a visuals i viceversa = reversió de l'aprenentatge	Ragozzino <i>i col.</i> , 1999b (PL+IL)
Aprenentatge de lloc i de resposta	Tetracaina 2% (Anestèsic local)	↓ l'execució al canviar d'un aprenentatge espacial a un aprenentatge de resposta i viceversa = adquisició = reversió de l'aprenentatge	Ragozzino <i>i col.</i> , 1999a (IL+PL)
No aparellament demorat amb la mostra	Lesió electrolítica	↓ l'execució, que millora amb la pràctica si la demora és curta però no si la demora és llarga	Brito i Brito, 1990 (PL)
		= adquisició ↓ en la reversió d'un paradigma d'aparellament a no aparellament	Joel <i>i col.</i> , 1997b (inclou part d'AC)

	Lesió per radiofreqüència	↓ l'execució. Si té experiència amb la tasca prelesió mostra dèficits inicials però recupera el nivell d'execució normal després de la lesió	Granon <i>i col.</i> , 1994 (PL)
	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	↓ l'execució	Brito <i>i col.</i> , 1989 (PL)
		↓ l'execució	Granon <i>i col.</i> , 1995 (PL)
	Bungarotoxina (Antagonista R nicotínics)	= l'execució	Granon <i>i col.</i> , 1995 (PL)
	Sulpiride (Antagonista R D2)	= l'execució	Brito <i>i col.</i> , 1989 (PL)
Aparellament demorat amb la mostra	Lesió per radiofreqüència	↓ l'execució. Encara que tingui experiència amb la tasca prelesió mostra dèficits després de la lesió	Granon <i>i col.</i> , 1994 (PL)
	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	↓ l'execució	Granon <i>i col.</i> , 1995 (PL)
	Bungarotoxina (Antagonista R nicotínics)	↓ l'execució	
No aparellament demorat amb la posició	Lesió NMDA (Agonista R NMDA)	= adquisició	Dias i Aggleton, 2000 (PL+IL)
	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R NMDA)	= adquisició ↓ l'execució si s'augmenta la demora	Delatour i Gisquet-Verrier, 1996 (PL); Delatour i Gisquet-Verrier, 1999 (PL+IL); Delatour i Gisquet-Verrier, 2000 (PL+IL)
		= adquisició = l'execució si s'augmenta la demora	Gisquet-Verrier <i>i col.</i> , 2000 (PL+IL)
Aparellament demorat amb la posició	Lesió NMDA (Agonista R NMDA)	↓ adquisició, ↑ perseverança, ↓ en la reversió d'aparellament a no aparellament	Dias i Aggleton, 2000 (PL+IL)
	Escopolamina (Antagonista R)	↓ l'execució depenent de la dosi i la demora	Broersen <i>i col.</i> , 1995

	muscarínics)	↑ latència de resposta	(PL)
	SCH-23390 (SCH) (Antagonista R D1)	↓ l'execució depenent de la dosi ↑ latència de resposta ↓ freqüència dels <i>nose-poke</i>	
Tasca combinada d'atenció i memòria (CAM)	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	= precisió i ↑ d'errors d'omissió (fase d'atenció) ↑ nombre d'errors de localització de l'estímul en la (fase de memòria) independent de la demora	Chudasama <i>i col.</i> , 2004 (PL+ AC)
5-CSRT	Lesió àc. Ibotènic (Agonista R NMDA)	↓ precisió ↑ Respostes perseverants i els errors d'omissió	Passetti <i>i col.</i> , 2003 (PL+IL)
	Lesió àc. Quinolinic (Agonista R NMDA)	↓ precisió ↑ latència de resposta ↑ respostes perseverants	Muir <i>i col.</i> , 1996 (PL inclou part de EPFm)
	192 IgG-Saporina (neurotoxina colinèrgica selectiva)	↓ precisió quan les demandes atencionals són elevades ↑ respostes perseverants quan els estímuls es presenten imprevisiblement	Dalley <i>i col.</i> , 2004b (PL+IL)
	SCH-23390 (SCH) (Antagonista R D1)	↓ precisió en els subjectes que tenien nivells basals alts precisió previs a la infusió.	Granon <i>i col.</i> , 2000 (PL)
	Sulpiride (Antagonista R D2)	= l'execució	
	SKF 38393 (Agonista parcial R D1 )	↑ precisió en els subjectes que tenien nivells basals baixos de precisió previs a la infusió. Aquests efectes s'antagonitzen amb la infusió de SCH-23390.	
3-CSRT	Lesió per radiofreqüència	↓ el percentatge de respostes correctes, ↑ errors d'omissió, ↑ latència de resposta	Broersen i Uylings, 1999 (EPFm)
<i>Visual timing task</i>		↓ respostes correctes ↑ respostes prematures, ↑ errors d'omissió	
Tasca visual d'atenció selectiva	Lesió per radiofreqüència	= execució de la tasca quan les demandes atencionals són baixes (2 estímuls)	Granon <i>i col.</i> , 1998 (PL)

Tasca visual d'atenció sostinguda		↓ en la capacitat de sostenir l'atenció prou temps per detectar i reaccionar a variacions subtils de brillantor	
Tasca de detecció de senyal	Escopolamina (Antagonista R muscarínics)	↓ precisió quan la senyal lluminosa apareix de manera aleatòria = precisió quan la senyal lluminosa apareix de manera predictiva	Williams <i>i col.</i> , 1999 (PL+IL)

**Taula 3.2.1 Efectes de diferents manipulacions experimentals en el PL sobre l'execució de diferents tasques conductuals.** En la columna "Manipulació" s'indiquen les diferents substàncies utilitzades a cada treball i en la columna "Paradigma" s'indica la tasca conductual que s'ha realitzat [6-OHDA: 6-hidroxidopamina].

# Treball Experimental



## **IV. TREBALL EXPERIMENTAL**

### **1. TREBALL 1:**

**Effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on a socially transmitted food preference and c-Fos expression.**

Boix-Trelis N., Vale-Martínez A., Guillazo-Blanch G., Costa-Miserachs D., Martí-Nicolovius M.

*Learning and Memory* 13(6), 783-793 (2006).

## 1.1 Introducció

L'NBM, a través de les seves projeccions colinèrgiques corticals, té una funció important en la modulació dels processos cognitius tant atencional com mnemònic (Everitt i Robbins, 1997; Gold, 2003; McGaughy *i col.*, 2002; Sarter *i col.*, 2003; Wenk, 1997). Diferents estudis han mostrat que l'EIC de l'NBM produeix una activació generalitzada del còrtex concomitant a l'alliberació d'ACh que correlaciona amb un millor processament sensorial, alhora que augmenta la plasticitat induïda per l'aprenentatge en els camps receptius corticals (Bringmann i Klingberg, 1990; Buzsaki *i col.*, 1988; Casamenti *i col.*, 1986; Jimenez-Capdeville *i col.*, 1997; Kurosawa *i col.*, 1989; McLin *i col.*, 2002a; McLin *i col.*, 2003; Metherate i Ashe, 1991; Metherate *i col.*, 1992; Rasmusson, 2000; Weinberger, 2003; Weinberger, 2004). Tot i així, pocs estudis han avaluat els efectes conductuals i moleculars d'aquest tractament.

A nivell conductual, alguns treballs han mostrat que l'EIC de l'NBM aparellada amb un to indueix la formació de memòria associativa específica, mesurada per canvis conductuals, com el ritme cardíac i respiratori (McLin *i col.*, 2002b; McLin *i col.*, 2003; Miasnikov *i col.*, 2006). A més, estudis previs del nostre laboratori mostren que l'EIC de l'NBM aplicada preadquisició facilita l'aprenentatge d'una tasca implícita d'EV2 (Montero-Pastor *i col.*, 2004). En aquest context, ens vam plantejar si l'estimulació de l'NBM aplicada preentrenament podria modular altres tipus d'aprenentatges i no només els implícits com l'EV2. Per aquest motiu, vam escollir la tasca de TSPA, una tasca de memòria relacional sensible a les lesions colinèrgiques de l'NBM (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a). La tasca de TSPA és una tasca social, no espacial de memòria olfactiva en la qual una rata observadora interacciona amb una altra anomenada demostradora que prèviament ha menjat un aliment aromatitzat (Galef i Wigmore, 1983). La TSPA requereix l'associació natural entre dues olors ja que durant la interacció social els observadors associen l'olor de l'aliment amb un constituent de l'alè dels demostradors (Galef *i col.*, 1988), expressant la seva memòria a través d'un augment de la preferència per l'aliment que ha menjat el demostrador (Galef *i col.*, 1985). La TSPA presenta diferents característiques que fan que es defineixi com una forma de memòria relacional: la informació s'aprèn ràpidament fins i tot en un únic episodi, i implica l'expressió de la memòria en una situació d'elecció de menjar que és molt diferent del context social en el que es produeix l'episodi d'aprenentatge. A més, els subjectes observadors han de fer un ús flexible de la informació olfactiva ja que només un dels dos estímuls que han format l'associació durant l'aprenentatge (l'aroma de l'aliment) és present en el test de preferències per poder guiar el comportament del subjecte (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995).

D'altra banda, no hi ha treballs que caracteritzin a nivell molecular els efectes de l'EIC de l'NBM. Només un únic estudi ha estudiat la inducció de RNAm de *c-fos* al còrtex cerebral després de l'estimulació de l'NBM, però en aquest cas en resposta a la infusió unilateral d'àcid kaínic (Wood i de Bellerocche, 1991). El gen de resposta immediata *c-fos* es considera un indicador d'activació neural involucrat en els canvis del funcionament cel·lular lligats a la plasticitat i a l'aprenentatge (Herdegen i Leah, 1998; Herrera i Robertson, 1996) i l'estudi de la seva expressió s'ha utilitzat àmpliament com a marcador d'activitat neuronal (Sagar *i col.*, 1988).

En aquest context, en aquest primer treball ens vam plantejar aprofundir en els efectes de l'EIC de l'NBM realitzant dos experiments:

- En l'experiment 1 vam avaluar els efectes de l'EIC de l'NBM preentrenament en una tasca d'aprenentatge relacional de TSPA.
  
- En l'experiment 2 vam determinar l'expressió de la proteïna c-Fos per identificar regions cerebrals activades pel tractament d'EIC de l'NBM.

## 1. 2 Experiment 1

### **1.2.1. Objectius i Procediment**

- Avaluar els efectes de l'EIC de l'NBM aplicada preentrenament sobre la preferència pel menjar transmesa socialment juntament amb altres variables involucrades en la TSPA , en dos intervals de retenció (immediat i 24 hores).

Per aconseguir aquest objectiu, vam utilitzar 57 subjectes que vam distribuir aleatòriament en els següents grups experimentals:

	<b>TEST IMMEDIAT</b>	<b>TEST 24 HORES</b>
<b>EIC</b> (estimulació a l'NBM)	n=15 (NBM-I)	n=14 (NBM-24)
<b>CONTROL</b> (elèctrode implantat a l'NBM, però sense estimulació)	n=14 (Control-I)	n=14 (Control-24)

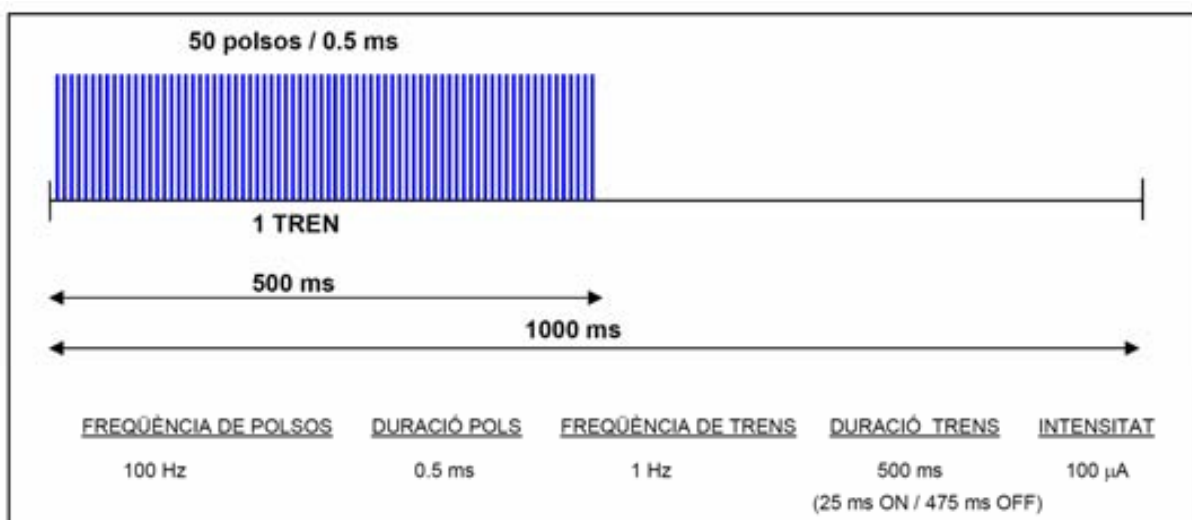
**Taula 1. Nombre total de subjectes utilitzats en l'experiment 1 distribuïts en cada grup experimental.**

El procediment va consistir en l'aplicació d'una única sessió d'EIC (Figura 1) de 20 minuts de durada i 100 $\mu$ A d'intensitat (grups NBM-I i NBM-24) immediatament abans de l'entrenament de la TSPA. Els subjectes del grup control (Control-I i Control-24) també es col·locaven a la gàbia d'EIC però en cap moment rebien estimulació elèctrica. L'entrenament estava format per tres sessions d'interacció social de 20 minuts de durada cadascuna, en les quals el subjecte observador interaccionava amb un subjecte demostrador que prèviament havia menjat un aliment aromatitzat (cacau o canyella). Les sessions d'interacció social es realitzaven separades per períodes d'una hora i immediatament després de la tercera interacció (NBM-I i Control-I) o 24 hores més tard (NBM-24 i Control-24) es realitzava el test de retenció (Figura 2). Durant el test, als subjectes observadors se'ls hi presentaven dos pots de menjar, un pot contenia el menjar aromatitzat que havien olorat dels demostradors (menjar entrenat) i l'altre pot contenia menjar aromatitzat no familiar (menjar no entrenat) i se'ls permetia menjar lliurement durant 45 minuts. Finalitzat aquest període, es calculava el percentatge de preferència pel menjar entrenat: (consum de menjar entrenat/consum total) x 100.

La mesura del percentatge de preferència s'utilitza com a índex d'aprenentatge i és, per tant, la mesura principal. No obstant, vam considerar altres variables no cognitives que es podrien haver vist afectades per l'EIC de l'NBM i que podrien haver influenciat els nostres resultats. Per aquest motiu, vam enregistrar amb una càmera de vídeo el

comportament dels subjectes durant les tres interaccions socials i posteriorment vam visualitzar i analitzar diferents paràmetres que es produïen durant la interacció social. Els comportaments que es van registrar van ser: número de vegades que el subjecte observador olorava el musell, el cos i la zona anogenital del demostrador, així com els episodis de neteja (*groomings*) de l'observador i de lluita entre el demostrador i l'observador. A més, per avaluar possibles efectes en el grau d'exploració dels animals o en el seu comportament motor, vam analitzar el nombre de vegades que els subjectes pujaven amb les potes davanteres sobre els pots de menjar durant el test.

Per controlar l'especificitat del tractament d'EIC, es van realitzar anàlisis complementàries comparant l'execució en la TSPA dels subjectes experimentals estimulats a l'NBM amb els subjectes que havien estat estimulats però que no van formar part de l'anàlisi principal perquè tenien l'elèctrode involuntàriament implantat fora de l'NBM (càpsula interna, globus pàl·lid lateral i nucli reticular talàmic).



**Figura 1. Característiques del corrent elèctric administrat durant el tractament d'EIC.** El tractament d'estimulació va consistir en l'aplicació de trens de polsos quadrats d'1Hz de freqüència i 500ms de durada cada tren. La freqüència de polsos va ser de 100 Hz i la durada de 0.5 ms. Per tant, en els 500 ms de durada de cada tren, es van administrar 50 polsos de 0.5 ms que equival a 25 ms d'estimulació elèctrica i 475 ms de pausa a cada tren.

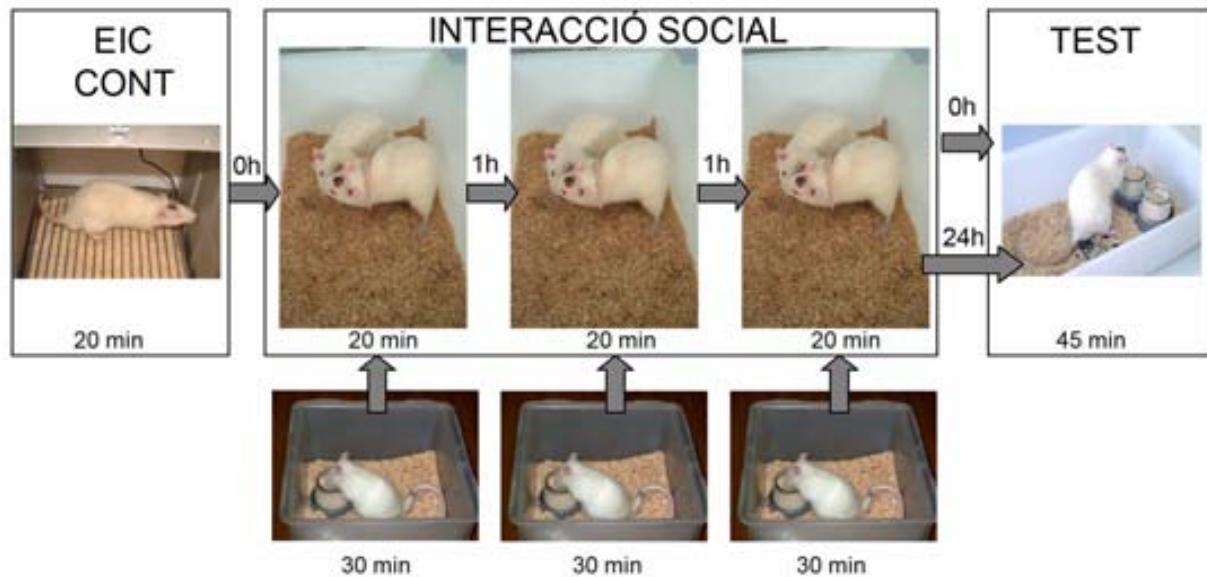


Figura 2. Resum de les etapes de la tasca de transmissió social de preferència alimentària.

### 1.2.2. Resum dels Resultats

Els principals resultats obtinguts en aquest experiment van ser els següents:

- L'estimulació de l'NBM va facilitar la retenció de la TSPA, mesurada per la preferència pel menjar entrenat, independentment del moment en que es realitzava el test (immediat o 24 hores).
- L'estimulació de l'NBM, en canvi, no va afectar d'altres variables com la motivació pel consum d'aliment, canvis en la neofòbia, ni cap dels paràmetres analitzats durant les interaccions (número de vegades que el demostrador olora el musell, cos i zona anogenital del demostrador, número de *groomings* o episodis de lluita) ni durant el test (activitat exploratòria).
- Els subjectes que van ser estimulats fora de l'NBM no van mostrar un augment de la preferència pel menjar entrenat respecte els subjectes controls, en canvi, sí que es van diferenciar significativament dels subjectes que van rebre l'estimulació en l'NBM.

Aquests resultats mostren que l'EIC de l'NBM aplicada preentrenament facilita l'adquisició de la TSPA, una tasca de memòria relacional d'associació de dues olors. A més, no sembla probable que la millora observada en la TSPA sigui deguda a factors secundaris com la motivació pel menjar, la neofòbia o l'exploració ja que aquestes variables no s'han vist afectades pel tractament d'estimulació.

Aquestes dades amplien els resultats previs obtinguts en el nostre laboratori que mostraven que l'EIC de l'NBM facilita l'adquisició d'una tasca implícita d'EV2 (Montero-Pastor *i col.*, 2004), alhora que són consistents amb altres estudis que mostraven que les cèl·lules colinèrgiques de l'NBM són necessàries per l'adquisició i la formació de memòria de la TSPA (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a).

### 1.3. Experiment 2

#### **1.3.1. Objectius i Procediment**

- Avaluar els efectes de l'EIC de l'NBM en l'activació de diferents regions corticals i subcorticals mitjançant l'anàlisi de l'expressió de la proteïna c-Fos.

Per aconseguir aquest objectiu, vam utilitzar 25 subjectes que vam distribuir aleatòriament en els següents grups experimentals:

<b>EIC</b> (estimulació a l'NBM)	n=12 (NBM)	
<b>CONTROL</b> (elèctrode implantat a l'NBM, sense estimulació)	n= 8	n=13 (Control)
<b>SHAM</b> (procediment quirúrgic sense elèctrode)	n= 5	

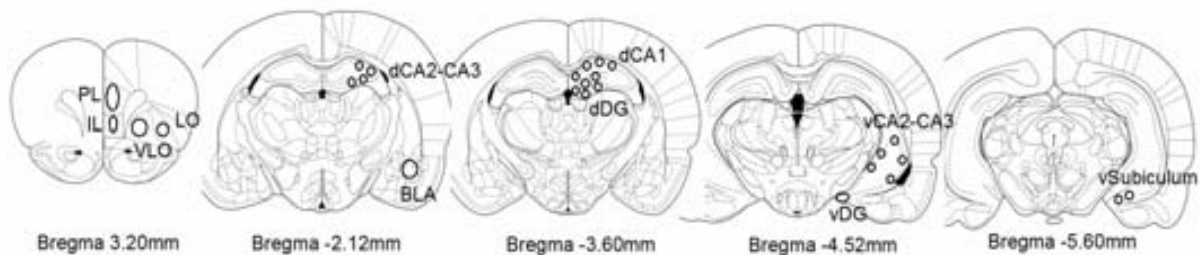
**Taula 2. Nombre total de subjectes utilitzats en l'experiment 2 distribuïts en cada grup experimental.**

El procediment consistia en l'aplicació d'una única sessió d'EIC de 20 minuts de durada i 100  $\mu$ A d'intensitat (grup NBM) de característiques idèntiques a les utilitzades en l'experiment 1. Els subjectes del grup control (Control i Sham) també es col·locaven a la gàbia d'EIC però en cap moment rebien estimulació elèctrica. Dues hores després de la sessió d'estimulació, els subjectes eren sacrificats i perfusionats per tal d'extreure'n els cervells. Posteriorment, s'obtenien seccions coronals de 25 $\mu$ m representatives de tot el cervell en les quals es realitzava una tècnica immunohistoquímica per la detecció de c-Fos. L'expressió de c-Fos es va estudiar en regions cerebrals implicades en la TSPA com la formació hipocampal (CA dorsal i ventral, gir dentat (GD) dorsal i ventral i subicle ventral) i el còrtex OFC (orbital ventrolateral (VLO) i orbitofrontal lateral (LO)). A més, es van seleccionar regions addicionals com altres regions prefrontals (còrtex prelímbic (PL) i infralímbic (IL)) i l'amígdala basolateral (ABL) pel fet de ser importants dianes de projeccions des de l'NBM (Figura 3). Aquestes àrees es fotografiaven amb una càmera digital acoblada al microscopi per tal de fer-ne l'anàlisi. La quantificació dels nuclis positius per c-Fos es va realitzar mitjançant el programa *Image Processing and Analysis in Java 1.33* (Image J, NIH, disponible a <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Totes les regions cerebrals es van analitzar de manera bilateral per cada subjecte en tres seccions per cada àrea per tal d'obtenir la mitjana de nuclis positius per c-fos/mm<sup>2</sup> pels hemisferis ipsi i contralateral a l'elèctrode.

Igual que en l'experiment 1, es van realitzar anàlisis complementàries comparant l'expressió de c-Fos dels subjectes experimentals amb els subjectes que van ser estimulats



però que no van formar part de l'anàlisi principal perquè tenien l'elèctrode involuntàriament implantat fora de l'NBM (càpsula interna, globus pàl·lid lateral i nucli reticular talàmic).



**Figura 3.** Representació de les àrees analitzades. Prelímbic (PL), infralímbic (IL), còrtex orbital ventrolateral (VLO), orbitofrontal lateral (LO), amígdala basolateral (BLA), regions hipocampals: CA1 dorsal (dCA1), CA2-CA3 dorsal (dCA2-CA3), gir dentat dorsal (dDG), CA2-CA3 ventral (vCA2-CA3), gir dentat ventral (vDG) i subicle ventral (vSubiculum).

### 1.3.2. Resum dels Resultats

Els principals resultats obtinguts en aquest experiment són els següents:

- L'estimulació de l'NBM va provocar un augment de l'expressió de c-Fos bilateral en regions prefrontals com el còrtex orbitofrontal (VLO i LO), PL i IL i en algunes regions hipocampals com CA dorsal i GD ventral. En canvi, no es van observar diferències entre grups en l'expressió de c-Fos a ABL, al GD dorsal, a CA ventral ni al subicle ventral.
- Els subjectes que van ser estimulats fora de l'NBM no van mostrar diferències respecte els subjectes control en l'expressió de c-Fos en cap de les regions estudiades. A més, es van observar diferències entre les rates estimulades dins i fora de l'NBM en les regions on s'havien trobat diferències entre els subjectes controls i estimulat en l'NBM.

Aquests resultats mostren que l'EIC de l'NBM augmenta l'expressió de c-Fos en el còrtex prefrontal i en algunes regions hipocampals que s'han mostrat rellevants per la memòria associativa d'olors (Ross i Eichenbaum, 2006; Ross *i col.*, 2005). Per tant, sembla que la contribució de l'NBM a la TSPA podria estar mitjançada per la modulació de l'activitat d'aquestes àrees.

# Effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on a socially transmitted food preference and c-Fos expression

Núria Boix-Trelis, Anna Vale-Martínez,<sup>1</sup> Gemma Guillazo-Blanch, David Costa-Miserachs, and Margarita Martí-Nicolovius

Departament de Psicobiologia i Metodologia de les Ciències de la Salut Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 08193, Spain

Experiment 1 examined the effects of electrical stimulation of nucleus basalis magnocellularis (NBM) on a relational odor-association task—the social transmission of food preference (STFP). Rats were stimulated unilaterally in the NBM for 20 min (100  $\mu$ A, 1 Hz) immediately before the social training. They were tested on their ability to remember preference for the trained food either immediately or following a 24-h delay. Stimulation of NBM improved retention regardless of delay, and additional behavioral measures (social interaction, motor activity, or exploration) did not account for such effects. Experiment 2 investigated brain regions activated after NBM electrical stimulation by examining the induction of c-Fos. This treatment led to bilateral increased c-Fos expression in prefrontal regions, such as orbitofrontal, prelimbic, and infralimbic cortices, and some hippocampal subregions (dorsal CA and ventral dentate gyrus). In contrast, no differences between groups in c-Fos expression were found in basolateral amygdala, dorsal dentate gyrus, ventral CA, or ventral subiculum. Present findings indicate that pretraining NBM electrical stimulation facilitates the acquisition of STFP, supporting a role of NBM in the early stages of memory formation, and suggest that the treatment might cause such effects by inducing neural changes, related to transcription factors such as c-Fos, in the prefrontal cortex or the hippocampal formation.

The nucleus basalis magnocellularis (NBM) of the basal forebrain provides the major cholinergic innervation to the prefrontal, frontal, and parietal areas of the cerebral cortex (Johnston et al. 1979; Lehmann et al. 1980; Wenk et al. 1980; Mesulam et al. 1983; Woolf et al. 1983; Casamenti et al. 1986; Kurosawa et al. 1989) and also sends extensive projections to the amygdala (Mesulam et al. 1983). NBM neurons serve an important function in the modulation of cognitive processes (Everitt and Robbins 1997; Wenk 1997; McGaughy et al. 2002; Gold 2003; Sarter et al. 2003). Numerous studies propose a well-established role of the NBM, especially its cholinergic cells, in certain attentional processes (Chiba et al. 1995; Baxter and Chiba 1999; Baxter et al. 1999; Gill et al. 2000; Himmelheber et al. 2001; Sarter et al. 2001; McGaughy et al. 2002; Lehmann et al. 2003). There is also growing evidence that implicates the cholinergic NBM in cognitive functions that may be categorized as mnemonic (Berger-Sweeney et al. 2000; Linster et al. 2001; Vale-Martínez et al. 2002; Bailey et al. 2003; Butt et al. 2003; Chudasama et al. 2004; Ridley et al. 2005; Winters and Bussey 2005), supporting findings from initial studies that showed NBM contribution to learning and memory. However, early experiments predominantly evaluated the effects of nonspecific lesions in the NBM, which damaged cholinergic and noncholinergic neurons, on spatial tasks (e.g., Wenk et al. 1989; Langlais et al. 1993).

The involvement of NBM in learning and memory may possibly be linked to its role in the modulation of cortical activity (Detari 2000; Duque et al. 2000; Semba 2000) and certain forms of synaptic plasticity (Rasmusson 2000; Verdier and Dykes 2001; Weinberger 2003). This relationship has been traditionally inves-

tigated by lesion studies; cholinergic NBM lesions diminished dendritic morphology in the cortex (Works et al. 2004) and disrupted reorganization of cortical sensorimotor representations, thus impairing motor learning (Conner et al. 2003). Nevertheless, in recent years, electrical stimulation of NBM has become progressively more helpful as a method for investigating the functional involvement of this nucleus in learning processes (Zhang et al. 2005; Miasnikov et al. 2006). Stimulation of the NBM produces a widespread activation of the cortex (Casamenti et al. 1986; Buzsáki et al. 1988; Kurosawa et al. 1989; Metherate and Ashe 1991; Metherate et al. 1992; Jimenez-Capdeville et al. 1997; Rasmusson 2000; McLin III et al. 2002) that correlates with enhanced sensory processing (Bringmann and Klingberg 1990; Hars et al. 1993; Edeline et al. 1994; Mercado et al. 2001). Furthermore, electrophysiological studies have shown that NBM electrical stimulation enhances learning-induced receptive field plasticity in the cortex, which may be regarded as a basis for the formation of specific memory traces (Bakin and Weinberger 1996; Bjordahl et al. 1998; Kilgard and Merzenich 1998; Dimyan and Weinberger 1999; Kilgard et al. 2001; Miasnikov et al. 2001; Weinberger 2003, 2004; Pandya et al. 2005; Miasnikov et al. 2006).

Nevertheless, greater knowledge of both behavioral effects on learning tasks and molecular consequences of NBM electrical stimulation is needed. Some of the few studies that have addressed the first issue have reported that electrical stimulation of the NBM paired with a tone induces the formation of specific associative memory, measured by changes in heart rate and respiration (McLin III et al. 2002) that can develop rapidly (Miasnikov et al. 2006). Pretraining NBM stimulation has also been shown to modulate performance in the acquisition of an implicit learning task, facilitating two-way active avoidance conditioning (Montero-Pastor et al. 2004). As for molecular changes induced by NBM stimulation, there is only one earlier study that has

<sup>1</sup>Corresponding author.

E-mail Anna.Vale@uab.es; fax 34-93-5812001.

Article published online before print. Article and publication are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.305306>.

characterized the induction of *c-fos* mRNA following NBM stimulation, albeit in response to a unilateral kainate injection into the NBM (Wood and de Belleruche 1991). The immediate early gene *c-fos* is believed to be an indicator of neural activation involved in changes in cellular functioning linked to plasticity (Herrera and Robertson 1996; Herdegen and Leah 1998). The cellular networks underlying the effects of NBM electrical stimulation on behavior and plasticity could therefore be appraised by examining the expression of the *c-Fos* protein.

For further insight into the effects of NBM stimulation, we carried out two experiments. Experiment 1 evaluated the effects of NBM electrical stimulation on social transmission of food preference (STFP) and Experiment 2 assessed *c-Fos* expression to identify brain regions activated by NBM stimulation treatment. The STFP is based on a task developed by Galef Jr. (Galef Jr. and Wigmore 1983) that includes social interaction between "demonstrator" (conspecific that has recently eaten odorized food) and "observer" animals. During this interaction, the observers form an association between the food odor and a constituent of the demonstrator's breath—carbon disulfide (Galef Jr. et al.

1988)—and in a subsequent test they will choose to eat more of the food previously eaten by the demonstrator in preference to another food (Galef Jr. et al. 1985). STFP is thus a social memory paradigm that involves a natural odor–odor association, requiring rats to use information obtained in one episode of social interaction to guide later behavior in different circumstances from the original learning. This flexible memory expression is a key feature of relational memory (Bunsey and Eichenbaum 1995; Eichenbaum 1999; Alvarez et al. 2001). The integrity of the hippocampus and related areas is necessary for expression of the socially transmitted odor association (Winocur 1990; Bunsey and Eichenbaum 1995; Kogan et al. 1997; Mayeux-Portas et al. 2000; Rampon et al. 2000; Alvarez et al. 2001; Winocur et al. 2001; Clark et al. 2002; Roberts and Shapiro 2002; Brightwell et al. 2005; Countryman et al. 2005a; Ross and Eichenbaum 2006). Moreover, several studies show that STFP learning is sensitive to selective cholinergic NBM damage (Berger-Sweeney et al. 2000; Vale-Martinez et al. 2002), suggesting a critical role of NBM neurons in acquisition and early consolidation of the task. Some of the NBM terminal fields in the neocortex are also involved in

STFP acquisition, such as frontal (Winocur and Moscovitch 1999) and orbitofrontal (OFC) cortices (Ross et al. 2005). In Experiment 2, we studied the expression of the *c-Fos* protein to determine whether a single session of NBM electrical stimulation induces molecular changes in brain regions involved in STFP, such as hippocampal formation (CA, dentate gyrus, and subiculum) or OFC. Additional regions, such as other prefrontal regions (prelimbic [PL] and infralimbic [IL] cortices) and the basolateral complex of the amygdala (BLA), were analyzed as they are important targets of projections arising from NBM (Mesulam et al. 1983) and show changes in *c-Fos* expression after olfactory associative learning (Tronel and Sara 2002).

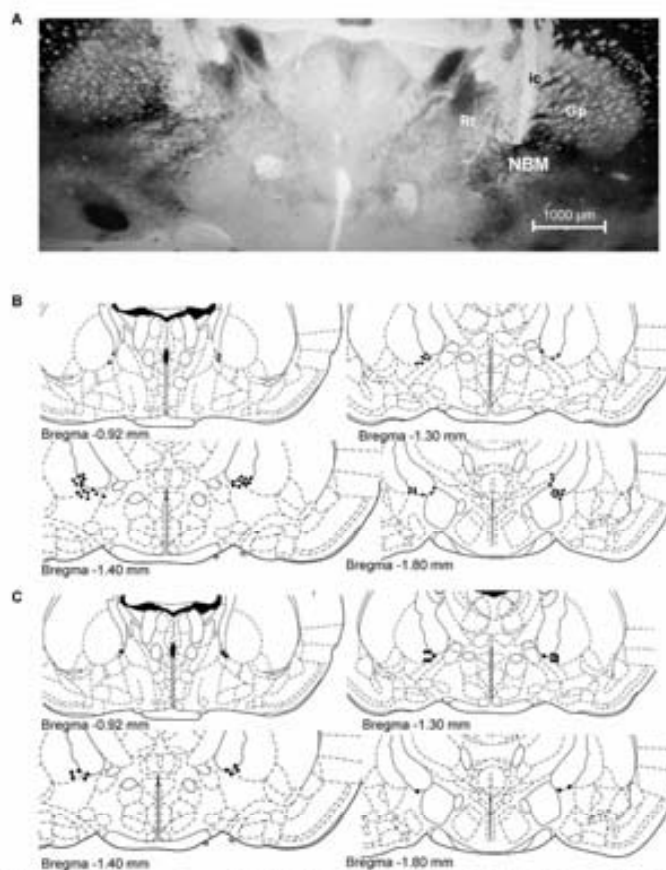
In short, in the present study, we investigated (1) the effects of pretraining NBM electrical stimulation on preference for the trained food and other variables involved in a STFP task, at two retention delays (immediate and 24 h) in separate groups, and (2) the effects of the same stimulation treatment on the activation of different cortical and subcortical regions.

## Results

### Experiment 1

#### Histology

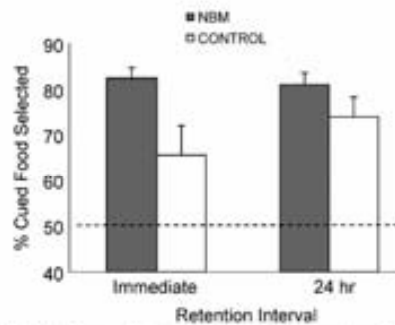
At the end of the experiment, all observer rats were subjected to histological verification of electrode placements. For the final sample we only considered rats with their electrode tips in the NBM within the area demarcated by caudal globus pallidus and adjacent internal capsule (Fig. 1A). Specifically, the electrodes were located along different brain coordinates from 0.92 to 1.80 mm posterior to bregma (Fig. 1B) according to the stereotaxic atlas (Paxinos and Watson 1997). Control ( $n = 4$ ) and stimulated ( $n = 20$ ) subjects with the electrode unintentionally implanted outside NBM (internal capsule, lateral globus pallidus, or reticular thalamic nucleus) were not included in the main analyses, although the performance of rats stimulated outside the NBM was compared with that of NBM-stimulated and controls in a supple-



**Figure 1.** (A) Photomicrograph of AChE staining at the level of the NBM area (AP, 0.92–1.30 mm posterior to bregma) showing the electrode track of a representative subject. (B,C) Electrode tip placements (black dots) for stimulated and control rats throughout the rostral-caudal extent of the NBM (from 0.92 to 1.80 mm posterior to bregma) in experiments 1 (B) and 2 (C). Reprinted with permission from Elsevier © 1997, Paxinos and Watson (1997). ic, internal capsule; Gp, globus pallidus; NBM, nucleus basalis magnocellularis; Rt, reticular thalamic nucleus.

## 2 Learning & Memory

www.learnmem.org



**Figure 2.** Percentage of cued food selected, expressed as the mean percentage ( $\pm$ SEM) of the total amount of food consumed, at the two retention intervals in separate groups. NBM-stimulated rats show better performance than controls independently of delay, although the enhancement was more marked in the immediate retention than in the 24-h retention.

mental analysis. Thus, the final sample was made up of 57 rats distributed into the following groups according to treatment (NBM stimulation or control) and test delay (immediate or 24 h): NBM-I ( $n = 15$ ), Control-I ( $n = 14$ ), NBM-24 ( $n = 14$ ) and Control-24 ( $n = 14$ ).

#### Behavioral testing

After NBM electrical stimulation, subjects were exposed to demonstrator rats and promptly tested for food preferences either immediately (NBM-I and Control-I) or 24 h later (NBM-24 and Control-24). Regarding the percentage of cued food eaten (preference for the trained food), two outliers were excluded from the main analyses ( $t_{14} = 9.6$ ;  $P < 0.0001$ ;  $t_{13} = 11.37$ ;  $P < 0.0001$ ). The preference for the trained food was above chance in all groups (NBM-I:  $t_{13} = 13.15$ ;  $P < 0.0001$ , Control-I:  $t_{13} = 2.35$ ;  $P = 0.035$ , NBM-24:  $t_{13} = 12.64$ ;  $P < 0.0001$ , and Control-24:  $t_{13} = 5.35$ ;  $P < 0.0001$ ), indicating that control and stimulated rats learn the task (Fig. 2). Animals learn the task equally regardless of the cued food since there were no differences in the preference for the food cued to cocoa or cinnamon ( $F_{1,51} = 3.01$ ;  $P = 0.089$ ), and the interactions between Cued Food and Treatment, and Cued Food and Delay were also not statistically significant ( $F_{1,51} = 1.23$ ;  $P = 0.274$ ,  $F_{1,51} = 0.45$ ;  $P = 0.504$ ). Importantly, General Linear Model (GLM) analyses revealed a main effect of Treatment ( $F_{1,51} = 7.63$ ;  $P = 0.008$ ), but not Delay ( $F_{1,51} = 0.65$ ;  $P = 0.423$ ) or interaction effects ( $F_{1,51} = 1.25$ ;  $P = 0.269$ ) (Fig. 2). Results indicated that NBM-stimulated rats showed a stronger preference for the trained food than control rats, which was more evident in the immediate memory test.

To control for localization of the stimulation effect on the preference for the trained food, we also analyzed performance of rats with stimulation electrodes outside the NBM. This analysis demonstrated statistically significant differences in the preference for the cued food when compared with rats stimulated in the NBM ( $F_{1,72} = 8.27$ ;  $P = 0.005$ ) and no differences between rats stimulated outside the NBM and controls ( $F_{1,72} = 0.26$ ;  $P = 0.609$ ).

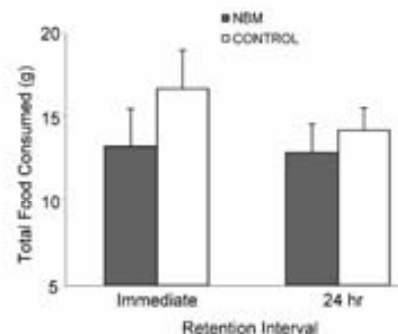
In addition to preference for the cued food, other variables were also considered. The total food consumed during retention tests was analyzed in all groups (Fig. 3) showing no statistically significant effects of Treatment ( $F_{1,51} = 1.52$ ;  $P = 0.223$ ), Delay ( $F_{1,51} = 0.58$ ;  $P = 0.452$ ), or interaction ( $F_{1,51} = 0.30$ ;  $P = 0.587$ ), which demonstrated that NBM stimulation does not affect motivation to food consumption. To determine whether NBM treatment produced changes in neophobia, regular ground food

eaten during habituation and flavored food (New Food) eaten during tests were compared. There were no statistically significant effects of Food ( $F_{1,51} = 1.474$ ;  $P = 0.230$ ), Treatment ( $F_{1,51} = 0.345$ ;  $P = 0.559$ ) or interaction ( $F_{1,51} = 2.196$ ;  $P = 0.145$ ), suggesting that the pattern of consumption of both foods was comparable between NBM-stimulated and control rats.

In order to rule out effects on other variables that might have affected performance in STFP, measures of social interaction were included. A sample of rats from each group was included in these additional analyses regarding social interaction and explorative behavior as recordings of some subjects during the social interactions and the test session were defective. Pearson correlation analyses showed that none of the measures of social interaction correlated significantly with the percent of cued food eaten (Table 1). As for differences between stimulated and control rats, GLM showed that Treatment did not affect any of these measures (muzzle:  $F_{1,37} = 1.09$ ;  $P = 0.304$ , body:  $F_{1,37} = 0.01$ ;  $P = 0.903$ , anogenital:  $F_{1,37} = 0.73$ ;  $P = 0.398$ ). The analysis of social interaction evolution throughout the three sessions demonstrated a downward linear trend in the number of sniffs of the demonstrator's muzzle ( $F_{1,37} = 30.15$ ;  $P < 0.0001$ ), body ( $F_{1,37} = 74.77$ ;  $P < 0.0001$ ), and anogenital region by the observers ( $F_{1,37} = 45.67$ ;  $P < 0.0001$ ), as well as a quadratic trend in the case of muzzle ( $F_{1,37} = 7.63$ ;  $P = 0.009$ ) and body ( $F_{1,37} = 6.26$ ;  $P = 0.017$ ). These descending patterns were similar between groups in all cases. Other variables analyzed during the interactions were self-grooming and fighting bouts, which were not affected by Treatment ( $F_{1,37} = 3.84$ ;  $P = 0.058$ , and  $F_{1,37} = 0.44$ ;  $P = 0.510$ ). Finally, jar climb data show that stimulated and control rats investigated both food jars to a similar degree ( $F_{1,40} = 0.698$ ;  $P = 0.408$ ), although stimulated rats ate a greater amount from the jar containing the cued food. This indicated that NBM stimulation did not affect exploration or motor activity.

#### Experiment 2

After histological verification of electrode placements (AChE histochemistry), the final sample was made up of 12 NBM-stimulated rats, eight control rats (with electrode in the NBM), and five sham rats (without electrodes). Rats implanted in the NBM (stimulated and controls) showed electrode tip placements similar to those described in Experiment 1 (Fig. 1C). As in Experiment 1, control ( $n = 5$ ) and stimulated ( $n = 7$ ) subjects with the electrode outside the NBM were excluded from the main analyses, but data from stimulated rats were considered to control for the treatment specificity.



**Figure 3.** Total weight of food eaten ( $\pm$ SEM) at the two retention intervals. The NBM-stimulated rats ate the same amount of food as controls in both the immediate and 24-h tests.

**Table 1.** Correlation analysis of measures of social interaction and cued-food consumption

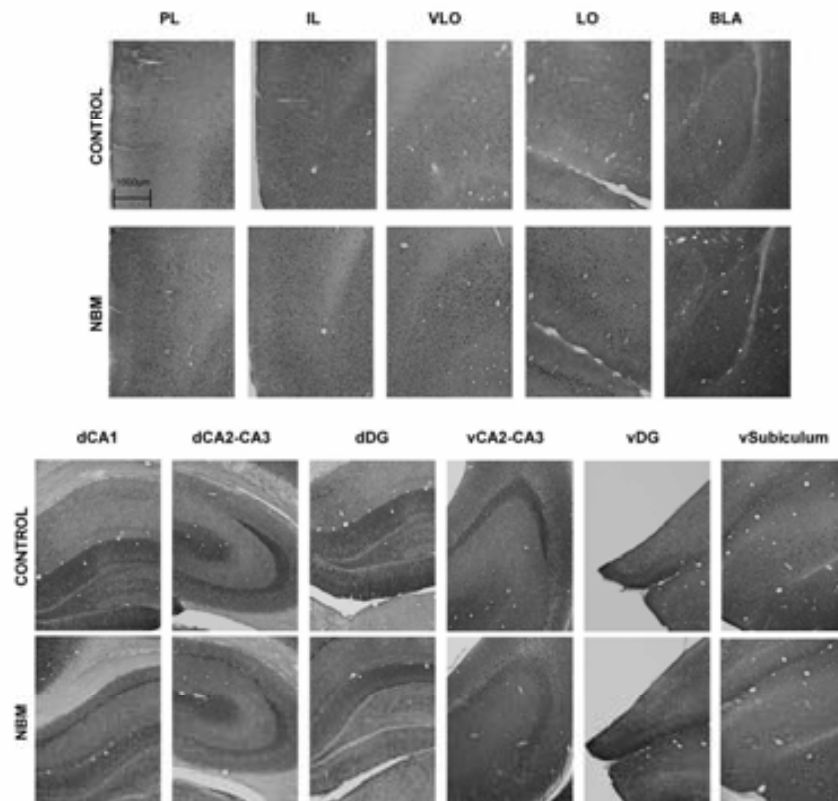
Behavior	Social interaction session				Correlation between behavior and cued-food consumption	
	1st	2nd	3rd	Global mean	<i>r</i>	<i>P</i>
Sniffs of demonstrator's muzzle	22.74 ± 6.94	16.36 ± 7.01	14.79 ± 6.11	53.12 ± 13.05	-0.111	0.502
Sniffs of demonstrator's body	24.64 ± 7.58	15.92 ± 7.68	11.71 ± 5.55	53.00 ± 15.42	0.155	0.345
Sniffs of demonstrator's anogenital region	17.94 ± 8.57	13.62 ± 8.05	9.13 ± 5.82	40.58 ± 20.07	-0.057	0.729
Self-grooming bouts	0.85 ± 1.08	0.54 ± 0.73	0.48 ± 0.73	1.74 ± 1.63	0.173	0.291
Fighting bouts	0.30 ± 0.75	0.18 ± 0.66	0.13 ± 0.40	0.66 ± 1.43	-0.094	0.569

Mean ± SD of behaviors scored during the first 10 min of the three interactions and global mean ± SD of the three interactions. Correlation analysis of the behaviors scored during the three interactions and the amount of cued food eaten during the test. None of the behaviors in the interaction sessions correlated significantly with the amount of cued food eaten.

To investigate whether prefrontal cortex, hippocampal regions, and basolateral amygdala (BLA) were activated after NBM electrical stimulation treatment, we analyzed c-Fos immunolabeling in these brain regions (Fig. 4; Table 2). Immunoreactive cells exhibited a dark nucleus in neuronal nuclei expressed clearly upon the surrounding background tissue. As there were no statistically significant differences between control and sham groups in c-Fos expression in any of the studied brain regions (all *P*-values > 0.204), except in infralimbic cortex (IL) ( $F_{(1,21)} = 6.19$ ;  $P = 0.021$ ), their data were combined into a single control group.

For IL, inter-group comparisons were carried out between NBM-stimulated and control rats.

As for prefrontal cortex, there were abundant Fos-labeled cells in ventrolateral orbital cortex (VLO), where we observed a significant main effect of the treatment ( $F_{(1,21)} = 21.60$ ;  $P < 0.0001$ ), but not hemisphere ( $F_{(1,21)} = 0.79$ ;  $P = 0.382$ ), or interaction between these two factors ( $F_{(1,21)} = 0.18$ ;  $P = 0.671$ ). The same pattern of results was found in lateral orbitofrontal cortex (LO) ( $F_{(1,21)} = 20.11$ ;  $P < 0.0001$ ,  $F_{(1,21)} = 1.81$ ;  $P = 0.192$ , and  $F_{(1,21)} = 0.96$ ;  $P = 0.338$ ). The analysis of prelimbic cortex (PL)



**Figure 4.** Representative photomicrographs of c-Fos immunostaining of control and stimulated rats in prefrontal areas: prelimbic (PL), infralimbic (IL), ventrolateral orbital (VLO), lateral orbitofrontal (LO), basolateral amygdala (BLA), and hippocampus subfields: dorsal CA1 (dCA1), dorsal CA2-CA3 (dCA2-CA3), dorsal dentate gyrus (dDG), ventral CA2-CA3 (vCA2-CA3), ventral dentate gyrus (vDG), and ventral subiculum (vSubiculum). NBM-stimulated rats had more immunolabeled cells than control rats in all the prefrontal areas, dorsal CA, and ventral DG.



also revealed a statistically significant treatment effect ( $F_{(1,22)} = 16.93$ ;  $P < 0.0001$ ), but not hemisphere ( $F_{(1,22)} = 4.29$ ;  $P = 0.053$ ), or interaction ( $F_{(1,22)} = 2.40$ ;  $P = 0.135$ ). In the IL we also detected a significant treatment effect ( $F_{(1,18)} = 7.861$ ;  $P = 0.012$ ) but not hemisphere ( $F_{(1,18)} = 0.000$ ;  $P = 0.996$ ), or interaction ( $F_{(1,18)} = 2.549$ ;  $P = 0.128$ ).

Stimulated rats also exhibited a significantly higher number of c-Fos-labeled cells compared with control rats in the dorsal hippocampus: dCA1 ( $F_{(1,21)} = 7.853$ ;  $P = 0.010$ ) and dCA2-CA3 ( $F_{(1,21)} = 5.16$ ;  $P = 0.033$ ), and the ventral dentate gyrus (vDG) ( $F_{(1,20)} = 6.77$ ;  $P = 0.017$ ). These effects were always irrespective of the hemisphere (all  $F$ -values  $< 3.44$ ; all  $P$ -values  $> 0.078$ ), and, although no interactions between treatment and hemisphere were found in dCA2-CA3, vDG (all  $F$ -values  $< 0.0001$ ; all  $P$ -values  $> 0.998$ ), the interaction was statistically significant in dCA1 ( $F_{(1,21)} = 5.47$ ;  $P = 0.028$ ). However, NBM stimulation treatment did not increase the number of fos-labeled cells in the ventral CA2-CA3 ( $F_{(1,21)} = 3.637$ ;  $P = 0.069$ ), the ventral subiculum ( $F_{(1,21)} = 2.16$ ;  $P = 0.156$ ), or the dorsal DG ( $F_{(1,21)} = 0.163$ ;  $P = 0.690$ ). We found no statistical differences regarding hemisphere (all  $F$ -values  $< 2.383$ ; all  $P$ -values  $> 0.137$ ) or interactions between treatment and hemisphere (all  $F$ -values  $< 2.04$ ; all  $P$ -values  $> 0.167$ ).

BLA showed a modest number of immunoreactive cells in both stimulated and control animals, and no significant differences were found between groups ( $F_{(1,22)} = 3.196$ ;  $P = 0.088$ ), regarding hemisphere ( $F_{(1,22)} = 0.641$ ;  $P = 0.432$ ) or interaction ( $F_{(1,22)} = 2.409$ ;  $P = 0.135$ ).

As in Experiment 1, the analysis of rats stimulated outside the NBM showed no differences with the control rats in any of the regions studied (VLO:  $F_{(1,27)} = 0.14$ ;  $P = 0.712$ , LO:  $F_{(1,27)} = 4.06$ ;  $P = 0.054$ , PL:  $F_{(1,27)} = 0.50$ ;  $P = 0.484$ , IL:  $F_{(1,27)} = 0.01$ ;  $P = 0.936$ , dCA1:  $F_{(1,29)} = 0.12$ ;  $P = 0.727$ , dCA2-CA3:  $F_{(1,29)} = 0.05$ ;  $P = 0.831$ , dDG:  $F_{(1,29)} = 2.81$ ;  $P = 0.104$ , vCA2-CA3:  $F_{(1,29)} = 0.30$ ;  $P = 0.589$ , ventral DG:  $F_{(1,26)} = 0.13$ ;  $P = 0.726$ , ventral subiculum:  $F_{(1,27)} = 0.11$ ;  $P = 0.742$ , and BLA:  $F_{(1,28)} = 0.04$ ;  $P = 0.848$ ). Moreover, there were statistically significant differences between rats stimulated outside and inside the NBM in the regions where differences between control and NBM-stimulated rats were detected (VLO:  $F_{(1,27)} = 14.92$ ;  $P = 0.001$ , LO:  $F_{(1,27)} = 32.16$ ;  $P < 0.0001$ , PL:  $F_{(1,28)} = 6.65$ ;  $P = 0.015$ , IL:  $F_{(1,27)} = 9.40$ ;  $P = 0.005$ , dorsal CA1:  $F_{(1,29)} = 8.07$ ;  $P = 0.008$ , dorsal CA2-CA3:  $F_{(1,29)} = 4.62$ ;  $P = 0.040$ ). In ventral CA2-CA3, significant differences were also revealed between the two stimulated groups ( $F_{(1,29)} = 4.74$ ,  $P = 0.038$ ). A tendency to statistically significant differences was found in dorsal DG ( $F_{(1,29)} = 4.12$ ;  $P = 0.052$ ) and ventral DG ( $F_{(1,27)} = 3.82$ ;  $P = 0.062$ ), and no significant differences were detected in the ventral subiculum ( $F_{(1,29)} = 0.95$ ;  $P = 0.339$ ) or BLA ( $F_{(1,28)} = 3.17$ ;  $P = 0.086$ ).

In short, NBM-stimulated rats showed more immunolabeled cells than control rats in all the prefrontal cortical areas and some hippocampal subregions (dorsal CA and ventral DG), irrespective of the hemisphere. In contrast, no differences between groups in Fos expression were found in BLA, dorsal DG, ventral CA, and ventral subiculum.

## Discussion

Present behavioral results indicate that pretraining stimulation of the NBM facilitates STFP, a relational odor-odor association task. The treatment improved the STFP retention regardless of when the test was conducted, either immediately or 24 h after training. It is unlikely that the observed improvement in STFP is secondary to performance factors such as the amount of social interaction, motivation to eat, or changes in neophobia or exploration, since none of these variables was affected by the

stimulation treatment. Results of Experiment 2 indicated that electrical stimulation of the NBM led to bilateral increased c-Fos expression in prefrontal regions, such as OFC, PL, and IL, and some hippocampal subregions.

Current findings expand on previous data showing that NBM electrical stimulation improves acquisition of an implicit two-way active avoidance task (Montero-Pastor et al. 2004). Our results are also consistent with others previously reported demonstrating that the cholinergic cells of NBM are involved in acquisition and memory formation of STFP (Berger-Sweeney et al. 2000; Vale-Martinez et al. 2002). There are indeed more studies suggesting a role of NBM in learning and memory processes. For instance, NBM lesions affected other tasks such as visual discrimination learning (Ridley et al. 2005), learning set formation (Bailey et al. 2003), and appetitive-to-aversive transfer learning (Butt et al. 2003). Therefore, facilitation in the acquisition of the STFP might be assumed and related to enhancements in the stimulus encoding or the initial formation of the critical association between the two significant stimuli for the task (food odor and odor of carbon disulfide). Although our results might be interpreted as pointing toward NBM stimulation-induced improvement in the learning of information concerning socially transmitted preferences, a number of reports suggest that the NBM may have an important role in attentional processes. Tasks that place specific demands on attention appear to be sensitive to NBM lesions, mainly those assessing operant measures of sustained attention (McGaughy et al. 1996, 2002; Robbins 2002), and also selective attention tasks (Muir et al. 1992) or divided attention paradigms (Turchi and Sarter 1997; Waite et al. 1999). In the current research, although we cannot distinguish attentional enhancement from learning enhancement, an interpretation purely derived from attentional facilitation would not be appropriate since STFP does not specifically tax attention.

In view of the critical role of the cholinergic system in modulation of olfactory learning and social recognition memory (Ross et al. 2005; for review, see Vale-Martinez et al. 2002), augmentation of cortical ACh by NBM electrical stimulation may be an important factor to understand the present results. Application of optimal electrical stimulation of NBM may provide spatial and temporal characteristics of ACh release that are consistent with the normal anatomy and physiology of the NBM cholinergic system (Rasmuson 2000) and thus may facilitate cognitive function. Parameters used in the current research are similar to those used in other studies in which NBM stimulation elicited large increases in cortical ACh release (Rasmuson 2000), cortical EEG activation (McLin III et al. 2002, 2003; Golmayo et al. 2003), and cortical plasticity (Weinberger 2003). However, the activation of other neuronal populations (probably noradrenergic or GABAergic) may also contribute to the effects found on STFP (Gritti et al. 2003; Manns et al. 2003). The functions of the GABAergic cells, which appear to work together with the NBM cholinergic neurons to produce cortical plasticity (Jimenez-Capdeville et al. 1997; McKinney and Jacksonville 2005), may mediate executive aspects of cognitive performance (Sarter and Bruno 2002).

As for the molecular consequences of NBM electrical stimulation, the treatment induced increases in c-Fos expression in prefrontal regions, such as OFC, PL, and IL cortices, and some hippocampal regions (dorsal CA1, CA2-CA3, and ventral DG). Nevertheless, effects of NBM stimulation on c-Fos immunoreactivity were not revealed in any other areas of the hippocampus (ventral CA2-CA3, ventral subiculum, and dorsal DG) or the BLA. Some of the regions where activation was enhanced by NBM stimulation coincide with cortical and hippocampal areas activated in certain STFP phases or with areas required for the task.

The area demonstrating a higher increase in c-Fos expression after NBM stimulation is the OFC (VLO and LO), which has been implicated in odor-guided learning (Otto and Eichenbaum 1992; Whishaw et al. 1992; Lipton et al. 1999; Roullet et al. 2005) and specifically in STFP (Ross et al. 2005). Ross et al. (2005) reported that cholinergic deafferentation of OFC prior to STFP training impaired expression of the task tested 2 d later, supporting that ACh in the OFC may be essential for the encoding of the new information required for the task. In that respect, the OFC has been shown to participate in encoding the value of olfactory stimuli (Schoenbaum et al. 1998; Saddoris et al. 2005) as it belongs to a network that integrates stimulus significance and other types of information to select appropriate behavioral responses. Even so, it is also possible that the OFC lesion in the Ross et al. (2005) study caused impairment in STFP retrieval as a recent study of c-Fos expression reports that this cortex is activated increasingly in successive retrieval tests, showing a trend toward significant activation 2 d after acquisition and a higher activation during retrieval 21 d after (Ross and Eichenbaum 2006). This pattern of findings suggests that NBM stimulation may have facilitated STFP (an odor-odor association task) as it activated structures such as VLO and LO, critically involved in STFP acquisition and/or retrieval.

Other prefrontal subregions showing a large number of immunoreactive cells following NBM electrical stimulation are PL and IL. One may consider that PL-IL activation induced by NBM stimulation prior to training might contribute to a better STFP acquisition, but IL failed to show significant differences between STFP-trained animals and controls in the number of cells expressing c-Fos at different retrieval times (Ross and Eichenbaum 2006). As for PL, it has not been directly studied in relation to STFP, but it has been shown that damage to the parafascicular nucleus, which projects to PL-IL, prevents STFP learning (Quiroz-Padilla et al. 2006). The authors interpret their results in the context of medial prefrontal cortex deafferentation induced by the thalamic lesion. Moreover, PL is involved in working memory, attentional selectivity to relevant stimulus features during learning, and participates in behavior flexibility (Dalley et al. 2004). Some of these functions are shared with the NBM (Chudasama et al. 2004), which, acting through this region, might improve processes such as behavior flexibility, necessary for the STFP. Stimulation of the NBM could therefore enhance some of the functions of the prefrontal cortex or, at least, those involving the integration of relationships based on previous experience, thus allowing the expression of adaptive behavior in novel circumstances.

Our data also showed that NBM electrical stimulation, at parameters enhancing STFP, caused increases in c-Fos expression in dorsal CA and ventral DG, but not in ventral CA, ventral subiculum, or dorsal DG. The observation of c-Fos induction in hippocampal formation is rather unforeseen as it is an area not directly supplied by cholinergic projections arising from the NBM (Mesulam et al. 1983). Nevertheless, this is not the first report supporting the hypothesis of indirect connections between NBM and hippocampus. There is evidence that NBM lesions cause neurodegenerative changes of hippocampal mossy fibers and DG (Amenta et al. 1991; Panočka et al. 1995) and increase NADPH-diaphorase in the dorsal CA1-CA3 fields of the hippocampus (Sabbatini et al. 1999). The data from present research are relevant in view of a previous study showing increases in c-Fos expression in the dorsal CA3 and ventral DG following a STFP test (carried out 1.5 h after training) of trained rats in comparison with social + odor control rats (Countryman et al. 2005b). The same study also showed greater c-Fos expression in ventral DG in STFP-trained rats compared with social-controls following either acquisition or a 2-d recall test. The involvement of ventral hippocampus in this task is also pointed out in another

study showing ventral subiculum activation during retrieval shortly after learning and a decline in the level of activation at successive times (Ross and Eichenbaum 2006). In the current experiment, although NBM-stimulated rats showed more immunoreactive cells in the ventral subiculum than controls, no statistically significant differences were found between groups. Nevertheless, hippocampal-lesioned rats normally acquire and briefly retain the food odor association as demonstrated by intact memory immediately after social training (Bunsey and Eichenbaum 1995), and it has been reported that hippocampal administration of c-fos antisense impairs long-term STFP memory as tested two weeks after training but leaves immediate memory intact (Countryman et al. 2005a). Accordingly, increases in c-Fos expression in dorsal CA or ventral DG after pretraining NBM stimulation might better account for 24-h retention facilitation as opposed to the greater immediate retention, which might be better explained by prefrontal activation, as discussed above.

NBM electrical stimulation did not alter c-Fos expression in the BLA even though NBM neurons provide the major cholinergic innervation to the amygdala (Mesulam et al. 1983). A factor that may justify this unexpected result is that the stimulation current intensity and the specific neuronal population affected by electrodes in these experiments are not the most appropriate for obtaining amygdala activation. Parameters chosen in the present research were similar to those from studies in which NBM stimulation elicited large increases in cortical activity (Rasmussen 2000). Corticopetal and amygdalopetal neurons differ neurobiologically in some aspects, and it thus seems likely that they may also differ in their neurophysiology.

The use of electrical stimulation does not allow us to determine whether neuronal perikarya, axons of passage, or both, were stimulated. Nevertheless, the accurate electrode placement, the relatively low levels of current, the regional-specific effects in c-Fos expression, and the similar results (in Experiments 1 and 2) observed in rats stimulated in the vicinity of the NBM and control rats suggest that stimulation is specific and reasonably well confined to the NBM.

In summary, current data show that pretraining NBM electrical stimulation facilitates the acquisition of STFP, suggesting that the treatment might induce neural changes related to transcription factors such as c-Fos, which may be relevant in accounting for those effects in socially transmitted preferences. Since c-Fos expression was significantly increased following NBM stimulation in prefrontal cortex and some hippocampus regions that have been shown to be relevant for odor-associative memory (Ross et al. 2005; Ross and Eichenbaum 2006), NBM contribution to STFP may be mediated by these regions.

## Materials and Methods

### Experiment 1

#### Subjects

Eighty-one male Wistar rats (obtained from our laboratory breeding stock) weighing 419.4 g (SEM = 4.45) and 98.23 (SEM = 0.78) days old at the beginning of the experiment were used as observer subjects. An additional set of 58 juvenile Wistar male rats (mean age = 35.18 d, SEM = 0.92), weighing 169.19 g (SEM = 5.43) at the beginning of the experiment, served as demonstrator subjects. A separate set of 30 male Wistar rats were used as pilot subjects to test the innate preference between different odor pairs (cocoa-cinnamon, and anise-oregano) and showed preference for anise versus oregano, but no distinct preference for either component of the pair 2% cocoa-1% cinnamon. This pilot study confirmed that three social interactions with demonstrator animals were necessary to show a robust memory for the STFP task.

Throughout the experiment the observers were housed singly in 22 × 22 × 14-cm plastic-bottomed cages with sawdust bedding, and the demonstrators in groups of four in 50 × 22 × 14-cm cages, maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a humidity- and temperature-controlled environment. Surgery and behavioral testing were performed during the light phase of the cycle. Rat-chow pellets (Panlab SL, A04) and water were provided ad libitum except during pretraining, training, and testing for the task. In such phases, the rats were submitted to a food restriction schedule (five pellets/day for observers and four pellets/day for demonstrators) to be maintained at 85% of basal body weight. The animals were weighed and handled for 5 min every day, depending on the procedures they underwent. Experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive for care and use of laboratory animals (86/609/ECC) and with Generalitat de Catalunya authorization (DOGC 2450 7/8/1997, DARP protocol number 2265).

#### Surgery

The observer animals were randomly assigned to one of the following four groups: Two groups underwent a retention session immediately after learning (NBM-I and Control-I), and two groups a retention session 24 h after learning (NBM-24 and Control-24). Animals were anesthetized with i.p. Ketamine hydrochloride (Ketolar, 90 mg/kg; Parke-Davis) and xylazine (Rompun, 8 mg/kg; Bayer) and placed in a stereotaxic head holder (Model 1504, Kopf Instruments). The skull was exposed through a midline incision and leveled along the bregma-lambda axis. All the rats were implanted in the right or left hemisphere, in a balanced way for each group, with one monopolar stainless steel electrode that was electrically insulated except for the tip (Plastics One, Bilaney; 150 µm in diameter). Stereotaxic coordinates were used: AP: -1.10 mm from bregma; ML: ± 2.8 mm from midline, and DV: -7.6 mm from cranium surface (Paxinos and Watson 1997). The electrodes were soldered to a plastic connector that was anchored to the skull with jeweler screws and dental cement (Vertex self-curing, Dentimex). The grounding electrode was a copper wire (200 µm in diameter) with one end soldered to the electrode connector and the other to a screw. Rats in control groups were implanted in the NBM without a grounding electrode. After surgery, the skin was sutured and antiseptic was applied (Topiön, Almirall Prodesfarma) to the sutured area. Rats were returned to their home cages and allowed 10 d (4 d for recovery, 4 d for food deprivation, and 2 d for rehabituation) before behavioral testing.

#### Behavioral apparatus

All observer habituation, training, and testing were conducted in 50 × 22 × 14-cm plastic-bottomed cages with sawdust bedding. Habituation and testing were carried out presenting the animals with a feeding tray placed in their cage. The tray consisted of a black Plexiglas base (21 × 21 cm) with two adjacent plastic pots fixed onto the center of the base. The food was placed in two glass jars (130 mL) secured within each plastic pot. For the demonstrators, habituation and training were carried out in 22 × 22 × 14-cm plastic cages allowing them to eat from a glass jar mounted upon the center of a black Plexiglas base (21 × 10 cm).

#### Habituation to food jars

After 7 d of food deprivation and prior to surgery, rats were habituated to eating plain ground rat chow (Panlab SL, A04) from glass jars to minimize neophobia for 2 h on the first day, 1 h the second day, and 45 min the third day. During the three habituation sessions, the rats were presented with food cups in feeding trays containing ground, unflavored rat chow. The amount of food eaten was determined, and only rats eating at least 2 g of food on the last day were included in the study. Two observer rats were excluded from the current experiment based on this criterion. A similar procedure was repeated 7 d after surgery (two 45-min rehabituation sessions). Subsequently, animals were food-deprived once again for 2 d before the training-testing sessions began.

#### Intracranial electrical stimulation in the NBM

Immediately before training to the STFP task, rats received a 20-min stimulation session, during which they were free to move. The treatment was applied in a stimulation cage (26.5 × 30.5 × 35 cm) made of Plexiglas. The electrical current delivered by a stimulator (Model CS-20, Cibertec) consisted of 1-Hz square pulse trains of 500 msec. Each train contained 50 pulses of 0.5-msec duration. Current intensity was 100 µA. Such parameters were similar to those in other studies reporting large increases in ACh release (Rasmusson 2000), cortical EEG activation (McLin III et al. 2002, 2003; Golmayo et al. 2003), and facilitation of learning and memory (Montero-Pastor et al. 2001, 2004). The animals' behavior was monitored during the stimulation session and no striking alterations (i.e., agitation, motor stereotypes) were detected. Control rats were placed in the same cage for 20 min with the electrode clip connected but were never stimulated.

#### STFP training and testing

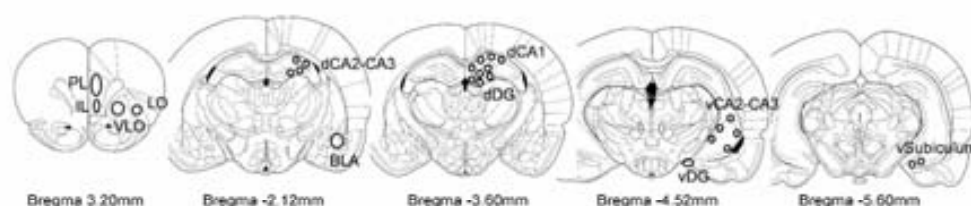
Before training was conducted, each rat in the stimulation and control groups was assigned randomly to be cued to one of the two components of the odor pair. Rats were habituated to the training cage and room for 30 min immediately before stimulation and training. Training to the task began when a demonstrator rat was allowed to eat food cued to 2% cocoa (Cadbury Ltd.) or 1% cinnamon (Carmencita) for 30 min. Demonstrator animals were only used if they had eaten at least 1 g of flavored chow (all rats met this criterion). Subsequently, a demonstrator that had just eaten flavored chow was placed into the observer's cage. The two rats were allowed to interact with no barriers for 20 min, following which the demonstrator was removed. This procedure was repeated twice at 1-h intervals, each time using a different demonstrator who had eaten the same odorant.

Subjects were tested immediately (NBM-I and Control-I groups) after the third interaction or 24 h after training (NBM-24 and Control-24 groups). During testing, the observer rat was presented with two jars of food (one containing the cued food and the other the noncued i.e., the distractor food) with water available. The location of the trained odor (left or right) was balanced across animals. The observers were allowed to eat for 45 min, after which both food jars were removed and weighed to determine the amount of food eaten from each. A "preference score" (percent of cued food selected) for the trained odor (e.g., cocoa) was calculated as follows:  $100 \times \text{weight of food cued on cocoa eaten} / \text{weight of all food eaten}$ . Subjects' behavior during the three social interactions and testing was recorded on a video camera (Panasonic RX22) connected to a monitor. We scored the number of times each observer sniffed the muzzle, body, or anogenital region of the demonstrator, as well as grooming and fighting bouts. A "sniff" was defined as close orientation (<2 cm) of the observer's muzzle toward the demonstrator (Wrenn et al. 2003). During the testing, we scored the number of times the rat was observed to be on top of the jar with both forepaws (jar climbs).

#### Histology

Upon completion of behavioral testing, all observers were deeply anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal Vetoquinol SA; 200 mg/kg i.p.) and were perfused transcardially with 100 mL 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 250 mL 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at a flow rate of 40 mL/min. Brains were post-fixed in the perfusion solution for 2 h and then cryoprotected in a 30% sucrose PBS solution for 48 h. Brains were sectioned at 40 µm thickness proximal to the electrode placements on a cryostat (Cryocut 1800 with microtome 2020 Reichert-Jung). The sections were processed for acetylcholinesterase (AChE) histochemistry, essentially as described elsewhere (Paxinos and Watson 1997), and examined under a microscope (Olympus BX 41, Olympus Optical CO Ltd.). To localize electrode placement into the NBM, microphotographs were taken (Olympus DP 70, Microscope Digital Camera, Olympus Optical CO Ltd.) and examined by two independent observers.





**Figure 5.** Representation of the areas sampled. Prelimbic (PL), infralimbic (IL), ventrolateral orbital (VLO), lateral orbitofrontal (LO), basolateral amygdala (BLA), and hippocampus subfields: dorsal CA1 (dCA1), dorsal CA2–CA3 (dCA2–CA3), dorsal dentate gyrus (dDG), ventral CA2–CA3 (vCA2–CA3), ventral dentate gyrus (vDG), and ventral subiculum. Reprinted with permission from Elsevier © 1997, Paxinos and Watson (1997).

#### Data analysis

A first analysis was performed using General Linear Model (GLM; SPSS v12 software, SPSS Iberica), in which the factors were "Treatment" (NBM or control), "Delay" (immediate or 24 h), and "Food Cued" (cocoa or cinnamon) and the dependent variable was "Percent of Cued Food" (considered as the preference). As the factor Food Cued was found not to be significant, the main analyses were performed by means of GLM in which the factors were Treatment, Delay and the dependent variable was Percent of Cued Food. A one-sample *t*-test was used to study the outliers from the sample. Another one-sample *t*-test against a constant (50) was used for each group to determine if the percent of cued food eaten was greater than the chance level (50%). To control for the specificity of the stimulation, a GLM analysis was performed in which the factor was Treatment (stimulated NBM, control, stimulated outside NBM) and the dependent variable was Percent of Cued Food.

Additional analyses were carried out to evaluate possible changes induced by the stimulation in other variables measured during the social interactions and the tests. We analyzed the first 10 min of the three social interactions using the GLM for repeated measures (three sessions) with corresponding contrasts, in which the dependent variables were "Sniffs of Demonstrator's Muzzle," "Sniffs of Demonstrator's Body," "Sniffs of Demonstrator's Anogenital Region," "Self-Grooming Bouts," and "Fighting Bouts." Pearson correlation and linear regression were performed between these variables and Percent of Cued Food. Regarding the test, a GLM for repeated measures with corresponding contrasts

was carried out to analyze neophobia, with the dependent variables "Regular Food" (mean g of food eaten during two sessions of habituation just prior to training) and "New Food" (total food eaten during the test). "Total Food Eaten" and "Jar Climbs" were analyzed in the same way to evaluate motivation to eat and exploration.

#### Experiment 2

##### Subjects

The subjects were 37 naive male Wistar rats obtained from our laboratory breeding stock, with a mean age of 100.32 d (SEM = 1.45) and a mean weight of 445.40 g (SEM = 4.18) at the beginning of the experiment. The rats were maintained with the same procedures as in Experiment 1, but were not food-deprived.

##### Surgery and stimulation

Rats were randomly distributed into three groups before surgery: NBM (stimulated in the NBM), control (with electrode in the NBM, but not stimulated), and sham (with surgical procedures but no electrode). The rats underwent surgical and stimulation procedures as described for Experiment 1.

##### Immunohistochemistry

Two hours after a single 20-min session of electrical stimulation in the NBM, all rats were anaesthetized as in Experiment 1. The animals were sacrificed 2 h after treatment as this delay corresponds to the maximal c-Fos expression following a variety of stimulation situations (Herrera and Robertson 1996). The rats were then perfused transcardially with 100 mL of 4°C saline solution (0.9% NaCl) and 250 mL of 4°C, 4% paraformaldehyde. Brains were submerged in the perfusion solution overnight and then transferred to a 30% sucrose cryoprotectant solution for 48 h. Brains were frozen with a cryogen spray (SHUR/freeze, TBS) and stored at -80°C until they were sectioned on a cryostat. Representative coronal 25- $\mu$ m sections throughout the whole brain were obtained and stored at -20°C in a cryoprotectant solution (30% ethylene glycol, 20% glycerol in 0.25 mM phosphate buffer at pH 7.3) until further processing. To evaluate correct electrode implantation, sections proximal to the electrode placements were collected onto slides and processed for AChE histochemistry.

Fos immunohistochemistry was performed on floating sections under agitation. Endogenous per-

**Table 2.** c-Fos analyses

Region	Groups			
	NBM		Control	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Prefrontal cortical areas				
PL*	222.82 $\pm$ 112.68	356.46 $\pm$ 106.85	187.36 $\pm$ 81.85	200.9 $\pm$ 64.28
IL*	419.94 $\pm$ 124.24	390.61 $\pm$ 79.49	242.93 $\pm$ 94.17	263.11 $\pm$ 99.38
VLO*	745.09 $\pm$ 152.53	776.35 $\pm$ 117.38	516.26 $\pm$ 159.84	527.18 $\pm$ 110.45
LO*	620.30 $\pm$ 125.04	628.88 $\pm$ 113.34	389.26 $\pm$ 97.48	443.63 $\pm$ 155.77
Basolateral amygdala	79.22 $\pm$ 35.11	63.66 $\pm$ 34.58	47.23 $\pm$ 26.41	52.20 $\pm$ 38.31
Hippocampal subregions				
Dorsal				
CA1*	109.61 $\pm$ 71.31	83.63 $\pm$ 49.48	41.63 $\pm$ 36.07	44.94 $\pm$ 37.35
CA2–CA3*	77.68 $\pm$ 38.40	74.48 $\pm$ 25.72	47.65 $\pm$ 34.67	44.67 $\pm$ 39.22
DG	88.89 $\pm$ 48.93	85.55 $\pm$ 50.91	78.46 $\pm$ 86.20	76.41 $\pm$ 71.83
Ventral				
CA2–CA3	158.55 $\pm$ 59.58	166.91 $\pm$ 57.86	117.77 $\pm$ 50.84	126.39 $\pm$ 56.53
DG*	430.51 $\pm$ 86.53	394.98 $\pm$ 135.05	296.76 $\pm$ 181.21	238.24 $\pm$ 155.41
Subiculum	212.58 $\pm$ 99.54	178.38 $\pm$ 84.17	142.48 $\pm$ 85.07	141.16 $\pm$ 104.74

Mean  $\pm$  SD cell counts/mm<sup>2</sup> for c-Fos in standard areas of the prefrontal cortex, amygdala, and dorsal and ventral hippocampal subregions. Control group includes rats with an electrode but no stimulation (control) and rats without an electrode (sham), except for IL (electrode control only).

\**P* < 0.05: Statistically significant differences were found between NBM and control groups, regardless of hemisphere, as tested by GLM.

CA, cornu ammonis; DG, dentate gyrus; IL, infralimbic; LO, lateral orbitofrontal; NBM, nucleus basalis magnocellularis; PL, prelimbic; VLO, ventrolateral orbital.

oxidase was blocked with a solution at 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% sodium azide in potassium phosphate buffer saline (0.2 M NaCl, 43 mM potassium phosphate, KPBS) and nonspecific binding was reduced by incubating with a blocking solution containing 0.4% Triton X-100 and 3% nonfat milk in KPBS. Sections were incubated in a c-Fos rabbit polyclonal primary antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. Subsequently, sections were incubated in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200; Southern Biotechnology Assoc.) for 1 h at room temperature. Finally, sections were processed with streptavidin labeled with horseradish peroxidase (1:400; Southern Biotechnology Assoc.) for 1 h at room temperature. The c-Fos antibody-peroxidase complex was revealed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) and 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in KPBS. Sections were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated with ethanol series and coverslipped with DPX (Panreac Química SA).

#### Quantitative analysis of fos-like immunoreactivity (FLI)

Mounted sections of the tissue were photographed with a digital camera (DP-70, Olympus, Olympus Optical Co. Ltd.) attached to a microscope (BX-41, Olympus, Olympus Optical Co. Ltd.). Images were taken with a 10× magnification from different areas such as ventrolateral orbital (VLO), lateral orbitofrontal (LO), prelimbic (PL), infralimbic (IL), as well as basolateral amygdala (BLA), and hippocampal regions: dorsal and ventral CA, dorsal and ventral dentate gyrus (DG), and ventral subiculum. The brain regions were photographed at the same coordinates in each animal, using the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1997) as a reference (Fig. 5). Special care was taken to ensure that all images were taken under the same lighting conditions.

Quantification of fos-like immunoreactive (FLI) nuclei was performed using the freeware Image Processing and Analysis in Java 1.33 (ImageJ, NIH, available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For the quantification, an automated algorithm implemented on a macro was used. Briefly, for each brain area, a region of interest was drawn and stored to use in all the rats. To avoid differences between immunostaining batches, each image was digitally smoothed, and the resulting image was subtracted from the original one. The appropriate gray threshold and particle size were set for each area and maintained for all subjects. All brain regions were bilaterally counted in three sections for each rat. The mean number of FLI nuclei per mm<sup>2</sup> for each region of interest, considering the average of the three sections, is shown in Table 2. To control the efficacy of the automatic quantification, a final step was included in the macro, which consisted of merging in different colors the original image and the image resulting from the particle detection.

#### Data analysis

Cell counts per mm<sup>2</sup> were analyzed for each brain structure using a GLM analysis with one between-subject factor, the "Treatment" condition (NBM or control) and one within-subject factor, the "Hemisphere" (stimulation side: ipsi or contralateral to electrode placement). As in Experiment 1, ancillary GLM analyses of cell counts per mm<sup>2</sup> were performed for each structure, in which the factor Treatment comprised three groups (stimulated NBM, control, stimulated outside NBM).

#### Acknowledgments

This research was supported by funds provided by the Universitat Autònoma de Barcelona (UNI/2078/202), Generalitat de Catalunya (2002SGR0080, SGR2005-00551), and by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BSO2002-03441, SEJ2005-02518). We thank the Area de Fisiologia, Dept. de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia of UAB, especially Sheila Ons, for technical assistance in the immunocytochemistry procedure, and Gerald-Patrick Fannon, Ph.D., for revising the manuscript. These data were presented at the 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2004) and the 37th Annual General Meeting of the EBBS (2005).

#### References

- Alvarez, P., Lipton, P.A., Melrose, R., and Eichenbaum, H. 2001. Differential effects of damage within the hippocampal region on memory for a natural, nonspatial Odor-Odor Association. *Learn. Mem.* **8**: 79-86.
- Amenta, F., Bronzetti, E., Caporali, M.G., Ciriaco, E., Germana, G.P., Niglio, T., Ricci, A., and de Carolis, A.S. 1991. Nucleus basalis magnocellularis lesions impair mossy fiber system in rat hippocampus: A quantitative histochemical and ultrastructural study. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **12**: 49-58.
- Bailey, A.M., Rudisill, M.L., Hoof, E.J., and Loving, M.L. 2003. 192-IgG-saporin lesions to the nucleus basalis magnocellularis (nBM) disrupt acquisition of learning set formation. *Brain Res.* **969**: 147-159.
- Bakin, J.S. and Weinberger, N.M. 1996. Induction of a physiological memory in the cerebral cortex by stimulation of the nucleus basalis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 11219-11224.
- Baxter, M.G. and Chiba, A.A. 1999. Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**: 178-183.
- Baxter, M.G., Bucci, D.J., Holland, P.C., and Gallagher, M. 1999. Impairments in conditioned stimulus processing and conditioned responding after combined selective removal of hippocampal and neocortical cholinergic input. *Behav. Neurosci.* **113**: 486-495.
- Berger-Sweeney, J., Stearns, N.A., Frick, K.M., Beard, B., and Baxter, M.G. 2000. Cholinergic basal forebrain is critical for social transmission of food preferences. *Hippocampus* **10**: 729-738.
- Bjorkdahl, T.S., Dinnyan, M.A., and Weinberger, N.M. 1998. Induction of long-term receptive field plasticity in the auditory cortex of the waking guinea pig by stimulation of the nucleus basalis. *Behav. Neurosci.* **112**: 467-479.
- Brightwell, J.J., Smith, C.A., Countryman, R.A., Neve, R.L., and Colombo, P.J. 2005. Hippocampal overexpression of mutant creb blocks long-term, but not short-term memory for a socially transmitted food preference. *Learn. Mem.* **12**: 12-17.
- Bringmann, A. and Klingberg, F. 1990. Behaviour-dependent changes of the acoustically evoked potential in the frontal cortex of the freely moving rat and modulation by electrical basal forebrain stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* **49**: 597-605.
- Bunsey, M. and Eichenbaum, H. 1995. Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association. *Hippocampus* **5**: 546-556.
- Butt, A.E., Schultz, J.A., Arnold, L.L., Garman, E.E., George, C.L., and Garraghty, P.E. 2003. Lesions of the rat nucleus basalis magnocellularis disrupt appetitive-to-aversive transfer learning. *Integr. Physiol. Behav. Sci.* **38**: 253-271.
- Buzsáki, G., Bickford, R.G., Pomonareff, G., Thal, L.J., Marsdel, R., and Gage, F.H. 1988. Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J. Neurosci.* **8**: 4007-4026.
- Casamenti, F., Deffenu, G., Abbamondi, A.L., and Pepeu, G. 1986. Changes in cortical acetylcholine output induced by modulation of the nucleus basalis. *Brain Res. Bull.* **16**: 689-695.
- Chiba, A.A., Bucci, D.J., Holland, P.C., and Gallagher, M. 1995. Basal forebrain cholinergic lesions disrupt increments but not decrements in conditioned stimulus processing. *J. Neurosci.* **15**: 7315-7322.
- Chudasama, Y., Dalley, J.W., Nathwani, F., Bouger, P., and Robbins, T.W. 2004. Cholinergic modulation of visual attention and working memory: Dissociable effects of basal forebrain 192-IgG-saporin lesions and intraprefrontal infusions of scopolamine. *Learn. Mem.* **11**: 78-86.
- Clark, R.E., Broadbent, N.J., Zola, S.M., and Squire, L.R. 2002. Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *J. Neurosci.* **22**: 4663-4669.
- Conner, J.M., Culbertson, A., Packowski, C., Chiba, A.A., and Tuszyński, M.H. 2003. Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* **38**: 819-829.
- Countryman, R.A., Kaban, N.L., and Colombo, P.J. 2005a. Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiol. Learn. Mem.* **84**: 175-183.
- Countryman, R.A., Orłowski, J.D., Brightwell, J.J., Oskowitz, A.Z., and Colombo, P.J. 2005b. CREB phosphorylation and c-Fos expression in the hippocampus of rats during acquisition and recall of a socially transmitted food preference. *Hippocampus* **15**: 56-67.
- Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**: 771-784.
- Detari, L. 2000. Tonic and phasic influence of basal forebrain unit activity on the cortical EEG. *Behav. Brain Res.* **115**: 159-170.
- Dinnyan, M.A. and Weinberger, N.M. 1999. Basal forebrain stimulation induces discriminative receptive field plasticity in the auditory

- cortex. *Behav. Neurosci.* **113**: 691–702.
- Duque, A., Balatoni, B., Detari, L., and Zaborszky, L. 2000. EEG correlation of the discharge properties of identified neurons in the basal forebrain. *J. Neurophysiol.* **84**: 1627–1635.
- Edeline, J.M., Hars, B., Maho, C., and Hennevin, E. 1994. Transient and prolonged facilitation of tone-evoked responses induced by basal forebrain stimulations in the rat auditory cortex. *Exp. Brain Res.* **97**: 373–386.
- Eichenbaum, H. 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav. Brain Res.* **103**: 123–133.
- Everitt, B.J., and Robbins, T.W. 1997. Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* **48**: 649–684.
- Galef Jr., B.G., and Wigmore, S.R. 1983. Transfer of information concerning distant foods: A laboratory investigation of the 'information-centre' hypothesis. *Anim. Behav.* **31**: 748–758.
- Galef Jr., B.G., Kernett, D.J., and Stein, M. 1985. Demonstrator influence on observer diet preference: Effects of simple exposure and the presence of a demonstrator. *Anim. Learn. Behav.* **13**: 25–30.
- Galef Jr., B.G., Mason, J.R., Preti, G., and Bean, N.J. 1988. Carbon disulfide: A semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats. *Physiol. Behav.* **42**: 119–124.
- Gill, T.M., Sarter, M., and Givens, B. 2000. Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: Evidence for cholinergic modulation. *J. Neurosci.* **20**: 4745–4757.
- Gold, P.E. 2003. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **80**: 194–210.
- Golmado, L., Nunez, A., and Zaborszky, L. 2003. Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical-prefrontal-basal forebrain circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas. *Neuroscience* **119**: 597–609.
- Griffi, I., Manns, L.D., Mainville, L., and Jones, B.E. 2003. Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.* **458**: 11–31.
- Hars, B., Maho, C., Edeline, J.M., and Hennevin, E. 1993. Basal forebrain stimulation facilitates tone-evoked responses in the auditory cortex of awake rat. *Neuroscience* **56**: 61–74.
- Herdegen, T., and Leah, J.D. 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **28**: 370–400.
- Herrera, D.G., and Robertson, H.A. 1996. Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* **50**: 83–107.
- Himmelheber, A.M., Sarter, M., and Bruno, J.P. 2001. The effects of manipulations of attentional demand on cortical acetylcholine release. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* **12**: 353–370.
- Jimenez-Capdeville, M.E., Dykes, R.W., and Myasnikov, A.A. 1997. Differential control of cortical activity by the basal forebrain in rats: A role for both cholinergic and inhibitory influences. *J. Comp. Neurol.* **381**: 53–67.
- Johnston, M.V., McKinney, M., and Coyle, J.T. 1979. Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 5392–5396.
- Kilgard, M.P., and Merzenich, M.M. 1998. Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science* **279**: 1714–1718.
- Kilgard, M.P., Pandya, P.K., Vazquez, J., Gehl, A., Schreiner, C.E., and Merzenich, M.M. 2001. Sensory input directs spatial and temporal plasticity in primary auditory cortex. *J. Neurophysiol.* **86**: 326–338.
- Kogan, J.H., Frankland, P.W., Bredy, J.A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schutz, G., and Silva, A.J. 1997. Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr. Biol.* **7**: 1–11.
- Kurosawa, M., Sato, A., and Sato, Y. 1989. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases acetylcholine release in the cerebral cortex in rats. *Neurosci. Lett.* **98**: 45–50.
- Langlais, P.J., Connor, D.J., and Thal, L. 1993. Comparison of the effects of single and combined neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis and dorsal noradrenergic bundle on learning and memory in the rat. *Behav. Brain Res.* **54**: 81–90.
- Lehmann, J., Nagy, J.L., Atmadi, S., and Filbiger, H.C. 1980. The nucleus basalis magnocellularis: The origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neuroscience* **5**: 1161–1174.
- Lehmann, O., Grottick, A.J., Cassel, J.C., and Higgins, G.A. 2003. A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 651–666.
- Linster, C., Garcia, P.A., Hasselmo, M.E., and Baxter, M.G. 2001. Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odors. *Behav. Neurosci.* **115**: 826–833.
- Lipton, P.A., Alvarez, P., and Eichenbaum, H. 1999. Crossmodal associative memory representations in rodent orbitofrontal cortex. *Neuron* **22**: 349–359.
- Manns, L.D., Alonso, A., and Jones, B.E. 2003. Rhythmically discharging basal forebrain units comprise cholinergic, GABAergic, and putative glutamatergic cells. *J. Neurophysiol.* **89**: 1057–1066.
- Mayeux-Portas, V., File, S.E., Stewart, C.L., and Morris, R.J. 2000. Mice lacking the cell adhesion molecule Thy-1 fail to use socially transmitted cues to direct their choice of food. *Curr. Biol.* **10**: 68–75.
- McGaughy, J., Kaiser, T., and Sarter, M. 1996. Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: Selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density. *Behav. Neurosci.* **110**: 247–265.
- McGaughy, J., Dalley, J.W., Morrison, C.H., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. 2002. Selective behavioral and neurochemical effects of cholinergic lesions produced by intrabasalis infusions of 192 IgG-saporin on attentional performance in a five-choice serial reaction time task. *J. Neurosci.* **22**: 1905–1913.
- McKinney, M., and Jacksonville, M.C. 2005. Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochim. Pharmacol.* **70**: 1115–1124.
- McLin III, D.E., Miasnikov, A.A., and Weinberger, N.M. 2002. The effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on the electroencephalogram, heart rate, and respiration. *Behav. Neurosci.* **116**: 795–806.
- McLin III, D.E., Miasnikov, A.A., and Weinberger, N.M. 2003. CS-specific gamma, theta, and alpha EEG activity detected in stimulus generalization following induction of behavioral memory by stimulation of the nucleus basalis. *Neurobiol. Learn. Mem.* **79**: 152–176.
- Mercado, E., Bao, S., Orduna, L., Gluck, M.A., and Merzenich, M.M. 2001. Basal forebrain stimulation changes cortical sensitivities to complex sound. *Neuroreport* **12**: 2283–2287.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., and Levey, A.I. 1983. Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). *Neuroscience* **10**: 1185–1201.
- Metherate, R., and Ashe, J.H. 1991. Basal forebrain stimulation modifies auditory cortex responsiveness by an action at muscarinic receptors. *Brain Res.* **559**: 163–167.
- Metherate, R., Cox, C.L., and Ashe, J.H. 1992. Cellular bases of neocortical activation: Modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J. Neurosci.* **12**: 4701–4711.
- Miasnikov, A.A., McLin III, D., and Weinberger, N.M. 2001. Muscarinic dependence of nucleus basalis induced conditioned receptive field plasticity. *Neuroreport* **12**: 1537–1542.
- Miasnikov, A.A., Chen, J.C., and Weinberger, N.M. 2006. Rapid induction of specific associative behavioral memory by stimulation of the nucleus basalis in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **86**: 47–65.
- Montero-Pastor, A., Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., Nadal-Alemar, R., Marti-Nicolovius, M., and Morgado-Bernal, I. 2001. Nucleus basalis magnocellularis electrical stimulation facilitates two-way active avoidance retention, in rats. *Brain Res.* **900**: 337–341.
- Montero-Pastor, A., Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., and Marti-Nicolovius, M. 2004. Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention, and retrieval. *Behav. Brain Res.* **154**: 41–54.
- Muir, J.L., Dunnett, S.B., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. 1992. Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: Effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task. *Exp. Brain Res.* **89**: 611–622.
- Otto, T., and Eichenbaum, H. 1992. Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. *Behav. Neurosci.* **106**: 762–775.
- Pandya, P.K., Moucha, R., Engineer, N.D., Rathbun, D.L., Vazquez, J., and Kilgard, M.P. 2005. Asynchronous inputs alter excitability, spike timing, and topography in primary auditory cortex. *Heur. Res.* **203**: 10–20.
- Panoska, I., Sagratella, S., Scotti de Carolis, A., Zeng, Y.C., and Armenta, F. 1995. Microanatomical and electrophysiological changes of the rat dentate gyrus caused by lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Neurosci. Lett.* **190**: 207–211.
- Paxinos, G., and Watson, C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, Amsterdam.
- Quiroz-Padilla, M.F., Guillazo-Blanch, G., Vale-Martinez, A., and Marti-Nicolovius, M. 2006. Excitotoxic lesions of the parafascicular nucleus produce deficits in a socially transmitted food preference. *Neurobiol. Learn. Mem.* (in press).
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., and Tsien, R.Z. 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat.*

- Neurosci.* **3**: 238–244.
- Rasmusson, D.D. 2000. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav. Brain Res.* **115**: 205–218.
- Ridley, R.M., Baker, H.E., Leow-Dyke, A., and Cummings, R.M. 2005. Further analysis of the effects of immunotoxic lesions of the basal nucleus of Meynert reveals substantial impairment on visual discrimination learning in monkeys. *Brain Res. Bull.* **65**: 433–442.
- Robbins, T.W. 2002. The 5-choice serial reaction time task: Behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology* **163**: 362–380.
- Roberts, M. and Shapiro, M. 2002. NMDA receptor antagonists impair memory for nonspatial, socially transmitted food preference. *Behav. Neurosci.* **116**: 1059–1069.
- Ross, R.S. and Eichenbaum, H. 2006. Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J. Neurosci.* **26**: 4852–4859.
- Ross, R.S., McGaughy, J., and Eichenbaum, H. 2005. Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference. *Learn. Mem.* **12**: 302–306.
- Roulet, F., Lienard, F., Datiche, F., and Cattarelli, M. 2005. Fos protein expression in olfactory-related brain areas after learning and after reactivation of a slowly acquired olfactory discrimination task in the rat. *Learn. Mem.* **12**: 307–317.
- Sabbatini, M., Bronzetti, E., Felici, L., Fringuelli, C., Sagratella, S., and Amenta, F. 1999. NADPH-diaphorase histochemistry in the rat cerebral cortex and hippocampus: Effect of electrolytic lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Mech. Ageing Dev.* **107**: 147–157.
- Saddoris, M.P., Gallagher, M., and Schoenbaum, G. 2005. Rapid associative encoding in basolateral amygdala depends on connections with orbitofrontal cortex. *Neuron* **46**: 321–331.
- Sarter, M. and Bruno, J.P. 2002. The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections. *Eur. J. Neurosci.* **15**: 1867–1873.
- Sarter, M., Givens, B., and Bruno, J.P. 2001. The cognitive neuroscience of sustained attention: Where top-down meets bottom-up. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**: 146–160.
- Sarter, M., Bruno, J.P., and Givens, B. 2003. Attentional functions of cortical cholinergic inputs: What does it mean for learning and memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* **80**: 245–256.
- Schoenbaum, G., Chiba, A.A., and Gallagher, M. 1998. Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. *Nat. Neurosci.* **1**: 155–159.
- Semba, K. 2000. Multiple output pathways of the basal forebrain: Organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav. Brain Res.* **115**: 117–141.
- Tronel, S. and Sara, S.J. 2002. Mapping of olfactory memory circuits: Region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn. Mem.* **9**: 105–111.
- Turchi, J. and Sarter, M. 1997. Cortical acetylcholine and processing capacity: Effects of cortical cholinergic deafferentation on crossmodal divided attention in rats. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* **6**: 147–158.
- Vale-Martinez, A., Baxter, M.G., and Eichenbaum, H. 2002. Selective lesions of basal forebrain cholinergic neurons produce anterograde and retrograde deficits in a social transmission of food preference task in rats. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 983–998.
- Versier, D. and Dykes, R.W. 2001. Long-term cholinergic enhancement of evoked potentials in rat hindlimb somatosensory cortex displays characteristics of long-term potentiation. *Exp. Brain Res.* **137**: 71–82.
- Waite, J.J., Wardlow, M.L., and Power, A.E. 1999. Deficit in selective and divided attention associated with cholinergic basal forebrain immunotoxic lesion produced by 192-saporin: motoric/sensory deficit associated with Parkinje cell immunotoxic lesion produced by OX7-saporin. *Neurobiol. Learn. Mem.* **71**: 325–352.
- Weinberger, N.M. 2003. The nucleus basalis and memory codes: Auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **80**: 268–284.
- Weinberger, N.M. 2004. Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 279–290.
- Wenk, G.L. 1997. The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: One hundred years of progress. *Neurobiol. Learn. Mem.* **67**: 85–95.
- Wenk, H., Bigl, V., and Meyer, U. 1980. Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res.* **2**: 295–316.
- Wenk, G.L., Markowska, A.L., and Olton, D.S. 1989. Basal forebrain lesions and memory: Alterations in neurotensin, not acetylcholine, may cause amnesia. *Behav. Neurosci.* **103**: 765–769.
- Whishaw, I.Q., Tomie, J.A., and Kolb, B. 1992. Ventrolateral prefrontal cortex lesions in rats impair the acquisition and retention of a tactile-olfactory configural task. *Behav. Neurosci.* **106**: 597–603.
- Winocur, G. 1990. Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behav. Brain Res.* **38**: 145–154.
- Winocur, G. and Moscovitch, M. 1999. Anterograde and retrograde amnesia after lesions to frontal cortex in rats. *J. Neurosci.* **19**: 9611–9617.
- Winocur, G., McDonald, R.M., and Moscovitch, M. 2001. Anterograde and retrograde amnesia in rats with large hippocampal lesions. *Hippocampus* **11**: 18–26.
- Winters, B.D. and Bussey, T.J. 2005. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **21**: 2263–2270.
- Wood, H. and de Belleruche, J. 1991. Induction of c-fos mRNA in cerebral cortex by excitotoxin stimulation of cortical inputs: Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **545**: 183–190.
- Woolf, N.J., Eckenstein, F., and Butcher, L.L. 1983. Cholinergic projections from the basal forebrain to the frontal cortex: A combined fluorescent tracer and immunohistochemical analysis in the rat. *Neurosci. Lett.* **40**: 93–98.
- Works, S.J., Wilson, R.E., and Wellman, C.L. 2004. Age-dependent effect of cholinergic lesion on dendritic morphology in rat frontal cortex. *Neurobiol. Aging* **25**: 963–974.
- Wrenn, C.C., Harris, A.P., Saavedra, M.C., and Crawley, J.N. 2003. Social transmission of food preference in mice: Methodology and application to galanin-overexpressing transgenic mice. *Behav. Neurosci.* **117**: 21–31.
- Zhang, Y., Hakes, J.J., Bonfield, S.P., and Yan, J. 2005. Corticofugal feedback for auditory midbrain plasticity elicited by tones and electrical stimulation of basal forebrain in mice. *Eur. J. Neurosci.* **22**: 871–879.

Received May 2, 2006; accepted in revised form July 21, 2006.



## **2. TREBALL 2:**

**Muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat prelimbic cortex impairs the social transmission of food preference.**

Boix-Trelis N., Vale-Martínez A., Guillazo-Blanch G., Martí-Nicolovius M.

*Neurobiology of Learning and Memory* (2007), doi: 10.1016/j.nlm.2006.12.003

## 2.1 Introducció

Diferents estudis han demostrat la participació del sistema colinèrgic de l'NBM en l'adquisició de la TSPA, una tasca relacional d'aprenentatge associatiu entre dues olors (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a). En el treball anterior, vam mostrar com la EIC de l'NBM aplicada preentrenament millorava l'adquisició de la tasca tant quan es realitzava un test immediatament després de l'entrenament social com 24 hores després (Boix-Trelis *i col.*, 2006). Aquesta facilitació de la tasca per l'EIC de l'NBM podria estar mitjançada per un augment de l'ACh cortical tenint en compte el paper crític del sistema colinèrgic en la modulació dels aprenentatges olfactivs (De Rosa i Hasselmo, 2000; Ravel *i col.*, 1994; Ross *i col.*, 2005) i de la memòria social (revisat a Vale-Martinez *i col.*, 2002a).

Per tal de determinar les dianes corticals de l'NBM que participarien en l'adquisició de la TSPA, Ross *i col.* (2005) van demostrar que les lesions colinèrgiques de l'OFC, un component del còrtex prefrontal, impediè la TSPA, implicant la modulació colinèrgica d'aquesta àrea en l'adquisició i el record de la preferència alimentària. Tot i així, altres àrees prefrontals de projecció de l'NBM podrien ser rellevants per la TSPA. En aquest sentit, el còrtex PL, podria ser una de les àrees responsables de mitjançar la millora de la TSPA induïda per l'EIC de l'NBM ja que mostra una forta activació, mesurada per la seva expressió de c-Fos, després de l'EIC de l'NBM (Boix-Trelis *i col.*, 2006). A més, el PL es relaciona amb àrees involucrades en el processament d'olors i l'aprenentatge olfactiv ja que rep projeccions del bulb olfatori (Neafsey *i col.*, 1986), i amb l'hipocamp i el subiculum que són regions cerebrals rellevant per la TSPA (revisat a Heidbreder i Groenewegen, 2003).

En aquest context, en aquest segon treball ens vam plantejar estudiar el paper del còrtex PL en la TSPA, avaluant els efectes del bloqueig muscarínic preentrenament en aquesta àrea sobre la tasca.



## 2.2 Experiment 3

### **2.2.1. Objectius i Procediment**

▪ Avaluar els efectes del bloqueig dels receptors muscarínics del PL mitjançant la infusió preentrenament d'escopolamina sobre la preferència pel menjar entrenat juntament amb altres variables involucrades en la TSPA, en dos intervals de retenció (immediat i 24 hores).

Per aconseguir aquest objectiu, vam utilitzar 22 subjectes que vam distribuir aleatòriament en els següents grups experimentals:

	<b>TEST IMMEDIAT + TEST 24 HORES</b>
<b>ESCOPOLAMINA</b>	n=10 (SCOP)
<b>VEHICLE</b>	n=12 (VEH)

**Taula 3. Nombre total de subjectes utilitzats en l'experiment 3 distribuïts en cada grup experimental.**

El procediment va consistir en la infusió bilateral de PBS (VEH) o d'una dosi de 20 µg d'escopolamina (SCOP) (volum: 0.5 µl/hemisferi, velocitat: 0.25 µl/min) al còrtex PL immediatament abans de l'entrenament de la TSPA. La dosi de 20 µg d'escopolamina es va escollir en base a estudis previs que mostraven dèficits d'aprenentatge en subjectes en els quals se'ls hi havia administrat la mateixa dosi en l'EPFm (Nieto-Escamez *i col.*, 2002). A més, resultats obtinguts en el nostre laboratori mostraven dèficits de memòria en una tasca de discriminació olfàctòria en subjectes que havien rebut una infusió d'escopolamina de 20 µg al PL, sense provocar problemes motors o d'ofec (Carballo-Marquez *i col.*, 2006)

Igual que en el treball 1, l'entrenament estava format per tres sessions d'interacció social de 20 minuts de durada cadascuna, en les quals el subjecte observador interaccionava amb un subjecte demostrador que prèviament havia menjat un aliment aromatitzat (cacau o canyella). Les sessions d'interacció social es realitzaven separades per períodes d'una hora i immediatament després de la tercera interacció i 24 hores més tard es realitzaven els tests de retenció (Figura 4). En aquest tercer experiment, tots els subjectes realitzaven el test immediat i 24 hores. Ens interessava especialment conèixer l'efecte de l'escopolamina sobre la retenció immediata, ja que en l'experiment 1 l'EIC de l'NBM havia mostrat un efecte especialment significatiu en aquest test, no obstant, també



volíem analitzar 24 hores més tard als mateixos subjectes sense estar sota la influència de l'escopolamina.

Durant els tests, als subjectes observadors se'ls hi presentaven dos pots de menjar, un pot contenia el menjar aromatitzat que havien olorat dels demostradors (menjar entrenat) i l'altre pot contenia menjar aromatitzat no familiar (menjar no entrenat) i se'ls permetia menjar lliurement durant 45 minuts. Finalitzat aquest període, es calculava el percentatge de preferència pel menjar entrenat:  $(\text{consum de menjar entrenat} / \text{consum total}) \times 100$ .

El comportament dels subjectes durant les tres interaccions socials i el test també es va enregistrar amb una càmera de vídeo i es van analitzar les mateixes mesures que en el treball 1: número de vegades que el subjecte observador olorava el musell, el cos i la zona anogenital del demostrador, així com els *groomings* de l'observador i els episodis de lluita entre el demostrador i l'observador. Durant el test també es va analitzar el nombre de vegades que el subjectes pujaven amb les potes davanteres sobre els pots de menjar.

A més, per determinar que la infusió d'escopolamina no provoqués alteracions olfactòries es va realitzar un test de percepció olfactiva al final de l'experiment (Figura 5) (Wrenn *i col.*, 2003). Aquest test consistia en amagar un tros de galeta en els flocs d'una gàbia i mesurar la latència per trobar-la immediatament després de que els subjectes haguessin rebut una infusió d'escopolamina (SCOP) o de PBS (VEH).

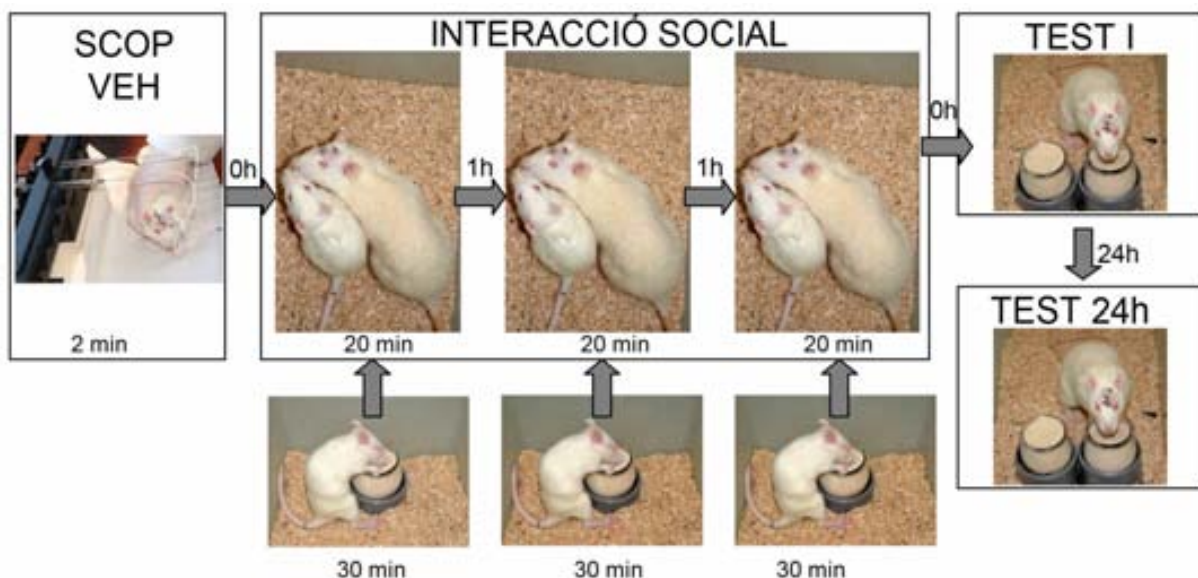


Figura 4. Resum de les etapes de la tasca de transmissió social de preferència alimentària.

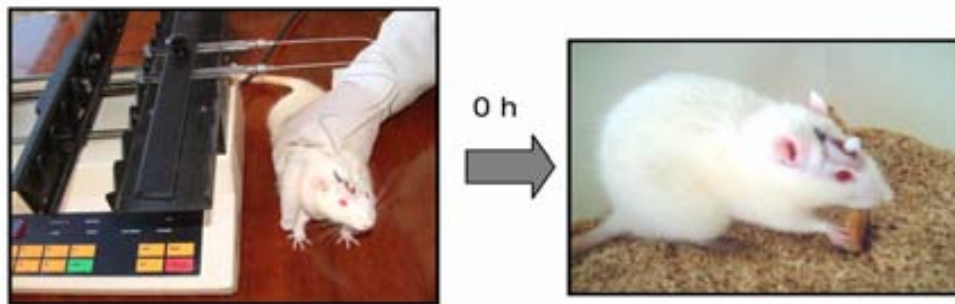


Figura 5. Test de percepció olfactiva.

### 2.2.2 Resum dels Resultats

Els principals resultats obtinguts en aquest experiment van ser els següents:

- La infusió preentrenament d'escopolamina al PL va provocar dèficits en el test realitzat immediatament després de l'entrenament de la TSPA que es van mantenir 24 hores després.
- La infusió d'escopolamina al PL, en canvi, no va afectar d'altres variables com la sensibilitat olfactiva, la motivació pel consum d'aliment, la neofòbia ni el grau d'interacció social o de locomoció o d'activitat exploratòria.

Aquests resultats mostren que el bloqueig muscarínic del PL previ a l'entrenament de la TSPA, n'impedeix la seva adquisició i la posterior retenció. A més, el dèficit observat en la TSPA no és atribuïble a factors secundaris com la sensibilitat olfactiva, la motivació pel menjar, la neofòbia o l'exploració ja que aquestes variables no s'han vist afectades per la infusió d'escopolamina. Aquestes dades suggereixen, doncs, que la transmissió muscarínica al PL és essencial per la TSPA, i concorden amb els diferents estudis que han mostrat la importància del sistema colinèrgic cortical per aquesta forma de memòria olfactiva relacional.



## Muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat prelimbic cortex impairs the social transmission of food preference

Núria Boix-Trelis, Anna Vale-Martínez\*, Gemma Guillazo-Blanch, Margarita Martí-Nicolovius

*Departament de Psicobiologia i Metodologia de les Ciències de la Salut, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 3 October 2006; revised 1 December 2006; accepted 4 December 2006

Available online 12 January 2007

### Abstract

Previous findings demonstrate the involvement of the cholinergic NBM in the acquisition of the social transmission of food preference (STFP), a relational associative odor-guided learning task. There is also evidence that muscarinic receptors in the medial prefrontal cortex, an important NBM target area, may modulate olfactory associative memory. The present experiment determined the consequences of blocking muscarinic cholinergic receptors in a component of the medial prefrontal region (the prelimbic cortex) on the STFP task. Adult male Wistar rats were bilaterally infused with scopolamine (20 µg/site) prior to training and showed a severe impairment in the expression of the task measured in two retention sessions, both immediately and 24 h after training. Local scopolamine injections in the prelimbic cortex did not affect other behavioral measures such as olfactory perception, social interaction, motivation to eat, neophobia, or exploration. Results suggest that muscarinic transmission in the prelimbic cortex is essential for the STFP, supporting the hypothesis that ACh in a specific prefrontal area is important for this naturalistic form of olfactory relational memory. Current data are discussed in the context of disruption of learning as a result of interferences in PLC functions such as behavioral flexibility, attention, and strategic planning.  
© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Scopolamine; Acetylcholine; Medial prefrontal cortex; Relational memory; Social learning; Olfactory task; Behavioral flexibility; Attention

### 1. Introduction

The social transmission of food preference (STFP) has been characterized as a social nonspatial relational memory task (Alvarez, Wendelken, & Eichenbaum, 2002), in which a rodent “observer” interacts with a “demonstrator”, a conspecific that has recently eaten odorized food (Galef, Kennett, & Stein, 1985). The STFP requires a natural odor-odor association since the observers associate the food odor and a constituent of the demonstrator’s breath (Galef, Mason, Preti, & Bean, 1988), expressing their memory through a substantial enhanced preference for whatever food the demonstrator ate (Galef et al., 1985). Some STFP

features indicate that it may be considered as a form of relational memory. Firstly, it is learned quickly in a single episode. Secondly, it entails expression of memory in a food-choice situation that is noticeably different from the learning event, which occurred in a social context. Moreover, the rats should make a flexible use of odor information as only one of the two stimuli that formed the association during learning (food odor) is presented to guide subjects’ eating behavior in the preference test. This behavioral paradigm appears therefore to involve adaptation to a new environment as it requires the ability to respond to a different stimulus presentation, and thus it can be viewed as requiring cognitive flexibility. Hence, flexible expression of memory (a relational memory characteristic) may be considered as an inherent part of memory performance in STFP (Alvarez, Lipton, Melrose, & Eichenbaum, 2001; Bunsey & Eichenbaum, 1995).

\* Corresponding author. Fax: +34 93 581 2001.  
E-mail address: [Anna.Vale@uab.es](mailto:Anna.Vale@uab.es) (A. Vale-Martínez).



The integrity of the hippocampus and related areas is necessary for delayed but not for immediate recall of the STFP (Bunsey & Eichenbaum, 1995; Clark et al., 2002; Countryman, Kaban, & Colombo, 2005; Roberts & Shapiro, 2002; Winocur, 1990; Winocur, McDonald, & Moscovitch, 2001), which suggests that extrahippocampal circuitry may be relevant for the acquisition and/or the early stages of STFP memory formation (e.g., Quiroz-Padilla, Guillazo-Blanch, Vale-Martinez, & Marti-Nicolovius, 2006). In this regard, pretraining selective cholinergic damage of the nucleus basalis magnocellularis (NBM) of the basal forebrain severely disrupts both immediate and 24-h STFP retention tests (Vale-Martinez, Baxter, & Eichenbaum, 2002). Conversely, pretraining NBM electrical stimulation improves the acquisition of the task when tested immediately after social training or following a delay of 24 h (Boix-Trelis, Vale-Martinez, Guillazo-Blanch, Costa-Miserachs, & Marti-Nicolovius, 2006). Facilitation of the STFP task by NBM electrical stimulation may have been mediated by cortical ACh augmentation in view of the critical role of the cholinergic system in the modulation of olfactory learning (De Rosa & Hasselmo, 2000; Ravel, Elaagouby, & Gervais, 1994; Ross, McGaughy, & Eichenbaum, 2005) and social memory (reviewed in Vale-Martinez et al., 2002). Specifically, it has been shown that the cholinergic muscarinic receptors contribute to central modulation of odor memory (Hunter & Murray, 1989; Ravel, Vigouroux, Elaagouby, & Gervais, 1992; Wilson, 2001).

In an attempt to elucidate the NBM cortical targets that may be involved in the acquisition of STFP, Ross et al. (2005) demonstrated that a restricted cholinergic depletion, by means of a 192 immunoglobulin G-saporin infusion directly into the orbitofrontal cortex (OFC), impaired STFP. Although these findings implicate cholinergic modulation in the OFC in the acquisition or retrieval of a food preference, other prefrontal NBM efferents may also be relevant for this form of relational learning. The prelimbic cortex (PLC), a component of the medial prefrontal region, has been proposed to mediate the NBM stimulation induced-STFP enhancement as it showed strong activation after NBM electrical stimulation, measured by c-Fos expression (Boix-Trelis et al., 2006). Moreover, the PLC is related to areas involved in odor processing and olfactory learning since it receives inputs from the olfactory bulb (Neafsey, Hurley-Gius, & Arvanitis, 1986) and from the hippocampus proper and the subiculum (reviewed in Heidbreder & Groenewegen, 2003), the latter of which is, in turn, one of the areas activated during retrieval conducted shortly after STFP training (Ross & Eichenbaum, 2006). The PLC appears to contribute to several functions necessary for relational learning such as behavioral flexibility (Dias & Aggleton, 2000; Ragozzino, Detrick, & Kesner, 1999; Ragozzino, Kim, Hassert, Minniti, & Kiang, 2003), working memory and attention (Dalley, Cardinal, & Robbins, 2004a), allowing the organization and expression of adaptive behavior in novel circumstances (Gisquet-Verrier & Delatour, 2006; Dalley et al., 2004b). It is of interest

that local infusions of the muscarinic cholinergic receptor antagonist scopolamine in the PLC produced deficits in the performance of a task measuring visual attention and working memory, similar to those induced by NBM cholinergic lesions (Chudasama, Dalley, Nathwani, Bouger, & Robbins, 2004). In this context, the present study addresses whether muscarinic receptors of PLC are involved in food preference learning. In particular, this experiment determines the effects of scopolamine injected bilaterally in the PLC prior to training on the STFP, measured both immediately and 24 h after the social learning. Given that the PLC is a prefrontal region closely related to a critical area for STFP, the NBM (Boix-Trelis et al., 2006; Luiten, Gaykema, Traber, & Spencer, 1987; Saper, 1984), and that the PLC is important for both olfactory learning and functions linked to relational learning, it was predicted that muscarinic transmission blockade in the PLC would deteriorate STFP.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Thirty-five Wistar rats (obtained from our laboratory breeding stock) weighing 424.55 g (SD = 36.97) and 89.87 (SD = 6.06) days old at the beginning of the experiment were used as observer subjects. An additional set of 20 juvenile Wistar male rats (mean age = 31.47 days, SD = 2.51), weighing 113.66 g (SD = 18.98) at the beginning of the experiment, served as demonstrator subjects. A separate set of 10 male Wistar rats weighing 449.70 g (SD = 45.10) and 92.80 (SD = 2.04) days old were used as pilot subjects to test the innate preference between the two odors (cocoa 2.2%–cinnamon 1%).

Throughout the experiment the subjects were housed singly in 22 × 22 × 14-cm plastic-bottomed cages with sawdust bedding, with the exception of the demonstrators that were placed in groups of four in 50 × 22 × 14-cm cages. All rats were maintained on a 12-h light–dark cycle in a humidity and temperature-controlled environment. Experiments were performed during the light phase of the cycle (off-peak times) as it has been shown that the time of testing has either a slight or null effect on the performance of young rats in several learning tasks (Coll-Andreu, Marti-Nicolovius, & Morgado-Bernal, 1991; Winocur & Hasher, 1999, 2004). Rat-chow pellets (Panlab SL, A04) and water were provided *ad libitum* except during pretraining, training, and testing for the task. In such phases, the rats were submitted to a food restriction schedule (five pellets/day for observers and pilots, and four pellets/day for demonstrators) to be maintained approximately at 85% of their basal body weight. Every day the animals were weighed, handled and restrained for 5 min to habituate them to the injection procedure. Experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive for care and use of laboratory animals (86/609/ECC) and with Generalitat de Catalunya authorization (DOGC 2450 7/8/1997, DARP protocol No. 3211).

### 2.2. Surgery

Animals were anesthetized initially with 5% isoflurane (Forane<sup>®</sup>, Abbot Laboratories, SA) in oxygen (0.8 l/min) in a Plexiglas chamber for 7 min and thereafter maintained with 2.5%–3.5% isoflurane in oxygen (0.4 l/min) and placed in a stereotaxic head holder (Model 1504, Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). The skull was exposed through a midline incision and leveled along the bregma–*z* axis. All observers underwent stereotaxic implantation of a chronic double-guide cannula. Each guide cannula consisted of a plastic cylinder comprising two 26-gauge metal tubes that were 1.2 mm apart, projecting 2.6 mm from the pedestal (Plastics One<sup>®</sup>, Bilaney Consultants GMBH). The cannula was mounted on the arm of the stereotaxic frame and was lowered through craniotomies at the

following coordinates in the prelimbic cortex: AP, +0.35 mm from bregma; ML,  $\pm 0.6$  mm from midline, and DV,  $-0.29$  mm from cranium surface (Paxinos & Watson, 1997). The cannula was then implanted and affixed with dental cement (Vertex self-curing, Dentimes, Zeist, Holland) and stainless-steel screws, which held the cannula in place. Sterile dummy stylets (Plastics One<sup>®</sup>) were placed into the cannulae to prevent occlusion. After surgery, the skin was sutured and antiseptic (Topionic, Almirall Prodesfarma, Barcelona, Spain) was applied to the sutured area. The rats were returned to home cages for 10 days (4 days for recovery, 4 days for food restriction, and 2 days for rehabilitation to ground food) before behavioral training. During the 10-day recovery period, the dummy stylets were changed every other day.

### 2.3. Microinfusion procedure

Two days prior to STFP training, observers were adapted to a mock infusion protocol (no solutions injected) in order to minimize any stress associated with the procedure. The following day, immediately before STFP training, the rats were gently restrained while the dummy stylets were removed and replaced with a 33-gauge stainless-steel double injector (Plastics One<sup>®</sup>) extending 1 mm below the cannula tips. The double injectors were connected by polyethylene tubing (Plastics One<sup>®</sup>) to two 5- $\mu$ l syringes (Hamilton, Microliter Syringes, Switzerland) mounted in an infusion pump (Pump 22 Multiple Syringe Pump, Harvard Apparatus, USA). Scopolamine (Scopolamine Hydrobromide USP, Sigma-Aldrich) was dissolved in PBS (phosphate-buffered saline 0.1 M, pH 7.4) and a dose of 20  $\mu$ g/hemisphere was administered to rats in the SCOP group. The rats in the control VEH group received vehicle (PBS) injections. The solutions were infused bilaterally in a volume of 0.5  $\mu$ l/hemisphere for 2 min. The inner cannulae were left in place for 1 min after the infusion was complete to allow for diffusion. A 20  $\mu$ g dose was used on the basis of previous studies showing learning deficits in rats when infused in the medial prefrontal cortex (Nieto-Escamez, Sanchez-Santed, & de Bruin, 2002). In addition, data from our laboratory showed memory deficits in an olfactory task in rats infused with 20  $\mu$ g of scopolamine in the PLC, without causing any motor or choking problems (Carballo-Marquez et al., 2006).

### 2.4. Apparatus

All observers were habituated, trained and tested in 50  $\times$  22  $\times$  14-cm plastic-bottomed cages with sawdust bedding. Habituation and testing were carried out using a feeding-tray placed in the animals' cages. The tray consisted of a black Plexiglas base (21  $\times$  21 cm) with two adjacent plastic pots fixed onto the center of the base. The food was placed in two glass jars (130 ml) secured within each plastic pot. For the demonstrators, habituation, and training were carried out in 22  $\times$  22  $\times$  14-cm plastic cages in which they were allowed to eat from a glass jar mounted upon the center of a black Plexiglas base (21  $\times$  10 cm).

### 2.5. Behavioral procedure

#### 2.5.1. Habituation to food jars

After 7 days of food restriction and prior to surgery, observers and demonstrators were habituated to powdered chow (Panlab SL, A04) from glass jars to minimize neophobia, for 2 h on the first day, 1 h the second day and 45 min the third day. The rats were presented with food cups in feeding trays containing ground, unflavored rat-chow. The amount of food eaten was determined and only rats eating at least 2 g of food on the last day were included in the study. One observer rat was excluded on the basis of this criterion. A similar procedure was repeated 7 days after surgery for the observers (two 45-min rehabilitation sessions). Subsequently, animals were food-restricted once again for 2 days before the training-testing sessions began.

#### 2.5.2. STFP training and testing

Before training was conducted, each observer was assigned randomly to be cued to one of the two components of the odor pair and counterbal-

anced in each group. Rats were habituated to the training cage and room for 30 min before infusion and training. The task began when a demonstrator was allowed to eat food cued to 2.2% cocoa (Oxfam Fairtrade, Belgium) or 1% cinnamon (Carmencita, Alicante, Spain) for 30 min. Demonstrators were only used if they had eaten at least 2 g of flavored chow (all rats met this criterion). Following the 30-min period, observers received a bilateral intracerebral infusion of PBS (VEH;  $n = 17$ ) or 20  $\mu$ g of scopolamine (SCOP;  $n = 18$ ) in the PLC cortex. Immediately after, a demonstrator that had just eaten flavored chow was placed into the observer's cage. The two rats were allowed to interact with no barriers for 20 min, following which the demonstrator was removed. Each observer was exposed, at 1-h intervals, to three different demonstrators, all of which had eaten the same odorant.

All observers were tested immediately after the third interaction (immediate test) and 24 h after (24 h test) by placing two jars filled with odorized food and with water also available. One of the jars contained the chow that was given to demonstrators (trained food) and the second jar contained a different scented chow (untrained food). Jar placement was counterbalanced to eliminate any left-right response bias. The observers were allowed to eat for 45 min, after which both food jars were removed and weighed to determine the amount of food eaten from each. A preference score (percentage of trained food) for the trained odor was calculated as follows:  $100 \times (\text{weight of trained food eaten} / \text{weight of all food eaten})$ . Subjects' behavior during the three social interactions and testing was recorded on a video camera (Panasonic RX22) connected to a monitor. We scored the number of times each observer sniffed the muzzle, body or anogenital region of the demonstrator, as well as grooming and fighting bouts during the 10 first minutes of each interaction. A sniff was defined as close orientation (<2 cm) of the observer's muzzle toward the demonstrator (Wrenn, Harris, Saavedra, & Crawley, 2003). During the first 10 min of testing, the number of times the observer was on top of the jar with both forepaws was also scored (*jar climbs*).

#### 2.5.3. Buried-food olfactory test

To test for olfactory alterations due to the scopolamine infusion, an olfactory test (Wrenn et al., 2003) was conducted at the end of the experiment. Twenty-four hours before the olfactory test, observers were habituated to butter-flavored cookies (Brambly hedge, Denmark), pieces of which were placed in the home cages overnight. The rats were then food-restricted for 24 h prior to the infusion and the test. Immediately before the test, rats were infused with scopolamine (SCOP) or PBS (VEH). The test was conducted in clean rat cages (50  $\times$  22  $\times$  14 cm) and a piece of cookie was buried in a corner of each cage with a different location for each rat. The observer was then placed in the cage, and latency in finding the buried cookie and commencing eating was timed.

### 2.6. Histology

Upon completion of the behavioral testing, the observers were deeply anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (Doletal, Vetquinol SA Madrid, Spain; 200 mg/kg i.p.). Previously, a subset of rats received a 0.5- $\mu$ l infusion of 5% thionin (Thionin acetate, Sigma-Aldrich) through each guide cannula. Rats were perfused transcardially with 0.9% saline followed by 10% formalin. The cannulae were carefully removed and brains were postfixed in 10% formalin for at least 24 h and then submerged in a 30% sucrose solution and allowed to sink for cryoprotection. Coronal 40- $\mu$ m sections were cut on a cryostat (Reichert-Jung, Cryocut 1800) with microtome (2020, Heidelberg, Germany) and Nissl-stained with Cresyl violet. The sections were examined to verify cannula placement by two independent observers under a light microscope (Olympus BX 41; Olympus Optical CO, LTD, Japan). Microphotographs of the cannula placements were taken with a digital camera (Olympus DP70).

### 2.7. Data analysis

A one-sample *t* test (SPSS v12 software, SPSS Iberica, Madrid, Spain) against a constant (50) was used for each group to determine whether the percentage of trained food eaten was different from the chance level (50%).



Another analysis was performed by means of ANOVA, in which the independent variable was considered to be categorical: "Group" (SCOP, VEH), and the dependent variable to be quantitative (repeated measures regarding delay, immediate or 24 h): "Percentage of Trained Food". Student's paired *t* tests were used to analyze the differences between consumption of trained and untrained foods for each group. A *t* test pairs was used to analyze innate preferences (cocoa vs. cinnamon) in pilot subjects.

Additional analyses were carried out to evaluate possible changes induced by the scopolamine in other variables measured during the STFP task. We analyzed the first 10 min of the three social interactions using the ANOVA for repeated measures considering Group as the independent variable and the dependent variables were "Sniffs of Demonstrator's Muzzle", "Sniffs of Demonstrator's Body", "Sniffs of Demonstrator's Anogenital Region", "Self-Grooming Bouts", and "Fighting Bouts". Pearson correlations were performed between these variables and "Percentage of Trained Food". Regarding the test, a similar analysis was carried out to analyze neophobia, with the dependent variables "Regular Food" (mean amount of food eaten during two rehabilitation sessions prior to training, in grams) and "New Food" (mean amount of total food eaten, trained + untrained, during immediate and 24 h tests, in grams). "Total Food Eaten" and "Jar Climbs" were analyzed in the same way to evaluate motivation to eat and explore, respectively. Thus, mixed analyses of variance were performed with the corresponding contrast analyses for within-group effects when needed. Regarding the olfactory test, an ANOVA analysis was applied in which the independent variable was "Group" and the dependent variable was "Latency" in finding the buried cookie.

### 3. Results

#### 3.1. Histology

At the end of the experiment, all observers were subjected to histological verification of cannula placements. The dye injections indicated that the fluid spread ventral and lateral to the injection site and were concentrated in the intended area. For the final sample we only considered rats with their cannula tips in the PLC within the area delimited by the anterior cingulate and infralimbic cortices and in which no tissue damage due to the rate or volume of the infusions was detected (Fig. 1A). Specifically the cannulae were located along different brain coordinates from 3.70 to 2.70 mm anterior to bregma (Fig. 1B) according to the stereotaxic atlas (Paxinos & Watson, 1997). Such a location fits with the illustrative diagrams of the rat prelimbic cortex shown in several studies on the rat prefrontal cortex (e.g., reviewed in Dalley et al., 2004a). Thirteen rats were excluded from behavioral data analyses since their cannulae were unintentionally implanted outside PLC (infralimbic, forceps minor corpus callosum, and III ventricle) or due to technical problems during the infusion. Thus, the final sample was made up of 22 subjects distributed into the following groups: SCOP = 10 and VEH = 12.

#### 3.2. Behavioral testing

##### 3.2.1. Social transmission of food preference

Pilot subjects showed no innate flavor preference when given a choice between 2.2% cocoa- and 1% cinnamon-flavored food ( $t_{(9)} = 0.870$ ,  $p = .407$ ).

After scopolamine or PBS infusion, subjects were exposed to demonstrators and promptly tested for food

preferences immediately and 24 h later. Fig. 2A shows that SCOP group did not exhibit any preference for the trained food since the Percentage of trained food eaten was similar to the chance level (50%) in the two delays ( $t_{(9)} = .663$ ,  $p = .524$ ;  $t_{(9)} = .293$ ,  $p = .776$ ), suggesting that scopolamine impaired the STFP. In contrast, VEH rats performed above chance in the two tests (immediate test:  $t_{(11)} = 6.781$ ,  $p < .001$ ; 24 h test:  $t_{(11)} = 2.997$ ,  $p = .012$ ). Indeed, the ANOVA analysis revealed a main effect of Group factor ( $F_{(1,20)} = 6.787$ ,  $p = .017$ ) but no Delay ( $F_{(1,20)} = 1.224$ ,  $p = .282$ ) or interaction effects ( $F_{(1,20)} = .511$ ,  $p = .483$ ) (Fig. 2A). Accordingly, SCOP rats ate no more of the trained food than the untrained food in both delays (immediate test:  $t_{(9)} = 1.073$ ,  $p = .311$ ; 24 h test:  $t_{(9)} = .738$ ,  $p = .479$ ). In contrast, controls ate more of the trained food than the untrained food (immediate test:  $t_{(11)} = 5.422$ ,  $p < .0001$ ; 24 h test:  $t_{(11)} = 2.542$ ,  $p = .027$ ) (see Fig. 2B). Such results indicate that rats injected with scopolamine in the PLC cortex did not prefer the trained food, regardless of delay.

The present experiment evaluated other critical variables for STFP including olfactory sensitivity, motivation to eat, social interaction, and motor behavior. No statistically significant differences between groups were observed in the olfactory test (Fig. 3), in which Latency in finding a buried piece of cookie was measured ( $F_{(1,18)} = .217$ ,  $p = .647$ ). The total amount of food consumed during testing was measured and statistical analyses did not demonstrate significant differences between groups in the total grams of food eaten ( $F_{(1,20)} = .991$ ,  $p = .331$ ), but did reveal a significant Delay effect ( $F_{(1,20)} = 4.379$ ,  $p = .049$ ), independently of the Group ( $F_{(1,20)} = 1.583$ ,  $p = .223$ ). This suggests that scopolamine in PLC does not affect motivation to consume food. To determine whether or not scopolamine infusion produced changes in neophobia, we compared the amount of Regular Food eaten during the last two days of postsurgery habituation (unodorized ground food) and the amount of New Food eaten during both immediate and 24 h tests (total odorized food, trained + untrained). Mixed ANOVA analysis showed no significant effects of Group ( $F_{(1,20)} = .291$ ,  $p = .595$ ), Food ( $F_{(1,20)} = 1.151$ ,  $p = .296$ ) or Group  $\times$  Food interaction ( $F_{(1,20)} = 2.764$ ,  $p = .112$ ), demonstrating that the pattern of consumption of both foods (Regular and New) was similar in SCOP and VEH rats, suggesting that scopolamine did not produce neophobic or antineophobic reactions.

In order to rule out the effects of scopolamine on other factors that might have affected performance in STFP, measures of several variables during social interaction were included (Table 1). Two rats from the SCOP group and one from the VEH group were not included in the additional analyses of social interaction and explorative behavior due to technical problems with the video camera. No significant correlations were found between measures of social interaction and Percentage of trained food eaten in the two tests. Therefore, the amount of social interaction does not seem to be associated with STFP performance. As for differences

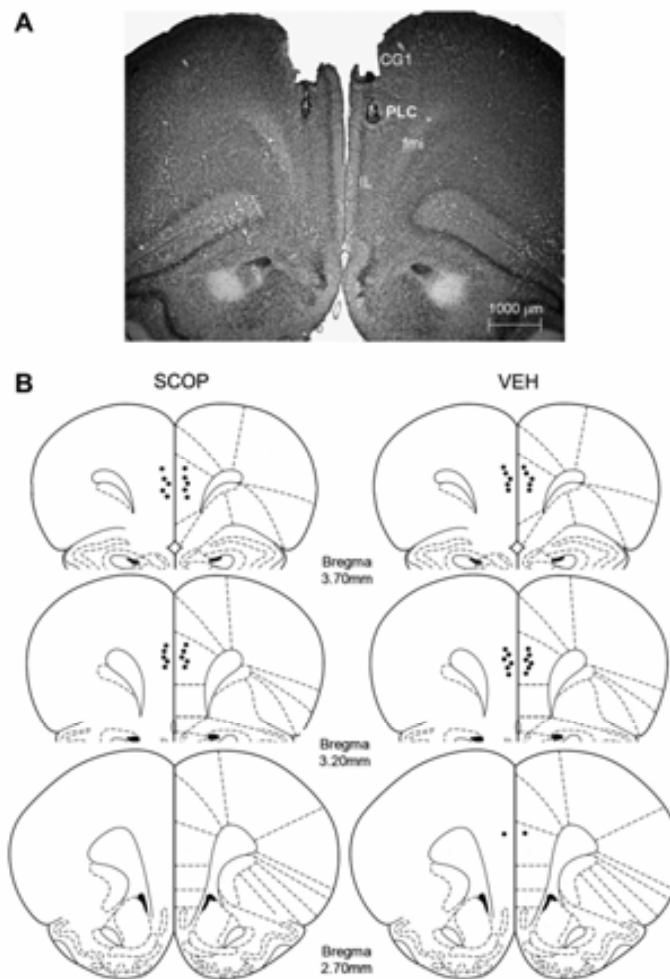


Fig. 1. (A) Photomicrograph of violet staining at the level of the prelimbic cortex area (AP, 3.20 mm anterior to bregma) showing the cannula tracks of a representative subject. (B) Cannula tip placements (black dots) for SCOP and VEH-infused rats throughout the rostral-caudal extent of the prelimbic cortex (from 3.70 to 2.70 mm anterior to bregma). Reprinted from Paxinos and Watson, 1997 with permission from Elsevier. CG1, cingulate cortex; fmi, forceps minor of the corpus callosum; IL, infralimbic cortex; PLC, prelimbic cortex.

between SCOP and VEH rats (Fig. 4), mixed ANOVA showed no significant Group effect in any of the social interaction measures (muzzle:  $F_{(1,17)} = .097$ ,  $p = .760$ ; body:  $F_{(1,17)} = .096$ ,  $p = .761$ ; anogenital:  $F_{(1,17)} = 2.503$ ,  $p = .132$ ). The analysis of social interaction evolution throughout the three sessions demonstrated a reduction of interaction over time, as demonstrated by a downward lineal trend in the number of Sniffs of demonstrator's muzzle ( $F_{(1,17)} = 12.267$ ,  $p = .003$ ); body ( $F_{(1,17)} = 15.110$ ,  $p = .001$ ) and anogenital region by the observers ( $F_{(1,17)} = 8.730$ ,  $p = .009$ ), as well as a quadratic trend in the case of the anogenital region ( $F_{(1,17)} = 10.020$ ,  $p = .006$ ). Interactions between Group  $\times$  social interaction values were not significant in any of the measures (all  $F$ -values  $< .966$ , all  $p$ -values  $> .340$ )

demonstrating that such descending patterns were similar between groups in all cases.

Other variables analyzed during the social interactions were Self-Grooming and Fighting bouts. The effect of Group was not statistically significant in Self-Grooming ( $F_{(1,17)} = .782$ ,  $p = .389$ ) and the interaction Group  $\times$  Self-Grooming ( $F_{(1,17)} = 1.204$ ,  $p = .288$ ), although this variable showed a downward lineal trend ( $F_{(1,17)} = 9.566$ ,  $p = .007$ ). The Group factor was significant in Fighting bouts ( $F_{(1,17)} = 4.474$ ,  $p = .049$ ), although the number of Fighting episodes was very low in both groups (VEH: mean .18 and SCOP: mean .0; see Table 1). The interaction Group  $\times$  Fighting was not statistically significant ( $F_{(1,17)} = 2.556$ ,  $p = .128$ ), and the analysis of Fighting evolu-

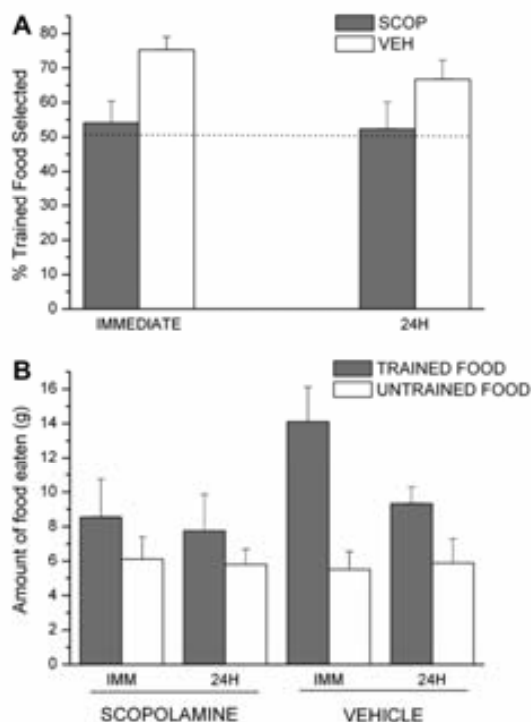


Fig. 2. (A) Percentage of trained food selected, expressed as the mean percentage ( $\pm$  SEM) of the total amount of food consumed, at the two retention intervals. Rats in the SCOP group showed no preference for the trained food regardless of delay, in contrast to control VEH rats. (B) Mean ( $\pm$  SEM) amount of food eaten in immediate and 24h tests expressed in grams. SCOP rats did not eat significantly more of the trained food than untrained food. The SCOP rats ate similar total amount of food (trained + untrained) than VEH in both the immediate and 24h tests.

tion during the three sessions did not demonstrate a linear trend ( $F_{(1,17)} = 2.556$ ,  $p = .128$ ). Finally, the analysis of Jar climbs made in the tests showed that SCOP and VEH rats investigated both food jars to a similar degree in both the immediate test ( $F_{(1,18)} = .193$ ,  $p = .665$ ) and the 24h test ( $F_{(1,20)} = .722$ ,  $p = .405$ ), indicating that scopolamine infusion did not affect exploration or motor activity.

#### 4. Discussion

This study demonstrates that muscarinic blockade in a specific prefrontal area, the PLC, impaired the socially transmitted preference for a scented food. The cholinergic muscarinic receptor antagonist scopolamine was infused in the PLC immediately prior to learning and prevented the expression of memory assessed both immediately and 24h after social training (Fig. 2).

It is important to determine whether the impairments reported in the STFP task reflect decreases in olfactory sensitivity, motivation to eat or limitation of motor behavior.

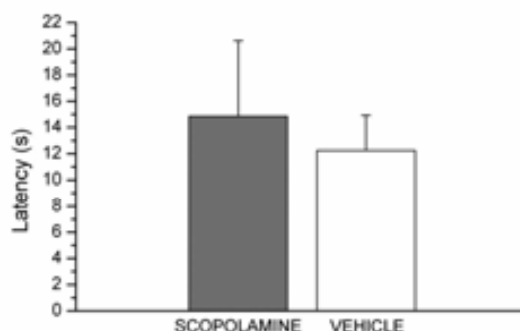


Fig. 3. Olfactory perception task. Rats in the VEH and SCOP groups showed comparable latencies when locating a buried piece of cookie.

Odor detection performance was not affected by infusions of scopolamine as shown in the olfactory test performed after STFP testing. Such data agree with a recent study reporting that systemic administration of different doses of scopolamine, which is known to influence odor memory and learning, did not cause alterations in the odor detection performance of rats (Doty, Bagla, Misra, Mueller, & Kerr, 2003). The deficits in STFP observed here do not seem to be related either to reduction in motivation to consume food as there were no significant differences between SCOP and VEH groups in the total amount of food (trained + untrained) eaten in any test, either immediate or 24h later. As for inappropriate motor behavior or exploration, both groups made the same number of climbs onto the food jars and showed a similar degree of grooming during the tests. Fighting was the only variable measured on testing that showed between-group differences, although it was a slight effect that could hardly account for the STFP deficits.

Scopolamine-induced disturbances of social interaction were also considered as a potential confound in STFP. However, non-significant correlations were detected between measures of social interaction and percentage of trained food eaten. Furthermore, SCOP rats did not differ from controls in the number of sniffs to any part of the demonstrators' body in either interaction session. An alternative interpretation of the observed deficits in STFP is that scopolamine may have produced an antineophobic reaction. In this case, SCOP rats would have increased their consumption of the unfamiliar untrained food (not smelled during the social training). The SCOP group, however, did not exhibit preference for the untrained food given that it was at the chance level (50%) in both delays. In addition, in all rats, the amount of unodorized ground food consumed during habituation (Regular Food) was not different from the amount of scent-odorized food consumed during testing (New Food: trained + untrained), as was revealed by the neophobia data analysis. Moreover, it has been shown that increases in cerebral ACh produced an antineophobic action (Sienkiewicz-Jarosz et al., 2000), suggesting that cholinergic blockade would, if anything, have increased neophobia. All in all, this would indicate that



Table 1  
Correlation analyses of social interaction measures and trained food consumption

Behavior	Social interaction session			Global mean	Correlation between behavior and trained food consumption			
	1st	2nd	3rd		Immediate test		24 h Test	
					<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Sniffs of demonstrator's muzzle	<i>SCOP</i>			47.16 ± 9.48	.184	.450	−.066	.788
	20.20 ± 8.57	14.00 ± 2.91	12.30 ± 4.32					
	<i>VEH</i>							
	21.00 ± 5.35	14.07 ± 5.34	13.67 ± 6.60					
Sniffs of demonstrator's body	<i>SCOP</i>			84.16 ± 21.12	.230	.344	−.251	.300
	33.70 ± 12.71	26.50 ± 11.17	22.50 ± 12.06					
	<i>VEH</i>							
	42.00 ± 12.45	23.40 ± 10.56	26.33 ± 11.41					
Sniffs of demonstrator's anogenital region	<i>SCOP</i>			40.89 ± 19.03	.117	.633	−.172	.482
	16.40 ± 11.37	9.50 ± 3.89	8.70 ± 4.69					
	<i>VEH</i>							
	25.82 ± 14.09	13.10 ± 7.44	11.83 ± 5.44					
Self-Grooming bouts	<i>SCOP</i>			6.68 ± 3.18	−.005	.984	−.098	.690
	3.90 ± 1.66	1.60 ± 1.43	1.80 ± 1.62					
	<i>VEH</i>							
	2.36 ± 2.29	2.10 ± 1.45	1.67 ± 1.97					
Fighting bouts	<i>SCOP</i>			0.16 ± 0.37	.328	.171	.137	.577
	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00					
	<i>VEH</i>							
	0.18 ± 0.40	0.10 ± 0.32	0.00 ± 0.00					
	<i>Mean</i>							
	20.62 ± 6.72	14.35 ± 4.44	13.05 ± 5.60					
	<i>Mean</i>							
	31.00 ± 13.44	11.30 ± 6.07	10.41 ± 5.24					

Means ± SD of behaviors scored during the first 10 min of the three interactions for each group. The column *global mean* depicts the sum of the three interactions of all rats (VEH and SCOP). Correlation analyses of the behaviors scored during the interactions and amount of trained food eaten during immediate and 24 h tests. None of the behaviors in the interaction sessions correlated significantly with the amount of trained food eaten.

scopolamine in the PLC did not produce alterations in neophobic responses.

Therefore, present data would not appear to be associated to non-cognitive effects and may be compatible with the proposition that the normal functioning of the cholinergic cortical system is necessary for the social transmission of preferences. Specifically, blockade of muscarinic receptors during training impaired STFP acquisition, as expressed by deficits already found in the immediate test. It is therefore likely that the odor association was poorly registered early in learning and that subsequent recalling of the information was defective. In our procedure, we assume that the whole training process (three social interaction sessions) was affected by scopolamine, which is suggested by drug's approximately 3-h half-life (Gilman, Hardman, & Limbird, 1996). To this effect, observations from our laboratory in rats injected with 20 µg scopolamine in the PLC area indicate that the effect may possibly extend up to 180 min (Carballo-Marquez et al., in preparation). Such a blockade in the PLC has produced deficits similar to more

global interruptions in cortical cholinergic function reported after saporin lesions of the NBM (Vale-Martinez et al., 2002). This would suggest that selective cholinergic depletion in the NBM may be sufficient to affect muscarinic transmission in cortical prefrontal areas such as the PLC.

In addition to cholinergic cortical modulation, there is evidence that other cholinergic pathways may be important for STFP learning and memory. The cholinergic medial septum-hippocampal system seems more necessary in consolidating or retrieving newly acquired STFP information than in acquiring it; whereas the cholinergic NBM cortical system appears essential for task acquisition (Ross et al., 2005; Vale-Martinez et al., 2002). Such data are in accordance with numerous reports showing that lesions to the hippocampus affect 24-h retention, but not STFP task acquisition, as damaged rats show good immediate retention. All such findings, together with the current results, support the view that different brain regions may contribute differently to STFP in terms of learning and memory formation. The present study was not designed to address

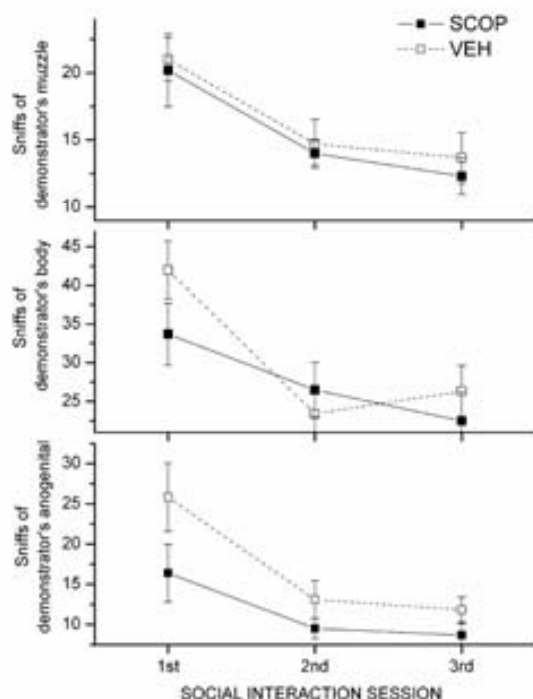


Fig. 4. Number of sniffs of the demonstrator's muzzle, body and anogenital region by SCOP and VEH observer rats during the first 10 min of each interaction session. The scopolamine infusions had no effects on the number of sniffs incurred by any region of the demonstrators.

the differential role of muscarinic receptors in different brain systems, but research on this issue would be interesting in order to understand the role of specific regions in STFP learning and recall.

Among the possible mechanisms underlying the STFP acquisition deficits found after scopolamine infusions, muscarinic blockade may prevent PLC functions that favor relational learning, such as behavioral flexibility, attention, and/or strategic planning. It has been reported that muscarinic activation influences behavioral flexibility (Ragozzino et al., 1999) and that M2 muscarinic receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and synaptic plasticity (Seeger et al., 2004). Furthermore, it has been argued that tasks placing sufficient demand on cognitive flexibility will be sensitive to selective cholinergic lesions of the NBM (Cabrera, Chavez, Corley, Kitt, & Butt, 2006). All the above would suggest that the impairment in STFP performance reported after NBM cholinergic lesions (Vale-Martinez et al., 2002) may reflect an underlying deficit in abilities related to cognitive flexibility. It would therefore seem probable that the cholinergic NBM is involved in the behavioral flexibility required for the task, possibly acting through its influence on the PLC.

This view does not exclude the possibility that scopolamine in the PLC blocked STFP learning by disturbing attentional processes, thus preventing a correct odor-odor

association, since this prefrontal region seems also to be involved in attention (Dalley et al., 2004a; Delatour & Gisquet-Verrier, 2000). Interestingly, the muscarinic receptors in the PLC participate in attentional performance (Chudasama et al., 2004; Dalley et al., 2004b). In this regard, it has been proposed that increases in the cholinergic activity, probably mediated by muscarinic receptors, seem to contribute to the activation of the medial prefrontal attentional system, which is associated with executive functions such as the top-down optimization of input processing (Sarter, Gehring, & Kozak, 2006). In general, this would support the Hasselmo and McGaughy (2004) cholinergic hypothesis, suggesting that high ACh supports encoding and attention as it enhances the cellular response to incoming sensory inputs in the cortex and decreases interferences from previously formed cortical representations.

Thus, the PLC-related functions of attention and flexible control of action may be required for other prefrontal operations, such as the prospective planning and organization of actions (Gisquet-Verrier & Delatour, 2006). According to Winocur and Moscovitch (1999), the STFP task has some characteristics that involve strategic planning. It requires rats to select a specific diet from among several alternatives, on the basis of past experience, possibly requiring the involvement of frontal regions to integrate previous information with current task requirements for response selection. In this context, our observations agree to some extent with investigations into the effects of frontal cortex lesions on STFP learning and memory (Winocur & Moscovitch, 1999), demonstrating severe anterograde amnesia albeit under high-interference conditions. The absence of effects reported by these authors in a standard two-choice STFP test may be due to differences in the targeted cortical regions, as their study used aspiration lesions in premotor regions, whereas the current research evaluated the effects of muscarinic antagonist infusions restricted to the PLC, which is located more ventromedially in the prefrontal cortex. Also, procedural differences such as the number and length of social interaction sessions may explain divergence in findings.

Current findings offer further insight into the modulatory effect of the cortical cholinergic system in the STFP (Vale-Martinez et al., 2002) supporting the hypothesis that prefrontal ACh is critical for learning this naturalistic form of relational memory (Ross et al., 2005), a task requiring the use of associative olfactory information. In conclusion, our study suggests that the PLC utilizes muscarinic modulation in the service of cognitive operations such as behavioral flexibility, attention or strategic planning that may be important in processing information for the correct expression of socially transmitted food preferences.

#### Acknowledgments

This research was supported by funds provided by the Universitat Autònoma de Barcelona (UNI/2078/202), Generalitat de Catalunya (SGR2005-00551) and by the

Ministerio de Ciencia y Tecnología (SEJ2005-02518). The authors thank Dr. Margalida Coll-Andreu and Dr. Carles Soriano-Mas for useful comments on an earlier version of the manuscript, and Gerald-Patrick Fannon for revising the manuscript.

## References

- Alvarez, P., Lipton, P. A., Melrose, R., & Eichenbaum, H. (2001). Differential effects of damage within the hippocampal region on memory for a natural, nonspatial odor-odor association. *Learning and Memory*, 8(2), 79–86.
- Alvarez, P., Wendelken, L., & Eichenbaum, H. (2002). Hippocampal formation lesions impair performance in an odor-odor association task independently of spatial context. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(2), 470–476.
- Boix-Trelis, N., Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., Costa-Miserachs, D., & Martí-Nicolóvius, M. (2006). Effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on a socially transmitted food preference and c-fos expression. *Learning and Memory*, 13(6), 783–793.
- Bunsey, M., & Eichenbaum, H. (1995). Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association. *Hippocampus*, 5(6), 546–556.
- Cabrera, S. M., Chavez, C. M., Corley, S. R., Kitto, M. R., & Butt, A. E. (2006). Selective lesions of the nucleus basalis magnocellularis impair cognitive flexibility. *Behavioral Neuroscience*, 120(2), 298–306.
- Carballo-Marquez, A., Vale-Martinez, A., Boix-Trelis, N., Torras-García, M., Guillazo-Blanch, G., & Martí-Nicolóvius, M. (2006). Effects of scopolamine in the rat prelimbic cortex on odor-reward associative learning. Eight Conference on the *Neurobiology of Learning and Memory*. Abstract 12.
- Carballo-Marquez, A., Vale-Martinez, A., Boix-Trelis, N., Torras-García, M., Guillazo-Blanch, G., & Martí-Nicolóvius, M. Scopolamine in the rat prelimbic cortex impairs consolidation of an odor-reward associative learning, in preparation.
- Clark, R. E., Broadbent, N. J., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2002). Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4663–4669.
- Coll-Andreu, M., Martí-Nicolóvius, M., & Morgado-Bernal, I. (1991). Facilitation of shuttle-box avoidance by the platform method: temporal effects. *Physiology & Behavior*, 49(6), 1211–1215.
- Countryman, R. A., Kaban, N. L., & Colombo, P. J. (2005). Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 175–183.
- Chudasama, Y., Dalley, J. W., Nathwani, F., Bouger, P., & Robbins, T. W. (2004). Cholinergic modulation of visual attention and working memory: dissociable effects of basal forebrain 192-IgG-saporin lesions and intraprefrontal infusions of scopolamine. *Learning and Memory*, 11(1), 78–86.
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004a). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771–784.
- Dalley, J. W., Theobald, D. E., Bouger, P., Chudasama, Y., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004b). Cortical cholinergic function and deficits in visual attentional performance in rats following 192 IgG-saporin-induced lesions of the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 14(8), 922–932.
- Delatour, B., & Gisquet-Verrier, P. (2000). Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behavioural Brain Research*, 109(1), 113–128.
- De Rosa, E., & Hasselmo, M. E. (2000). Muscarinic cholinergic neuromodulation reduces proactive interference between stored odor memories during associative learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(1), 32–41.
- Dias, R., & Aggleton, J. P. (2000). Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility. *European Journal of Neuroscience*, 12(12), 4457–4466.
- Doty, R. L., Bagla, R., Misra, R., Mueller, E., & Kerr, K. L. (2003). No influence of scopolamine hydrobromide on odor detection performance of rats. *Chemical Senses*, 28(9), 761–765.
- Galef, B. G., Jr., Kennett, D. J., & Stein, M. (1985). Demonstrator influence on observer diet preference: effects of simple exposure and the presence of a demonstrator. *Animal Learning and Behavior*, 13, 25–30.
- Galef, B. G., Jr., Mason, J. R., Preti, G., & Bean, N. J. (1988). Carbon disulfide: a semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats. *Physiology and Behavior*, 42(2), 119–124.
- Gilman, A. G., Hardman, J. G., & Limbird, L. E. (1996). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (9th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Gisquet-Verrier, P., & Delatour, B. (2006). The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: not involved in the short-term maintenance but monitoring and processing functions. *Neuroscience*, 141(2), 585–596.
- Hasselmo, M. E., & McGaughy, J. (2004). High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Progress in Brain Research*, 145, 207–231.
- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579.
- Hunter, A. J., & Murray, T. K. (1989). Cholinergic mechanisms in a simple test of olfactory learning in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 99(2), 270–275.
- Luiten, P. G., Gaykema, R. P., Traber, J., & Spencer, D. G., Jr. (1987). Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Research*, 413(2), 229–250.
- Neafsey, E. J., Hurley-Gius, K. M., & Arvanitis, D. (1986). The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. *Brain Research*, 377(2), 561–570.
- Nieto-Escamez, F. A., Sanchez-Santed, F., & de Bruin, J. P. (2002). Cholinergic receptor blockade in prefrontal cortex and lesions of the nucleus basalis: implications for allocentric and egocentric spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 134(1–2), 93–112.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (3rd ed.). San Diego: Academic Press.
- Quiroz-Padilla, M. F., Guillazo-Blanch, G., Vale-Martinez, A., & Martí-Nicolóvius, M. (2006). Excitotoxic lesions of the parafascicular nucleus produce deficits in a socially transmitted food preference. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(3), 256–263.
- Ragozzino, M. E., Detrick, S., & Kesner, R. P. (1999). Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4585–4594.
- Ragozzino, M. E., Kim, J., Hassert, D., Miniti, N., & Kiang, C. (2003). The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behavioral Neuroscience*, 117(5), 1054–1065.
- Ravel, N., Elaagouby, A., & Gervais, R. (1994). Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behavioral Neuroscience*, 108(2), 317–324.
- Ravel, N., Vigouroux, M., Elaagouby, A., & Gervais, R. (1992). Scopolamine impairs delayed matching in an olfactory task in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 109(4), 439–443.
- Roberts, M., & Shapiro, M. (2002). NMDA receptor antagonists impair memory for nonspatial, socially transmitted food preference. *Behavioral Neuroscience*, 116(6), 1059–1069.
- Ross, R. S., & Eichenbaum, H. (2006). Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4852–4859.

- Ross, R. S., McGaughy, J., & Eichenbaum, H. (2005). Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference. *Learning and Memory*, 12(3), 302–306.
- Saper, C. B. (1984). Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 222(3), 313–342.
- Sarter, M., Gehring, W. J., & Kozak, R. (2006). More attention must be paid: the neurobiology of attentional effort. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 51(2), 145–160.
- Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomez, J., et al. (2004). M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *Journal of Neuroscience*, 24(45), 10117–10127.
- Sienkiewicz-Jarosz, H., Członkowska, A. I., Siemiatkowski, M., Maciejak, P., Szyndler, J., & Plaznik, A. (2000). The effects of physostigmine and cholinergic receptor ligands on novelty-induced neophobia. *Journal of Neural Transmission*, 107(12), 1403–1412.
- Vale-Martinez, A., Baxter, M. G., & Eichenbaum, H. (2002). Selective lesions of basal forebrain cholinergic neurons produce anterograde and retrograde deficits in a social transmission of food preference task in rats. *European Journal of Neuroscience*, 16(6), 983–998.
- Wilson, D. A. (2001). Scopolamine enhances generalization between odor representations in rat olfactory cortex. *Learning and Memory*, 8(5), 279–285.
- Winocur, G. (1990). Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behavioural Brain Research*, 38(2), 145–154.
- Winocur, G., & Hasher, L. (1999). Aging and time-of-day effects on cognition in rats. *Behavioral Neuroscience*, 113(5), 991–997.
- Winocur, G., & Hasher, L. (2004). Age and time-of-day effects on learning and memory in a non-matching-to-sample test. *Neurobiology of Aging*, 25(8), 1107–1115.
- Winocur, G., McDonald, R. M., & Moscovitch, M. (2001). Anterograde and retrograde amnesia in rats with large hippocampal lesions. *Hippocampus*, 11(1), 18–26.
- Winocur, G., & Moscovitch, M. (1999). Anterograde and retrograde amnesia after lesions to frontal cortex in rats. *Journal of Neuroscience*, 19(1), 9611–9617.
- Wrenn, C. C., Harris, A. P., Saavedra, M. C., & Crawley, J. N. (2003). Social transmission of food preference in mice: methodology and application to galanin-overexpressing transgenic mice. *Behavioral Neuroscience*, 117(1), 21–31.

**Discussió**



## V. DISCUSSIÓ

Un dels principals objectius de la present tesi doctoral ha estat investigar el substrat neural relacionat amb la facilitació de l'aprenentatge i la memòria d'una tasca d'associació olfactiva de tipus relacional, la TSPA. Estudis previs amb lesions selectives indicaven que les cèl·lules colinèrgiques de l'NBM participen en l'adquisició de la TSPA (Berger-Sweeney *i col.*, 1994; Vale-Martinez *i col.*, 2002a) i que l'EIC d'aquesta estructura facilita una tasca implícita d'EV2 (Montero-Pastor *i col.*, 2004). Per aquest motiu, ens vam plantejar si l'EIC de l'NBM podria tenir un efecte facilitador general en l'aprenentatge i, per tant, afectar també la TSPA. També volíem conèixer a través de quines àrees cerebrals i mecanismes neuroquímics es produiria aquesta facilitació.

- **Modulació de la TSPA mitjançant l'EIC de l'NBM.**

Els resultats obtinguts en el primer treball (Experiment 1) van posar de manifest que l'EIC preentrenament de l'NBM facilita l'aprenentatge de la TSPA. El tractament va millorar la retenció de la tasca independentment del moment en què es realitzava el test, ja fos immediatament o 24 hores després de l'entrenament. Així doncs, la millora de la TSPA es pot atribuir a una facilitació en l'adquisició de la tasca probablement deguda a una millora en la codificació inicial dels estímuls o en la formació inicial de l'associació entre els dos principals estímuls de la tasca, l'olor del menjar i el component de l'alè de la rata demostradora (CS<sub>2</sub>).

L'aprenentatge de la TSPA s'expressa com un augment en la preferència per l'aliment que prèviament han consumit els demostradors (menjar entrenat) (Galef *i col.*, 1985), no obstant, aquest augment de la preferència pel menjar entrenat podria estar influenciat per factors secundaris que no fossin essencialment una facilitació de processos cognitius. Per exemple, la facilitació de la TSPA podria estar relacionada amb un increment de la interacció social dels observadors amb els demostradors, especialment del número de contactes amb el musell dels demostradors (Wrenn *i col.*, 2003). Les dades del nostre experiment, però, no recolzen aquesta possibilitat ja que els animals estimulats i els controls van mantenir una interacció social similar amb els respectius demostradors, doncs no es van detectar diferències significatives entre grups en diverses mesures d'interacció social, com són les ensumades del musell, cos o regió anogenital. Els grups tampoc van diferir en altres variables mesurades durant la interacció com la neteja (*groomings*) i els episodis de lluita entre els observadors i els demostradors. A més, no es van observar correlacions significatives entre la preferència pel menjar entrenat i cap de les mesures registrades durant la fase d'interacció social.

D'altra banda, la facilitació produïda per l'EIC de l'NBM podria estar associada a un augment en la motivació per ingerir menjar. No obstant, el consum total de menjar (entrenat més no entrenat) durant la fase de test va ser similar entre els grups estimulat i control fet que demostra que l'EIC no va afectar a la motivació per menjar dels animals. La facilitació de la TSPA tampoc sembla relacionada a canvis en la conducta motora, ja que ambdós grups van pujar el mateix nombre de vegades als pots de menjar durant el test (*jar climbs*). Finalment, un altre factor que podria haver explicat la millora observada en les rates estimulades és un canvi en la neofòbia. L'EIC de l'NBM podria haver augmentat la neofòbia, produint una major preferència pel menjar amb una olor ja experimentada (menjar entrenat) que amb una olor desconeguda (menjar no entrenat o distractor) pel fet de ser una aroma familiar, però no provocada per una millor associació d'estímul. En el nostre estudi, però, el consum de menjar familiar durant el període de preentrenament al menjar en pols no va ser diferent del consum de menjar nou aromatitzat durant el test, en cap dels grups. Tampoc es van detectar diferències significatives entre els animals estimulats i els controls quant al patró de consum d'aquests dos tipus de menjar. A més, s'ha observat una relació contrària entre l'alliberació d'ACh i les respostes neofòbiques, ja que la fisostigmina, un inhibidor de l'acetilcolinesterasa, incrementa l'ACh cerebral i produeix una acció antineofòbica (Sienkiewicz-Jarosz *i col.*, 2000). Aquestes dades ens suggereixen que l'estimulació de l'NBM, que causa un augment en l'ACh cortical, en tot cas, hauria disminuït la neofòbia, fent que els animals estimulats ingerissin més menjar amb una olor desconeguda, disminuint així el percentatge de preferència pel menjar entrenat. En conseqüència, l'augment de la preferència pel menjar entrenat no sembla degut a canvis en la neofòbia. Per tant, els resultats del present treball confirmen la participació de l'NBM en la TSPA, i la manca de diferències entre grups en mesures com la interacció social, la motivació o l'activitat motora/exploradora suggereix que la facilitació observada en els animals estimulats a l'NBM reflecteix una millora cognitiva.

La facilitació de la TSPA mitjançant l'EIC de l'NBM concorda i amplia els resultats obtinguts prèviament en el nostre laboratori en els quals es mostrava que l'EIC de l'NBM millorava l'adquisició d'una tasca de memòria implícita com l'EV2 (Montero-Pastor *i col.*, 2004). Aquests experiments van demostrar que l'estimulació de l'NBM facilitava la tasca d'evitació activa quan s'administrava preentrenament però no preretenció. En canvi, l'EIC aplicada postentrenament facilitava o deteriorava la tasca en funció dels paràmetres de corrent utilitzats. Per aquest motiu, els presents resultats suposen una generalització dels efectes facilitadors de l'EIC de l'NBM sobre les fases inicials dels processos d'aprenentatge i memòria.

De la mateixa manera, els nostres resultats coincideixen amb estudis anteriors que demostraven la participació de l'NBM en la TSPA (Berger-Sweeney *i col.*, 2000; Vale-Martinez *i col.*, 2002a), així com amb altres treballs que han evidenciat la implicació de l'NBM en els processos d'aprenentatge i memòria. En aquest sentit, diferents estudis han mostrat dèficits després de lesions colinèrgiques de l'NBM en tasques com l'aprenentatge visual discriminatiu (Fine *i col.*, 1997; Ridley *i col.*, 2005; Ridley *i col.*, 1999), la formació del *learning set* ("aprendre a aprendre") (Bailey *i col.*, 2003) o l'aprenentatge de transferència apetitiu-aversiu (Butt *i col.*, 2003).

Malgrat tot, l'augment de la preferència observat en la TSPA després de l'EIC de l'NBM, podria veure's afavorit, no només per un benefici sobre l'aprenentatge o la memòria *per se*, sinó també per una millora de l'atenció dels animals. Tal com s'ha exposat en els antecedents experimentals, existeix unanimitat sobre el paper de l'NBM, especialment de les seves projeccions colinèrgiques, en la regulació de la funció atencional (Wenk, 1997). Les tasques amb demandes específiques d'atenció s'han mostrat sensibles a les lesions colinèrgiques de l'NBM, principalment aquelles que mesuren atenció sostinguda (com la 5-CSRT) (Lehmann *i col.*, 2003; McDonald *i col.*, 1996; McGaugh, 2002; Risbrough *i col.*, 2002; Roberts i Shapiro, 2002) o atenció dividida (Turchi i Sarter, 1997). Per aquest motiu, no podem descartar que el tractament d'estimulació pugui haver facilitat les capacitats atencionals dels animals, tot i que una interpretació dels resultats derivada únicament d'una facilitació dels processos atencionals no sembla ser l'explicació més factible, ja que la TSPA no té una elevada demanda atencional.

La millora cognitiva observada, independentment que hagi estat a través de processos atencionals o mnemònics, podria ser resultat d'una augment dels nivells d'ACh corticals provocats pel tractament d'EIC de l'NBM. Els paràmetres d'EIC que hem utilitzat són similars als usats en estudis previs en els quals s'ha demostrat que l'estimulació de l'NBM provoca un augment de l'alliberament d'ACh cortical (Rasmusson, 2000), activació de l'EEG cortical (Golmayo *i col.*, 2003; McLin *i col.*, 2002a; McLin *i col.*, 2003) i plasticitat cortical (Miasnikov *i col.*, 2006; Weinberger, 2003; Weinberger, 2004). Per tant, l'augment de l'ACh cortical mitjançant l'estimulació de l'NBM sembla ser un factor crític per entendre dels resultats d'aquest treball.

No obstant, les dades obtingudes podrien no reflectir únicament un efecte sobre el flux d'ACh en l'escorça, ja que l'activació d'altres poblacions neuronals, per exemple la GABAèrgica, també podrien contribuir als efectes sobre la TSPA (Gritti *i col.*, 2003; Manns *i col.*, 2003). En aquest sentit, les funcions de les fibres GABAèrgiques, les quals podrien participar també en la inducció de plasticitat neuronal (Jimenez-Capdeville *i col.*, 1997;



McKinney i Jacksonville, 2005), sembla que també coincideixen amb aspectes executius de la cognició (Sarter i Bruno, 2002).

- **Anàlisi de les àrees activades per l'EIC de l'NBM a través de l'expressió de c-Fos.**

Els resultats de l'anterior treball confirmaven que l'EIC preentrenament de l'NBM facilita l'adquisició de la TSPA, generalitzant, així, els efectes facilitadors del tractament sobre les primeres fases de la formació de la memòria. Per investigar a través de quines estructures i vies l'NBM podria modular l'aprenentatge, vam realitzar el segon experiment, en el qual vam obtenir un mapatge de les àrees cerebrals activades després del tractament d'EIC mesurant l'expressió de la proteïna c-Fos (Experiment 2).

L'estimulació de l'NBM va provocar un augment bilateral de l'expressió de c-Fos en regions prefrontals com el còrtex OFC, PL i IL i en algunes regions hipocampals com CA dorsal i GD ventral. En canvi, no es van observar diferències entre grups en l'expressió de c-Fos a ABL, al GD dorsal, a CA ventral ni al subicle ventral. Cal destacar, que els subjectes que havien estat estimulats fora de l'NBM no van mostrar diferències en l'expressió de c-Fos respecte els subjectes control, que no havien rebut estimulació, en cap de les àrees on es va observar un augment de l'expressió de c-Fos deguda al tractament.

Una de les àrees que va mostrar un major augment de l'expressió de c-Fos va ser l'OFC, regió que rep importants projeccions olfactòries des de l'escorça piriforme i el tàlem medial (Price *i col.*, 1991) i que ha estat fortament implicada en l'aprenentatge olfatori (Lipton *i col.*, 1999; Otto i Eichenbaum, 1992; Petrulis i Eichenbaum, 2003; Roullet *i col.*, 2005; Wishaw *i col.*, 1992) i específicament en la TSPA (Ross *i col.*, 2005). En aquest últim treball, Ross *i col.* (2005) van mostrar que la lesió colinèrgica de l'OFC, prèvia a l'entrenament de la TSPA, impedia l'expressió de la tasca en un test realitzat dos dies després de l'entrenament, recolzant la idea que l'ACh en aquesta àrea és essencial per l'establiment de l'associació crítica entre l'olor del menjar i el CS<sub>2</sub> del demostrador. En aquest sentit, les lesions d'OFC també impedeixen la formació d'altres associacions com la d'olor i tacte (Wishaw *i col.*, 1992) i la d'olor i gust (Critchley i Rolls, 1996; Rolls, 1997) i, a més, les neurones d'OFC s'activen selectivament en resposta a associacions particulars olor-lloc (Lipton *i col.*, 1999). No obstant, també és possible que la depleció colinèrgica a l'OFC hagués provocat un dèficit en la recuperació i no en l'adquisició de la TSPA. Recolzant aquesta idea, un estudi recent que analitza l'expressió de c-Fos durant l'execució de la TSPA mostra com el còrtex OFC es va activant de manera progressiva en tests successius de TSPA, mostrant una tendència a l'activació significativa 2 dies després de l'entrenament i una major activació durant el record 21 dies després (Ross i

Eichenbaum, 2006). Aquest patró de resultats suggereix, doncs, que l'EIC de l'NBM podria haver facilitat la TSPA activant estructures com l'OFC que s'han mostrat crítiques per l'adquisició i/o el record de la TSPA.

Altres regions prefrontals que van mostrar un gran nombre de neurones immunoreactives per c-Fos després de l'EIC de l'NBM van ser el PL i IL. Així doncs, l'activació d'aquestes àrees induïda per l'EIC de l'NBM preentrenament podria haver contribuït a una millor adquisició de la TSPA. Malgrat tot, en l'estudi de Ross i Eichenbaum (2006), el còrtex IL no va mostrar diferències significatives en l'expressió de c-Fos entre animals que havien estat entrenats a la TSPA i animals controls en cap dels moments de record en què van ser avaluats (Ross i Eichenbaum, 2006). Quant el PL, no hi ha estudis previs que el relacionin directament amb la TSPA, però s'ha demostrat que la lesió del PF, que té importants projeccions a PL, impedeix l'aprenentatge de la TSPA (Quiroz-Padilla *i col.*, 2006). En aquest treball, els autors atribueixen el dèficit en la TSPA induït per la lesió talàmica a la deaferenciació de l'EPFm, ja que la influència del PF en l'aprenentatge s'exerceix mitjançant l'activació dels circuits prefrontals, necessaris per codificar la informació crítica i per mostrar flexibilitat conductual (Van der Werf *i col.*, 2003). A més, tal i com s'ha descrit en els antecedents experimentals, el PL també es relaciona amb el processament d'olors i l'aprenentatge olfatori (revisat a Heidbreder i Groenewegen, 2003) i sembla que contribueix a moltes funcions necessàries per l'aprenentatge relacional com la flexibilitat cognitiva, la memòria de treball i l'atenció (Dalley *i col.*, 2004a; Dalley *i col.*, 2004b; Dias i Aggleton, 2000; Gisquet-Verrier i Delatour, 2006; Ragozzino *i col.*, 1999a; Ragozzino *i col.*, 2003). Algunes d'aquestes funcions són compartides amb l'NBM (Chudasama i Robbins, 2004), el qual podria, a través del PL, millorar processos cognitius necessaris per la TSPA. Per aquest motiu, l'estimulació de l'NBM podria millorar algunes de les funcions de l'escorça prefrontal, com a mínim aquelles que impliquen la integració de les relacions entre estímuls basades en l'experiència prèvia, permetent l'expressió d'un comportament adaptatiu en una situació nova.

Les dades del present treball mostren també que l'EIC de l'NBM va provocar un augment de l'expressió de c-Fos a diferents regions hipocampals com CA dorsal i GD ventral, però, en canvi, no va afectar la seva expressió a CA ventral, GD dorsal ni al subicle ventral. Com ja s'ha mencionat anteriorment, la TSPA presenta característiques de memòria relacional i diferents estudis de lesió indiquen que per la correcta expressió de la tasca és necessària la integritat de l'hipocamp (Alvarez *i col.*, 2001; Alvarez *i col.*, 2002; Bunsey i Eichenbaum, 1995; Clark *i col.*, 2002; Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001). Això podria indicar que l'activació de l'NBM modularia aquest tipus d'aprenentatges degut a la seva acció sobre la formació hipocampal. No obstant, l'hipocamp no rep projeccions

directes des de l'NBM essent l'ASM, un altre component del PB, el que envia projeccions destacades a l'hipocamp. És possible, doncs, que l'activació de l'NBM hagués afectat indirectament la funció hipocampal a través d'altres estructures o per propagació del corrent a l'ASM. Malgrat tot, aquestes no són les primeres dades que mostren connexions entre l'NBM i l'hipocamp. Per exemple, hi ha dades que evidencien que les lesions de l'NBM provoquen canvis neurodegeneratius en les fibres molsoses hipocampals i al GD (Amenta *i col.*, 1991; Panocka *i col.*, 1995) i augmenten la NADPH-diaforasa a les regions CA1-CA3 de l'hipocamp dorsal (Sabbatini *i col.*, 1999). Les dades obtingudes en el present treball són, a més, coherents amb estudis previs que han mostrat un augment en l'expressió de c-Fos a CA3 dorsal i al GD ventral després d'un test de TSPA realitzat 1.5 hores després de l'entrenament (Countryman *i col.*, 2005b). La participació de l'hipocamp ventral en la TSPA també s'ha posat de manifest en un altre estudi en el qual s'ha mostrat una activació del subicle ventral durant el record poc després de l'aprenentatge de la TSPA, activació que va disminuint successivament al llarg del temps (Ross i Eichenbaum, 2006). No obstant, els presents resultats no mostren diferències estadísticament significatives en l'expressió de c-Fos al subicle ventral, tot i que els subjectes estimulats a l'NBM presenten més cèl·lules immunorreactives que els controls. Malgrat tot, és sabut que la funció hipocampal en la memòria declarativa es manifesta eminentment en la memòria més a llarg termini, i que l'execució relacional a curt termini no sembla dependre tant directament de l'hipocamp (Bunsey i Eichenbaum, 1995). Així, les rates amb lesions hipocampals poden recordar preferències alimentàries transmeses socialment fins almenys 15 minuts i en alguns casos fins i tot 2 dies després de l'entrenament (Alvarez *i col.*, 2001; Bunsey i Eichenbaum, 1995; Clark *i col.*, 2002; Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001). A més, l'administració de *c-fos* antisentit impedeix la memòria de TSPA a llarg termini quan s'avalua 2 setmanes després de l'entrenament però no afecta a la memòria immediata (Countryman *i col.*, 2005a). Per tant, aquesta persistència de la memòria immediata després de les lesions suggereix que estructures o circuits extrahipocampals, com el prosencèfal basal o l'escorça prefrontal, podrien emmagatzemar l'associació dels estímuls olfactivs, almenys, durant unes hores (Roberts i Shapiro, 2002).

L'EIC de l'NBM no va modificar, en canvi, l'expressió de c-Fos a ABL, tot i que les neurones de l'NBM proporcionen la principal innervació colinèrgica a l'amígdala (Mesulam *i col.*, 1983b). Una possible explicació per aquest sorprenent resultat és que la intensitat del corrent d'estimulació no sigui la més apropiada per poder activar l'amígdala. El paràmetres d'EIC usats en el present treball són similars als usats en altres estudis on s'han mostrat un augment de l'activitat cortical deguda al tractament (Rasmusson, 2000). Per tant, és possible que no siguin els més adequats per activar l'amígdala ja que les neurones

corticopetals i amígdalopetals difereixen neurobiològicament en alguns aspectes i, per tant, podria ser que també diferissin en la seva neurofisiologia. Els mecanismes d'aprenentatge i memòria relacionats amb el menjar i les conseqüències de la seva ingesta depenen, en part, de l'amígdala ja que aquesta s'ha mostrat important per comportaments d'aprenentatge clàssic relacionats amb el gust i l'olfacte (veure Wang *i col.*, 2006). A més, tal com s'ha descrit en els antecedents experimentals, sembla que ABL també és una estructura necessària per l'adquisició de la TSPA (Wang *i col.*, 2006), tot i que no tots els treballs coincideixen (Burton *i col.*, 2000). No obstant, tenint en compte els paràmetres d'estimulació usats i els resultats en l'expressió de c-Fos obtinguts, el nostre tractament hauria afavorit l'adquisició inicial de la tasca sobretot a través de les seves projeccions corticals i que, per tant, circuits localitzats a l'EPF podrien haver codificat l'associació més transitòria entre els estímuls en la tasca de TSPA.

Finalment, si bé és cert que l'ús d'estimulació elèctrica no ens permet discernir entre l'estimulació dels cossos neuronals i els axons de pas, el fet que els efectes en l'expressió de c-Fos siguin específics de la regió estimulada i que els resultats observats siguin tan similars entre els subjectes estimulats al voltant, però fora, de l'NBM i els controls, ens suggereix que l'estimulació ha estat restringida a l'NBM.

- **Implicació de la transmissió muscarínica de l'escorça PL en la TSPA.**

Els resultats dels experiments anteriors ens suggerien que en el procés de facilitació de la TSPA hi podrien estar involucrades diverses regions corticals de l'EPF, especialment l'escorça PL. Per investigar aquesta hipòtesi vam portar a terme el tercer experiment (Trebball 2) en el qual vam bloquejar els receptors colinèrgics del PL amb escopolamina per estudiar si la alliberació d'ACh en aquesta regió del cervell era crítica per a l'aprenentatge de la tasca. Els resultats obtinguts així ho van confirmar, ja que el bloqueig muscarínic preentrenament va impedir severament l'expressió de la tasca immediatament després de l'entrenament, dèficits que es van mantenir 24 hores després.

Tenint en compte que la TSPA és una tasca que requereix una bona discriminació olfactiva, era important descartar que els dèficits observats no fossin deguts a un impediment en la detecció de l'aroma dels aliments provocat per la infusió d'escopolamina al PL. Les dades del nostre experiment, però, no recolzen aquesta opció ja que els animals que havien rebut escopolamina i els que havien rebut la solució vehicle no van mostrar diferències significatives en la latència per trobar una galeta enterrada en el test de percepció olfactiva. Això suggereix, doncs, que la infusió d'escopolamina al PL no afecta la capacitat olfactiva dels animals, i que per tant, els dèficits observats no són deguts a una disminució de la percepció olfactiva. Aquests resultats coincideixen, a més, amb els

obtinguts en un estudi previ on es mostrava que l'administració sistèmica de diferents dosis d'escopolamina no provocava alteracions en la detecció olfactiva en rates (Doty *i col.*, 2003).

Com ja s'ha comentat àmpliament en el primer treball, els resultats obtinguts en la TSPA podrien ser deguts a factors secundaris no derivats essencialment d'un dèficit en l'aprenentatge. No obstant, les infusions locals d'escopolamina al PL no van afectar altres mesures diferents del percentatge de preferència pel menjar entrenat que podrien haver confós els resultats. Per exemple, no es van mostrar diferències entre grups en diverses mesures d'interacció social com les ensumades al musell, al cos o a la zona anogenital i tampoc es va detectar cap correlació entre aquestes mesures i el percentatge de menjar entrenat consumit. Els dèficits en la TSPA observats en el present treball tampoc semblen relacionats amb una reducció en la motivació per menjar, ja que no es van observar diferències significatives entre els subjectes que havien rebut escopolamina o vehicle en el consum total de menjar en cap dels dos tests realitzats. Així mateix, tampoc es van observar diferències en la capacitat exploratòria o en el comportament motor dels animals, doncs ambdós grups van mostrar un grau similar de *grooming* durant les interaccions i van pujar el mateix nombre de vegades als pots de menjar durant els tests.

D'altra banda, una interpretació alternativa als dèficits observats en la TSPA és que la infusió d'escopolamina hagués produït una reacció antineofòbica i que, per tant, els subjectes que havien rebut escopolamina augmentessin el consum de menjar no entrenat pel fet de contenir una olor nova. No obstant, com ja s'ha comentat anteriorment, l'augment d'ACh cortical produeix accions antineofòbiques (Sienkiewicz-Jarosz *i col.*, 2000). Per aquest motiu, el bloqueig colinèrgic si tingués algun efecte sobre la neofòbia, aquest seria augmentant-la, afavorint així, el consum de menjar entrenat, fet que les nostres dades no recolzen. En el nostre estudi, els animals que havien rebut escopolamina no van consumir més menjar no entrenat en el test ja que el seu consum va ser al nivell d'atzar (50%). A més, en ambdós grups, el consum de menjar familiar no aromatitzat durant el període de preentrenament no va ser diferent del consum de menjar nou que havia estat aromatitzat amb cacau i canyella (menjar total en el test).

Per tant, les dades del present treball confirmen la participació de la transmissió muscarínica del PL en la TSPA, especialment en la seva adquisició ja que els dèficits s'observen ja en el test immediat. És probable que el bloqueig muscarínic durant l'entrenament de la TSPA hagi impedit la correcta formació inicial de l'associació entre l'olor del menjar i el CS<sub>2</sub> del demostrador i que, per tant, el posterior record hagi estat deficient. Així doncs, el bloqueig colinèrgic en el PL ha provocat dèficits similars als que s'havien observat amb interrupcions colinèrgiques corticals més generals, provocades per lesions

amb 192IgG-saporina de l'NBM (Vale-Martinez *i col.*, 2002a), suggerint que la depleció colinèrgica de l'NBM podria ser suficient per afectar la transmissió muscarínica en àrees de l'EPF com el PL.

Entre els possibles mecanismes subjacents al dèficit en l'adquisició de la TSPA degut a la infusió d'escopolamina, creiem que el bloqueig muscarínic ha impedit les funcions del PL que normalment afavoreixen l'aprenentatge relacional, com la flexibilitat cognitiva, l'atenció i/o la planificació estratègica. En aquest sentit, s'ha demostrat que els ratolins *knock-out* pel receptor muscarínic M2 mostren dèficits de flexibilitat cognitiva, memòria de treball i plasticitat sinàptica (Seeger *i col.*, 2004). A banda, les tasques que requereixen altes demandes de flexibilitat cognitiva són sensibles a les lesions colinèrgiques de l'NBM (Cabrera *i col.*, 2006), fet que suggereix que els dèficits observats en l'adquisició de la TSPA després de les lesions colinèrgiques de l'NBM (Vale-Martinez *i col.*, 2002a) podrien reflectir un dèficit relacionat amb aquest procés cognitiu. Per aquest motiu, l'NBM podria estar implicat en la flexibilitat cognitiva necessària per la TSPA, possiblement actuant a través de la seva influència sobre el PL.

No obstant, una altra possibilitat és que l'escopolamina al PL hagués bloquejat l'aprenentatge de la TSPA alterant processos atencional, és a dir, disminuint la capacitat de l'animal d'atendre als estímuls i per tant impedit la correcta associació d'olors necessària per la tasca. Tal com s'ha exposat en els antecedents experimentals, les neurones colinèrgiques del còrtex PL s'han relacionat àmpliament amb processos d'atenció (Chudasama *i col.*, 2003; Dalley *i col.*, 2001; Dalley *i col.*, 2004b; Gill *i col.*, 2000; Passetti *i col.*, 2000), i, concretament els receptors muscarínics s'ha vist que són necessaris en tasques d'alta demanda atencional (Chudasama *i col.*, 2004; Williams *i col.*, 1999). Per aquest motiu, s'ha proposat que l'augment de l'activitat colinèrgica, probablement a través dels receptors muscarínics, contribuiria als processos atencional en l'EPF (Sarter *i col.*, 2006).

Les esmentades funcions d'atenció i flexibilitat relacionades amb PL són necessàries per altres operacions de l'EPF com la planificació o l'organització de diferents accions (Gisquet-Verrier i Delatour, 2006). Segons Winocur i Moscovitch (1999), la TSPA implica planificació estratègica, ja que requereix que els subjectes seleccionin una dieta específica entre varies alternatives basant-se en l'experiència passada. Per aquest motiu, els dèficits observats en el present treball podrien reflectir problemes generals en la planificació d'estratègies. En conjunt, doncs, els resultats d'aquest tercer experiment suggereixen que el còrtex PL emprava la modulació muscarínica per funcions cognitives com la flexibilitat, l'atenció o la planificació d'estratègies les quals són necessàries en el processament d'informació per la correcta expressió de la TSPA.

- **Implicació de les projeccions colinèrgiques de l'NBM al PL en la TSPA.**

Tal com hem suggerit al llarg de la present discussió, els nostres resultats són coherents amb el paper del sistema colinèrgic en el processament d'informació olfactiva i en la memòria de reconeixement social. Diversos experiments han revelat un deteriorament de la memòria olfactiva i de reconeixement social en diferents paradigmes experimentals després de practicar lesions colinèrgiques del PB (Ferreira *i col.*, 2001; Linster *i col.*, 2001; Vale-Martinez *i col.*, 2002a) o de l'OFC (Ross *i col.*, 2005), i de bloquejar l'ACh amb antagonistes muscarínics (De Rosa i Hasselmo, 2000; Fletcher i Wilson, 2002; Hunter i Murray, 1989; Ravel *i col.*, 1994; Saar *i col.*, 2001). A més, facilitant la transmissió colinèrgica amb injeccions d'ACh o amb agonistes colinèrgics s'ha aconseguit millorar l'aprenentatge discriminatiu olfactivi de diferents tasques (Doty *i col.*, 1999; Saar *i col.*, 2001).

Els resultats obtinguts en la present tesi recolzen la hipòtesi colinèrgica de Hasselmo i McGaughy (2004) en la qual es proposa que és necessari que hi hagi nivells elevats d'ACh en el còrtex per establir les condicions apropiades per els processos d'atenció i codificació que són necessaris per un aprenentatge òptim. Segons els autors, l'ACh potencia la resposta cel·lular als *inputs* sensorials que arriben al còrtex, mentre que al mateix temps, disminueix la possibilitat d'interferència d'altres representacions corticals formades prèviament. Per tant, si aquesta hipòtesi és certa, l'augment d'ACh cortical (mitjançant l'EIC de l'NBM) hauria millorat la capacitat dels animals per codificar nova informació com l'associació d'olors necessària per la tasca de la TSPA. D'altra banda, el bloqueig de la funció colinèrgica cortical (mitjançant la infusió d'escopolamina al còrtex PL) hauria pogut impedir aquesta associació.

Malgrat tot, a part de la modulació colinèrgica cortical, altres vies colinèrgiques s'han mostrat importants per l'aprenentatge i la memòria de la TSPA, com el sistema SM-hipocamp. No obstant, tal com hem comentat anteriorment, sembla que el sistema colinèrgic hipocampal seria més necessari per la consolidació i el record de nova informació adquirida de TSPA que no per la seva adquisició, en canvi, el sistema colinèrgic cortical sembla que seria més essencial per l'adquisició de la tasca (Ross *i col.*, 2005; Vale-Martinez *i col.*, 2002a). Aquests resultats coincideixen amb els diferents treballs que mostren que les lesions de l'hipocamp afecten la retenció realitzada 24 hores després de l'entrenament però que no afecten l'adquisició de la TSPA, ja que els subjectes amb lesions a l'hipocamp realitzen correctament un test de retenció immediata (Bunsey i Eichenbaum, 1995; Clark *i col.*, 2002; Winocur, 1990; Winocur *i col.*, 2001). Tots aquests resultats, juntament amb els obtinguts en el present treball, suggereixen que diferents regions cerebrals contribuirien de manera diferenciada en la formació de l'aprenentatge i la

---

memòria de la TSPA. Cal indicar, però, que el present treball no es va dissenyar per estudiar el paper diferencial dels receptors muscarínics en diferents regions cerebrals, tot i que aquest seria un aspecte interessant a estudiar per tal d'entendre el paper de regions específiques en l'aprenentatge i el record de la TSPA.



# Conclusions

## VI. CONCLUSIONS

1. L'EIC de l'NBM aplicada preentrenament facilita l'aprenentatge de la tasca de TSPA avaluada tant en un test immediat com 24 hores després de l'entrenament.
2. L'efecte observat és cognitiu ja que no es veuen afectades altres variables com la motivació pel menjar, canvis en la neofòbia, el grau d'interacció social o l'activitat motora/exploratòria.
3. L'efecte facilitador de l'adquisició es pot atribuir a una millora en la codificació inicial dels estímuls o en la formació inicial de l'associació entre els dos principals estímuls de la tasca, l'olor del menjar i el component de l'alè de l'animal demostrador (CS<sub>2</sub>).
4. L'estimulació de l'NBM augmenta l'expressió de c-Fos bilateralment en regions prefrontals com el còrtex OFC, PL i IL i en algunes regions hipocampals com CA dorsal i GD ventral. En canvi, no afecta la seva expressió a l'ABL, al GD dorsal, a CA ventral ni al subicle ventral. Les regions prefrontals i hipocampals activades coincideixen amb àrees que s'han mostrat rellevants per la memòria associativa d'olors (Ross i Eichenbaum, 2006; Ross *i col.*, 2005) suggerint que la contribució de l'NBM a la TSPA podria estar mitjançada per aquestes àrees.
5. Tenint en compte que l'hipocamp participa en la consolidació més que en l'adquisició de la TSPA, és probable que la facilitació observada hagi estat produïda principalment a través de regions corticals.
6. L'antagonisme muscarínic del PL realitzat abans de l'entrenament de la TSPA, impedeix el record de la tasca immediatament i 24 hores després de l'aprenentatge.
7. Els resultats obtinguts pel bloqueig muscarínic suggereixen que el còrtex PL podria usar la modulació muscarínica per operacions cognitives com la flexibilitat, l'atenció i la planificació estratègica, funcions importants per la correcta expressió de la TSPA.

En conclusió, les dades presentades en aquesta tesi confirmen el paper de l'NBM en l'aprenentatge d'una tasca relacional de TSPA, que es podria produir a través de les seves projeccions colinèrgiques a una àrea de l'EPF, el còrtex PL. Aquests resultats suposen una generalització dels efectes facilitadors de l'EIC de l'NBM en les fases inicials de l'aprenentatge i la memòria, ja apuntats en altres tasques com l'EV2. Així mateix, les dades obtingudes impliquen una ampliació de les àrees de l'EPF que participen en la TSPA, ja que previament ja s'havia mostrat la implicació de l'OFC.

## Bibliografia

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

### **A**

- Aggleton, J. P. i Brown, M. W. (1999) **Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis.** *Behav Brain Sci* 22(3):425-444; discussion 444-489.
- Aggleton, J. P. i Saunders, R. C. (1997) **The relationships between temporal lobe and diencephalic structures implicated in anterograde amnesia.** *Memory* 5(1-2):49-71.
- Alvarez, P., Lipton, P. A., Melrose, R. i Eichenbaum, H. (2001) **Differential effects of damage within the hippocampal region on memory for a natural, nonspatial Odor-Odor Association.** *Learn Mem* 8(2):79-86.
- Alvarez, P., Wendelken, L. i Eichenbaum, H. (2002) **Hippocampal formation lesions impair performance in an odor-odor association task independently of spatial context.** *Neurobiol Learn Mem* 78(2):470-476.
- Alvarez, P., Zola-Morgan, S. i Squire, L. R. (1995) **Damage limited to the hippocampal region produces long-lasting memory impairment in monkeys.** *J Neurosci* 15(5 Pt 2):3796-3807.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S. i Del Grande, P. (2000) **Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus.** *Neurosci Lett* 286(1):21-24.
- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S. i Cuppini, R. (2004) **Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus.** *Neurosci Lett* 359(1-2):13-16.
- Amenta, F., Bronzetti, E., Caporali, M. G., Ciriaco, E., Germana, G. P., Niglio, T., Ricci, A. i de Carolis, A. S. (1991) **Nucleus basalis magnocellularis lesions impair mossy fiber system in rat hippocampus: a quantitative histochemical and ultrastructural study.** *Arch Gerontol Geriatr* 12(1):49-58.
- Ammassari-Teule, M., Amoroso, D., Forloni, G. L., Rossi-Arnaud, C. i Consolo, S. (1993) **Mechanical deafferentation of basal forebrain-cortical pathways and neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: comparative effect on spatial learning and cortical acetylcholine release in vivo.** *Behav Brain Res* 54(2):145-152.
- Anagnostaras, S. G., Murphy, G. G., Hamilton, S. E., Mitchell, S. L., Rahnama, N. P., Nathanson, N. M. i Silva, A. J. (2003) **Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice.** *Nat Neurosci* 6(1):51-58.
- Arnold, H. M., Burk, J. A., Hodgson, E. M., Sarter, M. i Bruno, J. P. (2002) **Differential cortical acetylcholine release in rats performing a sustained attention task versus behavioral control tasks that do not explicitly tax attention.** *Neuroscience* 114(2):451-460.

Arnsten, A. F. (1997) **Catecholamine regulation of the prefrontal cortex.** *J Psychopharmacol* 11(2):151-162.

Asanuma, C. (1997) **Distribution of neuromodulatory inputs in the reticular and dorsal thalamic nuclei.** In *Thalamus II. Experimental and Clinical Aspects.* M. Steriade, E. G. Jones i D. A. McCormick, editors. Elsevier, Amsterdam.

## B

Bailey, A. M., Rudisill, M. L., Hoof, E. J. i Loving, M. L. (2003) **192 IgG-saporin lesions to the nucleus basalis magnocellularis (nBM) disrupt acquisition of learning set formation.** *Brain Res* 969(1-2):147-159.

Bailey, A. M. i Thomas, R. K. (2001) **The effects of nucleus basalis magnocellularis lesions in Long-Evans hooded rats on two learning set formation tasks, delayed matching-to-sample learning, and open-field activity.** *Behav Neurosci* 115(2):328-340.

Bakin, J. S. i Weinberger, N. M. (1996) **Induction of a physiological memory in the cerebral cortex by stimulation of the nucleus basalis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20):11219-11224.

Balducci, C., Nurra, M., Pietropoli, A., Samanin, R. i Carli, M. (2003) **Reversal of visual attention dysfunction after AMPA lesions of the nucleus basalis magnocellularis (NBM) by the cholinesterase inhibitor donepezil and by a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY 100635.** *Psychopharmacology (Berl)* 167(1):28-36.

Balleine, B. W. i Dickinson, A. (1998) **Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates.** *Neuropharmacology* 37(4-5):407-419.

Bartus, R. T., Flicker, C., Dean, R. L., Pontecorvo, M., Figueiredo, J. C. i Fisher, S. K. (1985) **Selective memory loss following nucleus basalis lesions: long term behavioral recovery despite persistent cholinergic deficiencies.** *Pharmacol Biochem Behav* 23(1):125-135.

Baskerville, K. A., Schweitzer, J. B. i Herron, P. (1997) **Effects of cholinergic depletion on experience-dependent plasticity in the cortex of the rat.** *Neuroscience* 80(4):1159-1169.

Batchelor, P. E., Armstrong, D. M., Blaker, S. N. i Gage, F. H. (1989) **Nerve growth factor receptor and choline acetyltransferase colocalization in neurons within the rat forebrain: response to fimbria-fornix transection.** *J Comp Neurol* 284(2):187-204.

Baxter, M. G., Bucci, D. J., Gorman, L. K., Wiley, R. G. i Gallagher, M. (1995) **Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats.** *Behav Neurosci* 109(4):714-722.

Baxter, M. G. i Chiba, A. A. (1999) **Cognitive functions of the basal forebrain.** *Curr Opin Neurobiol* 9(2):178-183.

- Beaulieu, C. (1993) **Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population.** *Brain Res* 609(1-2):284-292.
- Berendse, H. W. i Groenewegen, H. J. (1991) **Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat.** *Neuroscience* 42(1):73-102.
- Berger-Sweeney, J., Heckers, S., Mesulam, M. M., Wiley, R. G., Lappi, D. A. i Sharma, M. (1994) **Differential effects on spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis.** *J Neurosci* 14(7):4507-4519.
- Berger-Sweeney, J., Stearns, N. A., Frick, K. M., Beard, B. i Baxter, M. G. (2000) **Cholinergic basal forebrain is critical for social transmission of food preferences.** *Hippocampus* 10(6):729-738.
- Berger, B., Gaspar, P. i Verney, C. (1991) **Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates.** *Trends Neurosci* 14(1):21-27.
- Berntson, G. G., Shafi, R. i Sarter, M. (2002) **Specific contributions of the basal forebrain corticopetal cholinergic system to electroencephalographic activity and sleep/waking behaviour.** *Eur J Neurosci* 16(12):2453-2461.
- Bickford, M. E., Gunluk, A. E., Van Horn, S. C. i Sherman, S. M. (1994) **GABAergic projection from the basal forebrain to the visual sector of the thalamic reticular nucleus in the cat.** *J Comp Neurol* 348(4):481-510.
- Bina, K. G., Rusak, B. i Semba, K. (1993) **Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat.** *J Comp Neurol* 335(2):295-307.
- Birrell, J. M. i Brown, V. J. (2000) **Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat.** *J Neurosci* 20(11):4320-4324.
- Bjordahl, T. S., Dimyan, M. A. i Weinberger, N. M. (1998) **Induction of long-term receptive field plasticity in the auditory cortex of the waking guinea pig by stimulation of the nucleus basalis.** *Behav Neurosci* 112(3):467-479.
- Boegman, R. J., Cockhill, J., Jhamandas, K. i Beninger, R. J. (1992) **Excitotoxic lesions of rat basal forebrain: differential effects on choline acetyltransferase in the cortex and amygdala.** *Neuroscience* 51(1):129-135.
- Boix-Trelis, N., Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., Costa-Miserachs, D. i Marti-Nicolovius, M. (2006) **Effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on a socially transmitted food preference and c-Fos expression.** *Learn Mem* 13(6):783-793.
- Book, A. A., Wiley, R. G. i Schweitzer, J. B. (1994) **192 IgG-saporin: I. Specific lethality for cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat.** *J Neuropathol Exp Neurol* 53(1):95-102.

- Botreau, F., El Massioui, N., Cheruel, F. i Gisquet-Verrier, P. (2004) **Effects of medial prefrontal cortex and dorsal striatum lesions on retrieval processes in rats.** *Neuroscience* 129(3):539-553.
- Bowser, R., Kordower, J. H. i Mufson, E. J. (1997) **A confocal microscopic analysis of galanergic hyperinnervation of cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer's disease.** *Brain Pathol* 7(2):723-730.
- Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C. i Walker, M. W. (2000) **Galanin receptor subtypes.** *Trends Pharmacol Sci* 21(3):109-117.
- Brightwell, J. J., Smith, C. A., Countryman, R. A., Neve, R. L. i Colombo, P. J. (2005) **Hippocampal overexpression of mutant creb blocks long-term, but not short-term memory for a socially transmitted food preference.** *Learn Mem* 12(1):12-17.
- Bringmann, A. i Klingberg, F. (1990) **Behaviour-dependent changes of the acoustically evoked potential in the frontal cortex of the freely moving rat and modulation by electrical basal forebrain stimulation.** *Biomed Biochim Acta* 49(7):597-605.
- Brito, G. N. i Brito, L. S. (1990) **Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat.** *Behav Brain Res* 36(1-2):127-146.
- Brito, G. N., Silva, S. P. i Brito, L. S. (1989) **The cholinergic and dopaminergic systems of the prelimbic sector of frontal cortex and memory in the rat.** *Braz J Med Biol Res* 22(9):1155-1158.
- Brito, G. N., Thomas, G. J., Davis, B. J. i Gingold, S. I. (1982) **Prelimbic cortex, mediodorsal thalamus, septum, and delayed alternation in rats.** *Exp Brain Res* 46(1):52-58.
- Broersen, L. M., Heinsbroek, R. P., de Bruin, J. P., Uylings, H. B. i Olivier, B. (1995) **The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms.** *Brain Res* 674(2):221-229.
- Broersen, L. M. i Uylings, H. B. (1999) **Visual attention task performance in Wistar and Lister hooded rats: response inhibition deficits after medial prefrontal cortex lesions.** *Neuroscience* 94(1):47-57.
- Broks, P., Preston, G. C., Traub, M., Poppleton, P., Ward, C. i Stahl, S. M. (1988) **Modelling dementia: effects of scopolamine on memory and attention.** *Neuropsychologia* 26(5):685-700.
- Bubser, M. i Schmidt, W. J. (1990) **6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze.** *Behav Brain Res* 37(2):157-168.
- Bunsey, M. i Eichenbaum, H. (1995) **Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association.** *Hippocampus* 5(6):546-556.



- Burk, J. A. i Sarter, M. (2001) **Dissociation between the attentional functions mediated via basal forebrain cholinergic and GABAergic neurons.** *Neuroscience* 105(4):899-909.
- Burton, S., Murphy, D., Qureshi, U., Sutton, P. i O'Keefe, J. (2000) **Combined lesions of hippocampus and subiculum Do not produce deficits in a nonspatial social olfactory memory task.** *J Neurosci* 20(14):5468-5475.
- Bussey, T. J., Muir, J. L., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1997) **Triple dissociation of anterior cingulate, posterior cingulate, and medial frontal cortices on visual discrimination tasks using a touchscreen testing procedure for the rat.** *Behav Neurosci* 111(5):920-936.
- Butcher, L. L. (1995) **Cholinergic neurons and networks.** In *The Rat Nervous System*. G. Paxinos, editor. 2nd ed. San Diego Academic Press. 1004-1015.
- Butler, D. M., Ono, J. K., Chang, T., McCaman, R. E. i Barish, M. E. (1998) **Mouse brain potassium channel beta1 subunit mRNA: cloning and distribution during development.** *J Neurobiol* 34(2):135-150.
- Butt, A. E. i Bowman, T. D. (2002) **Transverse patterning reveals a dissociation of simple and configural association learning abilities in rats with 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis magnocellularis.** *Neurobiol Learn Mem* 77(2):211-233.
- Butt, A. E. i Hodge, G. K. (1995) **Acquisition, retention, and extinction of operant discriminations in rats with nucleus basalis magnocellularis lesions.** *Behav Neurosci* 109(4):699-713.
- Butt, A. E., Schultz, J. A., Arnold, L. L., Garman, E. E., George, C. L. i Garraghty, P. E. (2003) **Lesions of the rat nucleus basalis magnocellularis disrupt appetitive-to-aversive transfer learning.** *Integr Physiol Behav Sci* 38(4):253-271.
- Buzsaki, G., Bickford, R. G., Ponomareff, G., Thal, L. J., Mandel, R. i Gage, F. H. (1988) **Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat.** *J Neurosci* 8(11):4007-4026.

## C

- Cabrera, S. M., Chavez, C. M., Corley, S. R., Kitto, M. R. i Butt, A. E. (2006) **Selective lesions of the nucleus basalis magnocellularis impair cognitive flexibility.** *Behav Neurosci* 120(2):298-306.
- Candy, J. M., Perry, R. H., Perry, E. K., Irving, D., Blessed, G., Fairbairn, A. F. i Tomlinson, B. E. (1983) **Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases.** *J Neurol Sci* 59(2):277-289.
- Carballo-Marquez, A., Vale-Martínez, A., Boix-Trelis, N., Torras-Garcia, M., Guillazo-Blanch, G., & Martí-Nicolovius, M. (2006). **Effects of scopolamine in the rat prelimbic cortex on odor-reward associative learning.** *Eight Conference on the Neurobiology of Learning and Memory*. Abstract 12.

- Carnes, K. M., Fuller, T. A. i Price, J. L. (1990) **Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat.** *J Comp Neurol* 302(4):824-852.
- Carr, D. B. i Sesack, S. R. (1996) **Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals.** *J Comp Neurol* 369(1):1-15.
- Carr, D. B. i Sesack, S. R. (2000) **GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex.** *Synapse* 38(2):114-123.
- Casamenti, F., Deffenu, G., Abbamondi, A. L. i Pepeu, G. (1986) **Changes in cortical acetylcholine output induced by modulation of the nucleus basalis.** *Brain Res Bull* 16(5):689-695.
- Celio, M. R. (1990) **Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system.** *Neuroscience* 35(2):375-475.
- Clark, R. E., Broadbent, N. J., Zola, S. M. i Squire, L. R. (2002) **Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum.** *J Neurosci* 22(11):4663-4669.
- Colquhoun, W. P. (1962) **Effects of hyoscine and meclozine on vigilance and short-term memory.** *Br J Ind Med* 19:287-295.
- Conde, F., Maire-Lepoivre, E., Audinat, E. i Crepel, F. (1995) **Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents.** *J Comp Neurol* 352(4):567-593.
- Conner, J. M., Culberson, A., Packowski, C., Chiba, A. A. i Tuszynski, M. H. (2003) **Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning.** *Neuron* 38(5):819-829.
- Connor, D. J., Langlais, P. J. i Thal, L. J. (1991) **Behavioral impairments after lesions of the nucleus basalis by ibotenic acid and quisqualic acid.** *Brain Res* 555(1):84-90.
- Cornwall, J., Cooper, J. D. i Phillipson, O. T. (1990) **Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat.** *Exp Brain Res* 80(1):157-171.
- Countryman, R. A., Kaban, N. L. i Colombo, P. J. (2005a) **Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference.** *Neurobiol Learn Mem* 84(3):175-183.
- Countryman, R. A., Orłowski, J. D., Brightwell, J. J., Oskowitz, A. Z. i Colombo, P. J. (2005b) **CREB phosphorylation and c-Fos expression in the hippocampus of rats during acquisition and recall of a socially transmitted food preference.** *Hippocampus* 15(1):56-67.
- Counts, S. E., Perez, S. E., Kahl, U., Bartfai, T., Bowser, R. P., Deecher, D. C., Mash, D. C., Crawley, J. N. i Mufson, E. J. (2001) **Galanin: neurobiologic mechanisms and therapeutic potential for Alzheimer's disease.** *CNS Drug Rev* 7(4):445-470.

- Crawley, J. N. i Wenk, G. L. (1989) **Co-existence of galanin and acetylcholine: is galanin involved in memory processes and dementia?** *Trends Neurosci* 12(8):278-282.
- Critchley, H. D. i Rolls, E. T. (1996) **Olfactory neuronal responses in the primate orbitofrontal cortex: analysis in an olfactory discrimination task.** *J Neurophysiol* 75(4):1659-1672.
- Chan-Palay, V. (1988) **Galanin hyperinnervates surviving neurons of the human basal nucleus of Meynert in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease: a hypothesis for the role of galanin in accentuating cholinergic dysfunction in dementia.** *J Comp Neurol* 273(4):543-557.
- Chiba, A. A., Bucci, D. J., Holland, P. C. i Gallagher, M. (1995) **Basal forebrain cholinergic lesions disrupt increments but not decrements in conditioned stimulus processing.** *J Neurosci* 15(11):7315-7322.
- Chudasama, Y., Baunez, C. i Robbins, T. W. (2003) **Functional disconnection of the medial prefrontal cortex and subthalamic nucleus in attentional performance: evidence for corticosubthalamic interaction.** *J Neurosci* 23(13):5477-5485.
- Chudasama, Y., Bussey, T. J. i Muir, J. L. (2001) **Effects of selective thalamic and prelimbic cortex lesions on two types of visual discrimination and reversal learning.** *Eur J Neurosci* 14(6):1009-1020.
- Chudasama, Y., Dalley, J. W., Nathwani, F., Bouger, P. i Robbins, T. W. (2004) **Cholinergic modulation of visual attention and working memory: dissociable effects of basal forebrain 192-IgG-saporin lesions and intraprefrontal infusions of scopolamine.** *Learn Mem* 11(1):78-86.
- Chudasama, Y. i Robbins, T. W. (2004) **Dopaminergic modulation of visual attention and working memory in the rodent prefrontal cortex.** *Neuropsychopharmacology* 29(9):1628-1636.
- D**
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N. i Robbins, T. W. (2004a) **Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates.** *Neurosci Biobehav Rev* 28(7):771-784.
- Dalley, J. W., McGaughy, J., O'Connell, M. T., Cardinal, R. N., Levita, L. i Robbins, T. W. (2001) **Distinct changes in cortical acetylcholine and noradrenaline efflux during contingent and noncontingent performance of a visual attentional task.** *J Neurosci* 21(13):4908-4914.
- Dalley, J. W., Theobald, D. E., Bouger, P., Chudasama, Y., Cardinal, R. N. i Robbins, T. W. (2004b) **Cortical cholinergic function and deficits in visual attentional performance in rats following 192 IgG-saporin-induced lesions of the medial prefrontal cortex.** *Cereb Cortex* 14(8):922-932.
- Datiche, F. i Cattarelli, M. (1996) **Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin.** *Brain Res Bull* 41(6):391-398.

- Davies, P. i Maloney, A. J. (1976) **Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease.** *Lancet* 2(8000):1403.
- de Bruin, J. P., Sanchez-Santed, F., Heinsbroek, R. P., Donker, A. i Postmes, P. (1994) **A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the Morris water maze: evidence for behavioural flexibility, but not for impaired spatial navigation.** *Brain Res* 652(2):323-333.
- De Rosa, E. i Hasselmo, M. E. (2000) **Muscarinic cholinergic neuromodulation reduces proactive interference between stored odor memories during associative learning in rats.** *Behav Neurosci* 114(1):32-41.
- DeFelipe, J. (2002) **Cortical interneurons: from Cajal to 2001.** *Prog Brain Res* 136:215-238.
- DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L. i Arellano, J. I. (2002) **Microstructure of the neocortex: comparative aspects.** *J Neurocytol* 31(3-5):299-316.
- Delatour, B. i Gisquet-Verrier, P. (1996) **Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat.** *Behav Neurosci* 110(6):1282-1298.
- Delatour, B. i Gisquet-Verrier, P. (1999) **Lesions of the prefrontal-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory?** *Behav Neurosci* 113(5):941-955.
- Delatour, B. i Gisquet-Verrier, P. (2000) **Functional role of rat prefrontal-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility.** *Behav Brain Res* 109(1):113-128.
- Delatour, B. i Witter, M. P. (2002) **Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways.** *Eur J Neurosci* 15(8):1400-1407.
- Detari, L. (2000) **Tonic and phasic influence of basal forebrain unit activity on the cortical EEG.** *Behav Brain Res* 115(2):159-170.
- Detari, L., Rasmusson, D. D. i Semba, K. (1999) **The role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex.** *Prog Neurobiol* 58(3):249-277.
- Detari, L. i Vanderwolf, C. H. (1987) **Activity of identified cortically projecting and other basal forebrain neurones during large slow waves and cortical activation in anaesthetized rats.** *Brain Res* 437(1):1-8.
- Dias, R. i Aggleton, J. P. (2000) **Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prefrontal-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility.** *Eur J Neurosci* 12(12):4457-4466.
- Dias, R., Robbins, T. W. i Roberts, A. C. (1996) **Primate analogue of the Wisconsin Card Sorting Test: effects of excitotoxic lesions of the prefrontal cortex in the marmoset.** *Behav Neurosci* 110(5):872-886.

- Dimyan, M. A. i Weinberger, N. M. (1999) **Basal forebrain stimulation induces discriminative receptive field plasticity in the auditory cortex.** *Behav Neurosci* 113(4):691-702.
- Ding, D. C., Gabbott, P. L. i Totterdell, S. (2001) **Differences in the laminar origin of projections from the medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens shell and core regions in the rat.** *Brain Res* 917(1):81-89.
- Dobrossy, M. D., Drapeau, E., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V. i Abrous, D. N. (2003) **Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date.** *Mol Psychiatry* 8(12):974-982.
- Dokla, C. P. i Thal, L. J. (1988) **Effect of cholinesterase inhibitors on Morris water task behavior following lesions of the nucleus basalis magnocellularis.** *Behav Neurosci* 102(6):861-871.
- Dornan, W. A., McCampbell, A. R., Tinkler, G. P., Hickman, L. J., Bannon, A. W., Decker, M. W. i Gunther, K. L. (1996) **Comparison of site-specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin.** *Behav Brain Res* 82(1):93-101.
- Doty, R. L., Bagla, R. i Kim, N. (1999) **Physostigmine enhances performance on an odor mixture discrimination test.** *Physiol Behav* 65(4-5):801-804.
- Doty, R. L., Bagla, R., Misra, R., Mueller, E. i Kerr, K. L. (2003) **No influence of scopolamine hydrobromide on odor detection performance of rats.** *Chem Senses* 28(9):761-765.
- Douglas, R. J. i Martin, K. A. (1991) **A functional microcircuit for cat visual cortex.** *J Physiol* 440:735-769.
- Drachman, D. A. i Leavitt, J. (1974) **Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?** *Arch Neurol* 30(2):113-121.
- Dringenberg, H. C. (2000) **Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' - evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia.** *Behav Brain Res* 115(2):235-249.
- Dunnett, S. B., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1991) **The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions.** *Trends Neurosci* 14(11):494-501.
- Dunnett, S. B., Wareham, A. T. i Torres, E. M. (1990) **Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats.** *Neuroreport* 1(1):61-64.
- Dunnett, S. B., Wishaw, I. Q., Jones, G. H. i Bunch, S. T. (1987) **Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats.** *Neuroscience* 20(2):653-669.
- Duque, A., Balatoni, B., Detari, L. i Zaborszky, L. (2000) **EEG correlation of the discharge properties of identified neurons in the basal forebrain.** *J Neurophysiol* 84(3):1627-1635.

Dusek, J. A. i Eichenbaum, H. (1997) **The hippocampus and memory for orderly stimulus relations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):7109-7114.

Dusek, J. A. i Eichenbaum, H. (1998) **The hippocampus and transverse patterning guided by olfactory cues.** *Behav Neurosci* 112(4):762-771.

## E

Edeline, J. M., Hars, B., Maho, C. i Hennevin, E. (1994) **Transient and prolonged facilitation of tone-evoked responses induced by basal forebrain stimulations in the rat auditory cortex.** *Exp Brain Res* 97(3):373-386.

Eggermann, E., Serafin, M., Bayer, L., Machard, D., Saint-Mieux, B., Jones, B. E. i Muhlethaler, M. (2001) **Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones.** *Neuroscience* 108(2):177-181.

Eglen, R. M. (2006) **Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function.** *Auton Autacoid Pharmacol* 26(3):219-233.

Eichenbaum, H. (2000) **A cortical-hippocampal system for declarative memory.** *Nat Rev Neurosci* 1(1):41-50.

Eichenbaum, H., Otto, T. i Cohen, N. J. (1992) **The hippocampus--what does it do?** *Behav Neural Biol* 57(1):2-36.

Elaagouby, A. i Gervais, R. (1992) **ACh-induced long-lasting enhancement in excitability of the olfactory bulb.** *Neuroreport* 3(1):10-12.

Elaagouby, A., Ravel, N. i Gervais, R. (1991) **Cholinergic modulation of excitability in the rat olfactory bulb: effect of local application of cholinergic agents on evoked field potentials.** *Neuroscience* 45(3):653-662.

Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1997) **Central cholinergic systems and cognition.** *Annu Rev Psychol* 48:649-684.

## F

Faulkes, C. G. (1999) **Social transmission of information in a eusocial rodent, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*).** *In* Mammalian social learning: Comparative and ecological perspectives. H. O. Box i K. R. Gibson, editors. Cambridge University Press, Cambridge, England. 205-220.

Ferguson, G. D., Anagnostaras, S. G., Silva, A. J. i Herschman, H. R. (2000) **Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5598-5603.

Ferreira, G., Meurisse, M., Gervais, R., Ravel, N. i Levy, F. (2001) **Extensive immunolesions of basal forebrain cholinergic system impair offspring recognition in sheep.** *Neuroscience* 106(1):103-116.

- Fibiger, H. C. (1982) **The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain.** *Brain Res* 257(3):327-388.
- Fine, A., Hoyle, C., Maclean, C. J., Levatte, T. L., Baker, H. F. i Ridley, R. M. (1997) **Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys.** *Neuroscience* 81(2):331-343.
- Fisher, R. S., Buchwald, N. A., Hull, C. D. i Levine, M. S. (1988) **GABAergic basal forebrain neurons project to the neocortex: the localization of glutamic acid decarboxylase and choline acetyltransferase in feline corticopetal neurons.** *J Comp Neurol* 272(4):489-502.
- Fletcher, M. L. i Wilson, D. A. (2002) **Experience modifies olfactory acuity: acetylcholine-dependent learning decreases behavioral generalization between similar odors.** *J Neurosci* 22(2):RC201.
- Flicker, C., Dean, R. L., Watkins, D. L., Fisher, S. K. i Bartus, R. T. (1983) **Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat.** *Pharmacol Biochem Behav* 18(6):973-981.
- Forkman, B. (1991) **Social facilitation is shown by gerbils when presented with novel but no with familiar food.** *Anim Behav* 42:860-861.
- Freund, T. F. i Meskenaite, V. (1992) **gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2):738-742.
- Fritts, M. E., Asbury, E. T., Horton, J. E. i Isaac, W. L. (1998) **Medial prefrontal lesion deficits involving or sparing the prelimbic area in the rat.** *Physiol Behav* 64(3):373-380.
- Fuster, J. M. (1997) **The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe.** Lipincott-Raven, Philadelphia-New York.

## G

- Gabbott, P., Headlam, A. i Busby, S. (2002) **Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat.** *Brain Res* 946(2):314-322.
- Gabbott, P. L., Warner, T. A., Jays, P. R., Salway, P. i Busby, S. J. (2005) **Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers.** *J Comp Neurol* 492(2):145-177.
- Galani, R., Lehmann, O., Bolmont, T., Aloy, E., Bertrand, F., Lazarus, C., Jeltsch, H. i Cassel, J. C. (2002) **Selective immunolesions of CH4 cholinergic neurons do not disrupt spatial memory in rats.** *Physiol Behav* 76(1):75-90.
- Galef, B. G., Jr. (1989) **Enduring social enhancement of rats' preferences for the palatable and the piquant.** *Appetite* 13(2):81-92.

- Galef, B. G., Jr. (1990) **An adaptationist perspective on social learning, social feeding, and social foraging in Norway rats.** In Contemporary Issues in Comparative Psychology. D. A. Dewsbury, editor. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. pp. 55-79.
- Galef, B. G., Jr. (1993) **Functions of social learning about food: A causal analysis of effects of diet novelty on diet preference.** *Anim Behav* 46:257-265.
- Galef, B. G., Jr. (2005) **Social learning.** In The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests. I. Q. Whishaw i B. Kolb, editors. Oxford University Press, New York, USA. pp. 363-370.
- Galef, B. G., Jr., Kennett, D. J. i Stein, M. (1985) **Demonstrator influence on observer diet preference: effects of simple exposure and the presence of a demonstrator.** *Anim Learn Behav* 13:25-30.
- Galef, B. G., Jr., Kennett, D. J. i Wigmore, S. R. (1984) **Transfer of information concerning distant foods in rats: a robust phenomenon.** *Anim Learn Behav* 12(3):292-296.
- Galef, B. G., Jr., Lee, W. Y. i Whiskin, E. E. (2005) **Lack of interference in long-term memory for socially learned food preferences in rats (*Rattus norvegicus*).** *J Comp Psychol* 119(2):131-135.
- Galef, B. G., Jr., Mason, J. R., Preti, G. i Bean, N. J. (1988) **Carbon disulfide: a semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats.** *Physiol Behav* 42(2):119-124.
- Galef, B. G., Jr., Rudolf, B., Whiskin, E. E., Choleris, E., Mainardi, M. i Valsecchi, P. (1998) **Familiarity and relatedness: Effects on social learning about foods by Norway rats and Mongolian gerbils.** *Anim Learn Behav* 26:448-454.
- Galef, B. G., Jr. i Whiskin, E. E. (1994) **Passage of time reduces effects of familiarity on social learning: Functional implications.** *Anim Behav* 48(10):1057-1062.
- Galef, B. G., Jr. i Whiskin, E. E. (1998) **Limits on social influence on food choices of Norway rats.** *Anim Behav* 56(4):1015-1020.
- Galef, B. G., Jr. i Whiskin, E. E. (2003) **Socially transmitted food preferences can be used to study long-term memory in rats.** *Learn Behav* 31(2):160-164.
- Galef, B. G., Jr. i Wigmore, S. R. (1983) **Transfer of information concerning distant foods: a laboratory investigation of the 'information-centre' hypothesis.** *Ann. Behav.* 31:748-758.
- Gallagher, M. i Colombo, P. J. (1995) **Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline.** *Curr Opin Neurobiol* 5(2):161-168.
- Gass, P., Wolfer, D. P., Balschun, D., Rudolph, D., Frey, U., Lipp, H. P. i Schutz, G. (1998) **Deficits in memory tasks of mice with CREB mutations depend on gene dosage.** *Learn Mem* 5(4-5):274-288.



- Gaykema, R. P., Gaal, G., Traber, J., Hersh, L. B. i Luiten, P. G. (1991) **The basal forebrain cholinergic system: efferent and afferent connectivity and long-term effects of lesions.** *Acta Psychiatr Scand Suppl* 366:14-26.
- Gaykema, R. P., Luiten, P. G., Nyakas, C. i Traber, J. (1990) **Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex.** *J Comp Neurol* 293(1):103-124.
- Gewirtz, J. C., Falls, W. A. i Davis, M. (1997) **Normal conditioned inhibition and extinction of freezing and fear-potentiated startle following electrolytic lesions of medial prefrontal cortex in rats.** *Behav Neurosci* 111(4):712-726.
- Ghashghaei, H. T. i Barbas, H. (2001) **Neural interaction between the basal forebrain and functionally distinct prefrontal cortices in the rhesus monkey.** *Neuroscience* 103(3):593-614.
- Gheusi, G., Bluthé, R. M., Goodall, G. i Dantzer, R. (1994) **Ethological study of the effects of tetrahydroaminoacridine (THA) on social recognition in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 114(4):644-650.
- Giese, K. P., Storm, J. F., Reuter, D., Fedorov, N. B., Shao, L. R., Leicher, T., Pongs, O. i Silva, A. J. (1998) **Reduced K<sup>+</sup> channel inactivation, spike broadening, and after-hyperpolarization in Kvbeta1.1-deficient mice with impaired learning.** *Learn Mem* 5(4-5):257-273.
- Gill, T. M., Masters, J., Sarter, M. i Givens, B. (1999) **The role of acetylcholine within the medial prefrontal and posterior parietal cortices during sustained visual attention in the rat.** *Soc Neurosci Abstr* 25:1895.
- Gill, T. M., Sarter, M. i Givens, B. (2000) **Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic modulation.** *J Neurosci* 20(12):4745-4757.
- Gisquet-Verrier, P. i Delatour, B. (2006) **The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions.** *Neuroscience* 141(2):585-596.
- Gisquet-Verrier, P., Winocur, G. i Delatour, B. (2000) **Functional dissociation between dorsal and ventral regions of the medial prefrontal cortex in rats.** *Psychobiology* 28:248-260.
- Givens, B. i Sarter, M. (1997) **Modulation of cognitive processes by transsynaptic activation of the basal forebrain.** *Behav Brain Res* 84(1-2):1-22.
- Gold, P. E. (2003) **Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory.** *Neurobiol Learn Mem* 80(3):194-210.
- Golmayo, L., Nunez, A. i Zaborszky, L. (2003) **Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical-prefrontal-basal forebrain circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas.** *Neuroscience* 119(2):597-609.
- Gonzalo-Ruiz, A., Alonso, A., Sanz, J. M. i Llinas, R. R. (1992) **Afferent projections to the mammillary complex of the rat, with special reference to those from surrounding hypothalamic regions.** *J Comp Neurol* 321(2):277-299.

- Gorelova, N. i Yang, C. R. (1997) **The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat.** *Neuroscience* 76(3):689-706.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. i Shors, T. J. (1999) **Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.** *Nat Neurosci* 2(3):260-265.
- Granon, S., Hardouin, J., Courtier, A. i Poucet, B. (1998) **Evidence for the involvement of the rat prefrontal cortex in sustained attention.** *Q J Exp Psychol B* 51(3):219-233.
- Granon, S., Passetti, F., Thomas, K. L., Dalley, J. W., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (2000) **Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex.** *J Neurosci* 20(3):1208-1215.
- Granon, S. i Poucet, B. (1995) **Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning.** *Behav Neurosci* 109(3):474-484.
- Granon, S. i Poucet, B. (2000) **Involvement of the rat prefrontal cortex in cognitive functions: A central role for the prelimbic area.** *Psychobiology* 28:229-237.
- Granon, S., Poucet, B., Thinus-Blanc, C., Changeux, J. P. i Vidal, C. (1995) **Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing.** *Psychopharmacology (Berl)* 119(2):139-144.
- Granon, S., Save, E., Buhot, M. C. i Poucet, B. (1996) **Effortful information processing in a spontaneous spatial situation by rats with medial prefrontal lesions.** *Behav Brain Res* 78(2):147-154.
- Granon, S., Vidal, C., Thinus-Blanc, C., Changeux, J. P. i Poucet, B. (1994) **Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions.** *Behav Neurosci* 108(5):883-891.
- Gritti, I., Henny, P., Galloni, F., Mainville, L., Mariotti, M. i Jones, B. E. (2006) **Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters.** *Neuroscience* 143:1051-1064.
- Gritti, I., Mainville, L. i Jones, B. E. (1993) **Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat.** *J Comp Neurol* 329(4):438-457.
- Gritti, I., Mainville, L. i Jones, B. E. (1994) **Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat.** *J Comp Neurol* 339(2):251-268.
- Gritti, I., Mainville, L., Mancina, M. i Jones, B. E. (1997) **GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat.** *J Comp Neurol* 383(2):163-177.

- Gritti, I., Manns, I. D., Mainville, L. i Jones, B. E. (2003) **Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat.** *J Comp Neurol* 458(1):11-31.
- Groenewegen, H. J. (1988) **Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography.** *Neuroscience* 24(2):379-431.
- Grover, C. A., Kixmiller, J. S., Erickson, C. A., Becker, A. H., Davis, S. F. i Nallan, G. B. (1988) **The social transmission of information concerning aversively conditioned liquids.** *Psychol Rep* 38:557-566.

## H

- Hagan, J. J., Salamone, J. D., Simpson, J., Iversen, S. D. i Morris, R. G. (1988) **Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis.** *Behav Brain Res* 27(1):9-20.
- Hars, B., Maho, C., Edeline, J. M. i Hennevin, E. (1993) **Basal forebrain stimulation facilitates tone-evoked responses in the auditory cortex of awake rat.** *Neuroscience* 56(1):61-74.
- Hasselmo, M. E. i McGaughy, J. (2004) **High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation.** *Prog Brain Res* 145:207-231.
- Heckers, S., Ohtake, T., Wiley, R. G., Lappi, D. A., Geula, C. i Mesulam, M. M. (1994) **Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 NGF receptor.** *J Neurosci* 14(3 Pt 1):1271-1289.
- Heidbreder, C. A. i Groenewegen, H. J. (2003) **The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics.** *Neurosci Biobehav Rev* 27(6):555-579.
- Herdegen, T., Kovary, K., Buhl, A., Bravo, R., Zimmermann, M. i Gass, P. (1995) **Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, and Krox-24 in the adult rat brain.** *J Comp Neurol* 354(1):39-56.
- Herdegen, T. i Leah, J. D. (1998) **Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins.** *Brain Res Brain Res Rev* 28(3):370-490.
- Herrera, D. G. i Robertson, H. A. (1996) **Activation of c-fos in the brain.** *Prog Neurobiol* 50(2-3):83-107.

- Himmelheber, A. M., Sarter, M. i Bruno, J. P. (2000) **Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats.** *Brain Res Cogn Brain Res* 9(3):313-325.
- Himmelheber, A. M., Sarter, M. i Bruno, J. P. (2001) **The effects of manipulations of attentional demand on cortical acetylcholine release.** *Brain Res Cogn Brain Res* 12(3):353-370.
- Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q., Sergejev, V., Ubink, R. i Diez, M. (2000) **Neuropeptides--an overview.** *Neuropharmacology* 39(8):1337-1356.
- Hokfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Lindh, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Bartfai, T. i et al. (1987) **Coexistence of peptides with classical neurotransmitters.** *Experientia* 43(7):768-780.
- Holley, L. A., Turchi, J., Apple, C. i Sarter, M. (1995) **Dissociation between the attentional effects of infusions of a benzodiazepine receptor agonist and an inverse agonist into the basal forebrain.** *Psychopharmacology (Berl)* 120(1):99-108.
- Hunter, A. J. i Murray, T. K. (1989) **Cholinergic mechanisms in a simple test of olfactory learning in the rat.** *Psychopharmacology (Berl)* 99(2):270-275.
- Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M. i Saper, C. B. (1991) **Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat.** *J Comp Neurol* 308(2):249-276.

## I

- Izaki, Y., Hori, K. i Nomura, M. (2001) **Elevation of prefrontal acetylcholine is related to the extinction of learned behavior in rats.** *Neurosci Lett* 306(1-2):33-36.

## J

- Jay, T. M., Glowinski, J. i Thierry, A. M. (1989) **Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat.** *Brain Res* 505(2):337-340.
- Jimenez-Capdeville, M. E., Dykes, R. W. i Myasnikov, A. A. (1997) **Differential control of cortical activity by the basal forebrain in rats: a role for both cholinergic and inhibitory influences.** *J Comp Neurol* 381(1):53-67.
- Jinks, A. L. i McGregor, I. S. (1997) **Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat.** *Brain Res* 772(1-2):181-190.
- Joel, D., Tarrasch, R., Feldon, J. i Weiner, I. (1997a) **Effects of electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex or its subfields on 4-arm baited, 8-arm radial maze, two-way active avoidance and conditioned fear tasks in the rat.** *Brain Res* 765(1):37-50.
- Joel, D., Weiner, I. i Feldon, J. (1997b) **Electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex in rats disrupt performance on an analog of the Wisconsin Card Sorting**

**Test, but do not disrupt latent inhibition: implications for animal models of schizophrenia.** *Behav Brain Res* 85(2):187-201.

Johnston, M. V., McKinney, M. i Coyle, J. T. (1979) **Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10):5392-5396.

Jones, B. E. (2003) **Arousal systems.** *Front Biosci* 8:s438-451.

Jones, B. E. i Cuello, A. C. (1989) **Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons.** *Neuroscience* 31(1):37-61.

Jones, B. E. i Mühlethaler, M. (1999) **Cholinergic and GABAergic neurons of the basal forebrain: role in cortical activation.** *In* Handbook of Behavioral State Control. R. Lydic i H. A. Baghdoyan, editors. CRC Press, Boca Raton. 213-233.

Jones, D. M., Jones, M. E., Lewis, M. J. i Spriggs, T. L. (1979) **Drugs and human memory: effects of low doses of nitrazepam and hyoscine on retention.** *Br J Clin Pharmacol* 7(5):479-483.

## K

Kalat, J. (2001) **Biological Psychology** Belmont, CA, Wadsworth.(7th ed).

Kask, K., Langel, U. i Bartfai, T. (1995) **Galanin--a neuropeptide with inhibitory actions.** *Cell Mol Neurobiol* 15(6):653-673.

Kesner, R. P. (2000) **Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat.** *Psychobiology* 28:219-228.

Kilgard, M. P. i Merzenich, M. M. (1998) **Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity.** *Science* 279(5357):1714-1718.

Kilgard, M. P., Pandya, P. K., Vazquez, J. L., Rathbun, D. L., Engineer, N. D. i Moucha, R. (2001) **Spectral features control temporal plasticity in auditory cortex.** *Audiol Neurootol* 6(4):196-202.

Killcross, S. i Coutureau, E. (2003) **Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats.** *Cereb Cortex* 13(4):400-408.

Kishimoto, Y., Fujimichi, R., Araishi, K., Kawahara, S., Kano, M., Aiba, A. i Kirino, Y. (2002) **mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is required for normal association of temporally contiguous stimuli in classical conditioning.** *Eur J Neurosci* 16(12):2416-2424.

Kogan, J. H., Frankland, P. W., Blendy, J. A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schutz, G. i Silva, A. J. (1997) **Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice.** *Curr Biol* 7(1):1-11.

Krettek, J. E. i Price, J. L. (1977) **Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat.** *J Comp Neurol* 172(4):687-722.

Kurosawa, M., Sato, A. i Sato, Y. (1989) **Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases acetylcholine release in the cerebral cortex in rats.** *Neurosci Lett* 98(1):45-50.

## L

Lacroix, L., Broersen, L. M., Weiner, I. i Feldon, J. (1998) **The effects of excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active avoidance and locomotor activity in the rat.** *Neuroscience* 84(2):431-442.

Langlais, P. J., Connor, D. J. i Thal, L. (1993) **Comparison of the effects of single and combined neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis and dorsal noradrenergic bundle on learning and memory in the rat.** *Behav Brain Res* 54(1):81-90.

Larsen, J. K. i Divac, I. (1978) **Selective ablations within the prefrontal cortex of the rat and performance of delayed alternation.** . *Physiol Psychol* 6:15-17.

Lehmann, J., Nagy, J. I., Atmadia, S. i Fibiger, H. C. (1980) **The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat.** *Neuroscience* 5(7):1161-1174.

Lehmann, O., Grottick, A. J., Cassel, J. C. i Higgins, G. A. (2003) **A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region.** *Eur J Neurosci* 18(3):651-666.

Lerer, B., Warner, J., Friedman, E., Vincent, G. i Gamzu, E. (1985) **Cortical cholinergic impairment and behavioral deficits produced by kainic acid lesions of rat magnocellular basal forebrain.** *Behav Neurosci* 99(4):661-677.

Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E. i Shors, T. J. (2004) **Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory.** *J Neurosci* 24(34):7477-7481.

Levy, F., Richard, P., Meurisse, M. i Ravel, N. (1997) **Scopolamine impairs the ability of parturient ewes to learn to recognise their lambs.** *Psychopharmacology (Berl)* 129(1):85-90.

Li, L. i Shao, J. (1998) **Restricted lesions to ventral prefrontal subareas block reversal learning but not visual discrimination learning in rats.** *Physiol Behav* 65(2):371-379.

Linster, C., Garcia, P. A., Hasselmo, M. E. i Baxter, M. G. (2001) **Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odorants.** *Behav Neurosci* 115(4):826-833.

Lipton, P. A., Alvarez, P. i Eichenbaum, H. (1999) **Crossmodal associative memory representations in rodent orbitofrontal cortex.** *Neuron* 22(2):349-359.

- Losier, B. J. i Semba, K. (1993) **Dual projections of single cholinergic and aminergic brainstem neurons to the thalamus and basal forebrain in the rat.** *Brain Res* 604(1-2):41-52.
- Luiten, P. G., Gaykema, R. P., Traber, J. i Spencer, D. G., Jr. (1987) **Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin.** *Brain Res* 413(2):229-250.
- Lupfer-Johnson, G. i Ross, J. (2007) **Dogs acquire food preferences from interacting with recently fed conspecifics.** *Behav Processes* 74(1):104-106.
- Lupfer, G., Frieman, J. i Coonfield, D. (2003) **Social transmission of flavor preferences in two species of hamsters (*Mesocricetus auratus* and *Phodopus campbelli*).** *J Comp Psychol* 117(4):449-455.

## M

- Maalouf, M., Miasnikov, A. A. i Dykes, R. W. (1998) **Blockade of cholinergic receptors in rat barrel cortex prevents long-term changes in the evoked potential during sensory preconditioning.** *J Neurophysiol* 80(2):529-545.
- Madeira, M. D., Pereira, P. A., Silva, S. M., Cadete-Leite, A. i Paula-Barbosa, M. M. (2004) **Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus.** *Neuroscience* 125(4):889-901.
- Mandel, R. J., Chen, A. D., Connor, D. J. i Thal, L. J. (1989) **Continuous physostigmine infusion in rats with excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: effects on performance in the water maze task and cortical cholinergic markers.** *J Pharmacol Exp Ther* 251(2):612-619.
- Mandel, R. J. i Thal, L. J. (1988) **Physostigmine improves water maze performance following nucleus basalis magnocellularis lesions in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 96(3):421-425.
- Manns, I. D., Alonso, A. i Jones, B. E. (2000) **Discharge properties of juxtacellularly labeled and immunohistochemically identified cholinergic basal forebrain neurons recorded in association with the electroencephalogram in anesthetized rats.** *J Neurosci* 20(4):1505-1518.
- Manns, I. D., Alonso, A. i Jones, B. E. (2003) **Rhythmically discharging basal forebrain units comprise cholinergic, GABAergic, and putative glutamatergic cells.** *J Neurophysiol* 89(2):1057-1066.
- Manns, I. D., Mainville, L. i Jones, B. E. (2001) **Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex.** *Neuroscience* 107(2):249-263.

- Markowska, A. L., Wenk, G. L. i Olton, D. S. (1990) **Nucleus basalis magnocellularis and memory: differential effects of two neurotoxins.** *Behav Neural Biol* 54(1):13-26.
- Maruki, K., Izaki, Y., Akema, T. i Nomura, M. (2003) **Effects of acetylcholine antagonist injection into the prefrontal cortex on the progress of lever-press extinction in rats.** *Neurosci Lett* 351(2):95-98.
- Mason, J. R., Artz, A. H. i Reidinger, R. F. (1984) **Comparative assessment of food preferences and aversions acquired by blackbirds via observational learning.** *Auk* 101:796-803.
- Mayeux-Portas, V., File, S. E., Stewart, C. L. i Morris, R. J. (2000) **Mice lacking the cell adhesion molecule Thy-1 fail to use socially transmitted cues to direct their choice of food.** *Curr Biol* 10(2):68-75.
- Mayo, W., Dubois, B., Ploska, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Le Moal, M. i Simon, H. (1984) **Cortical cholinergic projections from the basal forebrain of the rat, with special reference to the prefrontal cortex innervation.** *Neurosci Lett* 47(2):149-154.
- McAlonan, K. i Brown, V. J. (2003) **Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat.** *Behav Brain Res* 146(1-2):97-103.
- McDonald, A. J. (1987) **Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex: a fluorescence retrograde transport study in the rat.** *J Comp Neurol* 262(1):46-58.
- McDonald, A. J. (1991) **Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat.** *Neuroscience* 44(1):1-14.
- McDonald, A. J. (1998) **Cortical pathways to the mammalian amygdala.** *Prog Neurobiol* 55(3):257-332.
- McDonald, A. J., Mascagni, F. i Guo, L. (1996) **Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat.** *Neuroscience* 71(1):55-75.
- McGaugh, J. L. (2002) **Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective.** *Trends Neurosci* 25(9):456.
- McGaughy, J., Dalley, J. W., Morrison, C. H., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (2002) **Selective behavioral and neurochemical effects of cholinergic lesions produced by intrabasal infusions of 192 IgG-saporin on attentional performance in a five-choice serial reaction time task.** *J Neurosci* 22(5):1905-1913.
- McGaughy, J., Everitt, B. J., Robbins, T. W. i Sarter, M. (2000) **The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins.** *Behav Brain Res* 115(2):251-263.
- McGaughy, J., Kaiser, T. i Sarter, M. (1996) **Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density.** *Behav Neurosci* 110(2):247-265.



- McGaughy, J. i Sarter, M. (1998) **Sustained attention performance in rats with intracortical infusions of 192 IgG-saporin-induced cortical cholinergic deafferentation: effects of physostigmine and FG 7142.** *Behav Neurosci* 112(6):1519-1525.
- McGeorge, A. J. i Faull, R. L. (1989) **The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat.** *Neuroscience* 29(3):503-537.
- McKinney, M. i Jacksonville, M. C. (2005) **Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease.** *Biochem Pharmacol* 70(8):1115-1124.
- McLin, D. E., 3rd, Miasnikov, A. A. i Weinberger, N. M. (2002a) **The effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on the electroencephalogram, heart rate, and respiration.** *Behav Neurosci* 116(5):795-806.
- McLin, D. E., 3rd, Miasnikov, A. A. i Weinberger, N. M. (2002b) **Induction of behavioral associative memory by stimulation of the nucleus basalis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):4002-4007.
- McLin, D. E., 3rd, Miasnikov, A. A. i Weinberger, N. M. (2003) **CS-specific gamma, theta, and alpha EEG activity detected in stimulus generalization following induction of behavioral memory by stimulation of the nucleus basalis.** *Neurobiol Learn Mem* 79(2):152-176.
- Mercado, E., Bao, S., Orduna, I., Gluck, M. A. i Merzenich, M. M. (2001) **Basal forebrain stimulation changes cortical sensitivities to complex sound.** *Neuroreport* 12(10):2283-2287.
- Mesulam, M. M. (1995a) **Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain.** *Ann N Y Acad Sci* 757:169-179.
- Mesulam, M. M. (1995b) **Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and thalamus of the human brain.** *In Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.* F. E. Bloom i D. J. Kupfer, editors. Raven Press, Ltd., New York. 135-146.
- Mesulam, M. M. (2004) **The cholinergic innervation of the human cerebral cortex.** *Prog Brain Res* 145:67-78.
- Mesulam, M. M. i Mufson, E. J. (1984) **Neural inputs into the nucleus basalis of the substantia innominata (Ch4) in the rhesus monkey.** *Brain* 107 ( Pt 1):253-274.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I. i Wainer, B. H. (1983a) **Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey.** *J Comp Neurol* 214(2):170-197.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H. i Levey, A. I. (1983b) **Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6).** *Neuroscience* 10(4):1185-1201.
- Metherate, R. i Ashe, J. H. (1991) **Basal forebrain stimulation modifies auditory cortex responsiveness by an action at muscarinic receptors.** *Brain Res* 559(1):163-167.

- Metherate, R., Cox, C. L. i Ashe, J. H. (1992) **Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine.** *J Neurosci* 12(12):4701-4711.
- Miasnikov, A. A., Chen, J. C. i Weinberger, N. M. (2006) **Rapid induction of specific associative behavioral memory by stimulation of the nucleus basalis in the rat.** *Neurobiol Learn Mem* 86(1):47-65.
- Miasnikov, A. A., McLin, D., 3rd i Weinberger, N. M. (2001) **Muscarinic dependence of nucleus basalis induced conditioned receptive field plasticity.** *Neuroreport* 12(7):1537-1542.
- Montero-Pastor, A., Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G. i Marti-Nicolovius, M. (2004) **Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention, and retrieval.** *Behav Brain Res* 154(1):41-54.
- Montero-Pastor, A., Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., Nadal-Aleman, R., Marti-Nicolovius, M. i Morgado-Bernal, I. (2001) **Nucleus basalis magnocellularis electrical stimulation facilitates two-way active avoidance retention, in rats.** *Brain Res* 900(2):337-341.
- Morecraft, R. J. i Van Hoesen, G. W. (1993) **Frontal granular cortex input to the cingulate (M3), supplementary (M2) and primary (M1) motor cortices in the rhesus monkey.** *J Comp Neurol* 337(4):669-689.
- Morgan, J. I. i Curran, T. (1991) **Proto-oncogene transcription factors and epilepsy.** *Trends Pharmacol Sci* 12(9):343-349.
- Morgan, M. A. i LeDoux, J. E. (1995) **Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats.** *Behav Neurosci* 109(4):681-688.
- Morgan, M. A., Romanski, L. M. i LeDoux, J. E. (1993) **Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex.** *Neurosci Lett* 163(1):109-113.
- Morrow, B. A., Elsworth, J. D., Rasmusson, A. M. i Roth, R. H. (1999) **The role of mesoprefrontal dopamine neurons in the acquisition and expression of conditioned fear in the rat.** *Neuroscience* 92(2):553-564.
- Moyer, J. R., Jr., Deyo, R. A. i Disterhoft, J. F. (1990) **Hippocampectomy disrupts trace eye-blink conditioning in rabbits.** *Behav Neurosci* 104(2):243-252.
- Mufson, E. J., Cochran, E., Benzing, W. i Kordower, J. H. (1993) **Galaninergic innervation of the cholinergic vertical limb of the diagonal band (Ch2) and bed nucleus of the stria terminalis in aging, Alzheimer's disease and Down's syndrome.** *Dementia* 4(5):237-250.
- Mufson, E. J., Deecher, D. C., Basile, M., Izenwasse, S. i Mash, D. C. (2000) **Galanin receptor plasticity within the nucleus basalis in early and late Alzheimer's disease: an in vitro autoradiographic analysis.** *Neuropharmacology* 39(8):1404-1412.

- Mufson, E. J., Ginsberg, S. D., Ikonovic, M. D. i DeKosky, S. T. (2003) **Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction.** *J Chem Neuroanat* 26(4):233-242.
- Muir, J. L., Dunnett, S. B., Robbins, T. W. i Everitt, B. J. (1992a) **Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task.** *Exp Brain Res* 89(3):611-622.
- Muir, J. L., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1994) **AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function.** *J Neurosci* 14(4):2313-2326.
- Muir, J. L., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1995) **Reversal of visual attentional dysfunction following lesions of the cholinergic basal forebrain by physostigmine and nicotine but not by the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ondansetron.** *Psychopharmacology (Berl)* 118(1):82-92.
- Muir, J. L., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1996) **The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task.** *Cereb Cortex* 6(3):470-481.
- Muir, J. L., Robbins, T. W. i Everitt, B. J. (1992b) **Disruptive effects of muscimol infused into the basal forebrain on conditional discrimination and visual attention: differential interactions with cholinergic mechanisms.** *Psychopharmacology (Berl)* 107(4):541-550.
- Murphy, B. L., Arnsten, A. F., Goldman-Rakic, P. S. i Roth, R. H. (1996a) **Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3):1325-1329.
- Murphy, B. L., Arnsten, A. F., Jentsch, J. D. i Roth, R. H. (1996b) **Dopamine and spatial working memory in rats and monkeys: pharmacological reversal of stress-induced impairment.** *J Neurosci* 16(23):7768-7775.
- Murray, C. L. i Fibiger, H. C. (1986) **Pilocarpine and physostigmine attenuate spatial memory impairments produced by lesions of the nucleus basalis magnocellularis.** *Behav Neurosci* 100(1):23-32.
- Murtton, R. K. (1971) **The significance of a search image in the feeding behaviour of the wood-pigeon.** *Behaviour* 40(10-43).

## N

- Nadel, L. (1991) **The hippocampus and space revisited.** *Hippocampus* 1(3):221-229.
- Nagai, T., Kimura, H., Maeda, T., McGeer, P. L., Peng, F. i McGeer, E. G. (1982) **Cholinergic projections from the basal forebrain of rat to the amygdala.** *J Neurosci* 2(4):513-520.
- Neafsey, E. J., Hurley-Gius, K. M. i Arvanitis, D. (1986) **The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to**

**the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus.** *Brain Res* 377(2):561-570.

Nieto-Escamez, F. A., Sanchez-Santed, F. i de Bruin, J. P. (2002) **Cholinergic receptor blockade in prefrontal cortex and lesions of the nucleus basalis: implications for allocentric and egocentric spatial memory in rats.** *Behav Brain Res* 134(1-2):93-112.

## O

O'Donnell, D., Ahmad, S., Wahlestedt, C. i Walker, P. (1999) **Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1.** *J Comp Neurol* 409(3):469-481.

O'Keefe, J. i Nadel, L. (1978) **The Hippocampus as a Cognitive Map.** . Clarendon Press, Oxford

Oki, T., Takagi, Y., Inagaki, S., Taketo, M. M., Manabe, T., Matsui, M. i Yamada, S. (2005) **Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice.** *Brain Res Mol Brain Res* 133(1):6-11.

Olariu, A., Cleaver, K. M., Shore, L. E., Brewer, M. D. i Cameron, H. A. (2005) **A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus.** *Hippocampus* 15(6):750-762.

Olton, D. S., Wenk, G. L., Church, R. M. i Meck, W. H. (1988) **Attention and the frontal cortex as examined by simultaneous temporal processing.** *Neuropsychologia* 26(2):307-318.

Otto, T. i Eichenbaum, H. (1992) **Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task.** *Behav Neurosci* 106(5):762-775.

## P

Page, K. J., Everitt, B. J., Robbins, T. W., Marston, H. M. i Wilkinson, L. S. (1991) **Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA- and ibotenic acid-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss.** *Neuroscience* 43(2-3):457-472.

Pandya, D. N. i Yeterian, E. H. (1990) **Prefrontal cortex in relation to other cortical areas in rhesus monkey: architecture and connections.** *Prog Brain Res* 85:63-94.

Pandya, P. K., Moucha, R., Engineer, N. D., Rathbun, D. L., Vazquez, J. i Kilgard, M. P. (2005) **Asynchronous inputs alter excitability, spike timing, and topography in primary auditory cortex.** *Hear Res* 203(1-2):10-20.

Pang, K., Williams, M. J., Egeth, H. i Olton, D. S. (1993) **Nucleus basalis magnocellularis and attention: effects of muscimol infusions.** *Behav Neurosci* 107(6):1031-1038.

- Panocka, I., Sagratella, S., Scotti de Carolis, A., Zeng, Y. C. i Amenta, F. (1995) **Microanatomical and electrophysiological changes of the rat dentate gyrus caused by lesions of the nucleus basalis magnocellularis.** *Neurosci Lett* 190(3):207-211.
- Pare, D. (2003) **Role of the basolateral amygdala in memory consolidation.** *Prog Neurobiol* 70(5):409-420.
- Passetti, F., Dalley, J. W., O'Connell, M. T., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (2000) **Increased acetylcholine release in the rat medial prefrontal cortex during performance of a visual attentional task.** *Eur J Neurosci* 12(8):3051-3058.
- Passetti, F., Dalley, J. W. i Robbins, T. W. (2003) **Double dissociation of serotonergic and dopaminergic mechanisms on attentional performance using a rodent five-choice reaction time task.** *Psychopharmacology (Berl)* 165(2):136-145.
- Paxinos, G. i Watson, C. (1997) **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, San Diego.(3rd ed.).
- Peacock, M. M. i Jenkins, S. H. (1988) **Development of food preferences: social learning by Belding's ground squirrels, *Spermophilus beldingi*.** *Behav Ecol Sociobiol* 22:393-399.
- Perio, A., Terranova, J. P., Worms, P., Bluthé, R. M., Dantzer, R. i Biziere, K. (1989) **Specific modulation of social memory in rats by cholinomimetic and nootropic drugs, by benzodiazepine inverse agonists, but not by psychostimulants.** *Psychopharmacology (Berl)* 97(2):262-268.
- Perry, E. K., Perry, R. H., Blessed, G. i Tomlinson, B. E. (1977) **Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia.** *Lancet* 1(8004):189.
- Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H. i Perry, R. H. (1978) **Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia.** *Br Med J* 2(6150):1457-1459.
- Petersen, R. C. (1977) **Scopolamine induced learning failures in man.** *Psychopharmacology (Berl)* 52(3):283-289.
- Petruilis, A. i Eichenbaum, H. (2003) **Olfactory memory.** In Handbook of olfaction and gustation. R. L. Doty, editor. Marcel Dekker, New York. 409-438.
- Popovic, M., Jovanova-Nesic, K., Popovic, N., Bokonjic, D., Dobric, S., Rosic, N. i Rakic, L. (1996) **Behavioral and adaptive status in an experimental model of Alzheimer's disease in rats.** *Int J Neurosci* 86(3-4):281-299.
- Posadas-Andrews, A. i Roper, T. J. (1983) **Social transmission of food-preferences in adult rats.** *Animal Behaviour* 31:265-271.
- Power, A. E. i McGaugh, J. L. (2002) **Cholinergic activation of the basolateral amygdala regulates unlearned freezing behavior in rats.** *Behav Brain Res* 134(1-2):307-315.
- Price, J. L., Carmichael, T., Carnes, K. W., Clugnet, M., Kuroda, M. i Ray, J. P. (1991) **Olfactory input to the prefrontal cortex** In Olfaction as a model for computational neuroscience. J. Davis i H. Eichenbaum, editors. MIT, Cambridge, MA. 101-120.

## Q

Quiroz-Padilla, M. F., Guillazo-Blanch, G., Vale-Martinez, A. i Marti-Nicolovius, M. (2006) **Excitotoxic lesions of the parafascicular nucleus produce deficits in a socially transmitted food preference.** *Neurobiol Learn Mem.*

## R

Radyushkin, K., Anokhin, K., Meyer, B. I., Jiang, Q., Alvarez-Bolado, G. i Gruss, P. (2005) **Genetic ablation of the mammillary bodies in the Foxb1 mutant mouse leads to selective deficit of spatial working memory.** *Eur J Neurosci* 21(1):219-229.

Ragozzino, M. E. (2000) **The contribution of cholinergic and dopaminergic afferents in the rat prefrontal cortex to learning, memory and attention.** *Psychobiology* 28:238-247.

Ragozzino, M. E. (2002) **The effects of dopamine D(1) receptor blockade in the prelimbic-infralimbic areas on behavioral flexibility.** *Learn Mem* 9(1):18-28.

Ragozzino, M. E., Adams, S. i Kesner, R. P. (1998) **Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory.** *Behav Neurosci* 112(2):293-303.

Ragozzino, M. E., Detrick, S. i Kesner, R. P. (1999a) **Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning.** *J Neurosci* 19(11):4585-4594.

Ragozzino, M. E. i Kesner, R. P. (1998) **The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and Prelimbic/Infralimbic cortices on spatial working memory.** *Neurobiol Learn Mem* 69(3):241-257.

Ragozzino, M. E., Kim, J., Hassert, D., Minniti, N. i Kiang, C. (2003) **The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching.** *Behav Neurosci* 117(5):1054-1065.

Ragozzino, M. E., Wilcox, C., Raso, M. i Kesner, R. P. (1999b) **Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching.** *Behav Neurosci* 113(1):32-41.

Rampon, C. i Tsien, J. Z. (2000) **Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity.** *Hippocampus* 10(5):605-609.

Rasmusson, D. D. (2000) **The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity.** *Behav Brain Res* 115(2):205-218.

Rasmusson, D. D., Clow, K. i Szerb, J. C. (1994) **Modification of neocortical acetylcholine release and electroencephalogram desynchronization due to brainstem stimulation by drugs applied to the basal forebrain.** *Neuroscience* 60(3):665-677.

- Ravel, N., Elaagouby, A. i Gervais, R. (1994) **Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats.** *Behav Neurosci* 108(2):317-324.
- Ravel, N., Vigouroux, M., Elaagouby, A. i Gervais, R. (1992) **Scopolamine impairs delayed matching in an olfactory task in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 109(4):439-443.
- Ray, J. P. i Price, J. L. (1992) **The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography.** *J Comp Neurol* 323(2):167-197.
- Recanzone, G. H., Merzenich, M. M., Jenkins, W. M., Grajski, K. A. i Dinse, H. R. (1992) **Topographic reorganization of the hand representation in cortical area 3b owl monkeys trained in a frequency-discrimination task.** *J Neurophysiol* 67(5):1031-1056.
- Recanzone, G. H., Schreiner, C. E. i Merzenich, M. M. (1993) **Plasticity in the frequency representation of primary auditory cortex following discrimination training in adult owl monkeys.** *J Neurosci* 13(1):87-103.
- Reep, R. L., Corwin, J. V., Hashimoto, A. i Watson, R. T. (1987) **Efferent connections of the rostral portion of medial agranular cortex in rats.** *Brain Res Bull* 19(2):203-221.
- Reep, R. L. i Winans, S. S. (1982) **Efferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, *Mesocricetus auratus*.** *Neuroscience* 7(11):2609-2635.
- Reiner, P. B. i Fibiger, H. C. (1995) **Functional heterogeneity of central cholinergic systems.** In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. F. E. Bloom i D. J. Kupfer, editors. Raven Press, Ltd., New York. 147-153.
- Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O. i Pongs, O. (1994) **Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit.** *Nature* 369(6478):289-294.
- Ricceri, L., Minghetti, L., Moles, A., Popoli, P., Confaloni, A., De Simone, R., Piscopo, P., Scattoni, M. L., di Luca, M. i Calamandrei, G. (2004) **Cognitive and neurological deficits induced by early and prolonged basal forebrain cholinergic hypofunction in rats.** *Exp Neurol* 189(1):162-172.
- Richardson, R. T. i DeLong, M. R. (1988) **A reappraisal of the functions of the nucleus basalis of Meynert.** *Trends Neurosci* 11(6):264-267.
- Ridley, R. M., Baker, H. F., Drewett, B. i Johnson, J. A. (1985) **Effects of ibotenic acid lesions of the basal forebrain on serial reversal learning in marmosets.** *Psychopharmacology (Berl)* 86(4):438-443.
- Ridley, R. M., Baker, H. F., Leow-Dyke, A. i Cummings, R. M. (2005) **Further analysis of the effects of immunotoxic lesions of the basal nucleus of Meynert reveals substantial impairment on visual discrimination learning in monkeys.** *Brain Res Bull* 65(5):433-442.

- Ridley, R. M., Barefoot, H. C., Maclean, C. J., Pugh, P. i Baker, H. F. (1999) **Different effects on learning ability after injection of the cholinergic immunotoxin ME20.4IgG-saporin into the diagonal band of Broca, basal nucleus of Meynert, or both in monkeys.** *Behav Neurosci* 113(2):303-315.
- Riekkinen, M., Riekkinen, P. i Riekkinen, P., Jr. (1991) **Comparison of quisqualic and ibotenic acid nucleus basalis magnocellularis lesions on water-maze and passive avoidance performance.** *Brain Res Bull* 27(1):119-123.
- Riekkinen, P., Jr., Sirvio, J., Jakala, P., Lammintausta, R. i Riekkinen, P. (1990a) **Effect of alpha2 antagonists and an agonist on EEG slowing induced by scopolamine and lesion of the nucleus basalis.** *Neuropharmacology* 29(11):993-999.
- Riekkinen, P., Jr., Sirvio, J. i Riekkinen, P. (1990b) **Similar memory impairments found in medial septal-vertical diagonal band of Broca and nucleus basalis lesioned rats: are memory defects induced by nucleus basalis lesions related to the degree of non-specific subcortical cell loss?** *Behav Brain Res* 37(1):81-88.
- Risbrough, V., Bontempi, B. i Menzaghi, F. (2002) **Selective immunolesioning of the basal forebrain cholinergic neurons in rats: effect on attention using the 5-choice serial reaction time task.** *Psychopharmacology (Berl)* 164(1):71-81.
- Robbins, T. W. (2002) **The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry.** *Psychopharmacology (Berl)* 163(3-4):362-380.
- Robbins, T. W., Everitt, B. J., Marston, H. M., Wilkinson, J., Jones, G. H. i Page, K. J. (1989) **Comparative effects of ibotenic acid- and quisqualic acid-induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes.** *Behav Brain Res* 35(3):221-240.
- Roberts, M. i Shapiro, M. (2002) **NMDA receptor antagonists impair memory for nonspatial, socially transmitted food preference.** *Behav Neurosci* 116(6):1059-1069.
- Rolls, E. T. (1997) **Taste and olfactory processing in the brain and its relation to the control of eating.** *Crit Rev Neurobiol* 11(4):263-287.
- Room, P., Russchen, F. T., Groenewegen, H. J. i Lohman, A. H. (1985) **Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat.** *J Comp Neurol* 242(1):40-55.
- Rose, J. i Woolsey, C. (1948) **The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat.** *Res Publ Assoc Nerv Ment Dis* 27:210-232.
- Ross, R. S. i Eichenbaum, H. (2006) **Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory.** *J Neurosci* 26(18):4852-4859.
- Ross, R. S., McGaughy, J. i Eichenbaum, H. (2005) **Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference.** *Learn Mem* 12(3):302-306.



- Roullet, F., Lienard, F., Datiche, F. i Cattarelli, M. (2005) **Fos protein expression in olfactory-related brain areas after learning and after reactivation of a slowly acquired olfactory discrimination task in the rat.** *Learn Mem* 12(3):307-317.
- Ruiz-Opazo, N., Lopez, L. V. i Tonkiss, J. (2004) **Modulation of learning and memory in Dahl rats by dietary salt restriction.** *Hypertension* 43(4):797-802.
- Rustay, N. R., Wrenn, C. C., Kinney, J. W., Holmes, A., Bailey, K. R., Sullivan, T. L., Harris, A. P., Long, K. C., Saavedra, M. C., Starosta, G., Innerfield, C. E., Yang, R. J., Dreiling, J. L. i Crawley, J. N. (2005) **Galanin impairs performance on learning and memory tasks: findings from galanin transgenic and GAL-R1 knockout mice.** *Neuropeptides* 39(3):239-243.

## S

- Saar, D., Grossman, Y. i Barkai, E. (2001) **Long-lasting cholinergic modulation underlies rule learning in rats.** *J Neurosci* 21(4):1385-1392.
- Sabbatini, M., Bronzetti, E., Felici, L., Fringuelli, C., Sagratella, S. i Amenta, F. (1999) **NADPH-diaphorase histochemistry in the rat cerebral cortex and hippocampus: effect of electrolytic lesions of the nucleus basalis magnocellularis.** *Mech Ageing Dev* 107(2):147-157.
- Sachdev, R. N., Lu, S. M., Wiley, R. G. i Ebner, F. F. (1998) **Role of the basal forebrain cholinergic projection in somatosensory cortical plasticity.** *J Neurophysiol* 79(6):3216-3228.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R. i Curran, T. (1988) **Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level.** *Science* 240(4857):1328-1331.
- Sanchez-Andrade, G., James, B. M. i Kendrick, K. M. (2005) **Neural encoding of olfactory recognition memory.** *J Reprod Dev* 51(5):547-558.
- Santucci, A. C. i Haroutunian, V. (1989) **Nucleus basalis lesions impair memory in rats trained on nonspatial and spatial discrimination tasks.** *Physiol Behav* 45(5):1025-1031.
- Saper, C. B. (1984) **Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus.** *J Comp Neurol* 222(3):313-342.
- Saper, C. B. (1985) **Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections.** *J Comp Neurol* 237(1):21-46.
- Sarter, M. i Bruno, J. P. (1997) **Trans-synaptic stimulation of cortical acetylcholine and enhancement of attentional functions: a rational approach for the development of cognition enhancers.** *Behav Brain Res* 83(1-2):7-14.
- Sarter, M. i Bruno, J. P. (2000) **Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents.** *Neuroscience* 95(4):933-952.

- Sarter, M. i Bruno, J. P. (2002) **The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections.** *Eur J Neurosci* 15(12):1867-1873.
- Sarter, M., Bruno, J. P. i Givens, B. (2003) **Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory?** *Neurobiol Learn Mem* 80(3):245-256.
- Sarter, M., Gehring, W. J. i Kozak, R. (2006) **More attention must be paid: the neurobiology of attentional effort.** *Brain Res Brain Res Rev* 51(2):145-160.
- Sarter, M., Givens, B. i Bruno, J. P. (2001) **The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up.** *Brain Res Brain Res Rev* 35(2):146-160.
- Satoh, K. i Fibiger, H. C. (1986) **Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections.** *J Comp Neurol* 253(3):277-302.
- Schacter, D. L. i Tulving, E. (1994) **What are the memory systems of 1994?** M. M. P. Cambridge, editor
- Schroder, H., Zilles, K., Luiten, P. G. i Strosberg, A. D. (1990) **Immunocytochemical visualization of muscarinic cholinergic receptors in the human cerebral cortex.** *Brain Res* 514(2):249-258.
- Schroder, H., Zilles, K., Luiten, P. G., Strosberg, A. D. i Aghchi, A. (1989) **Human cortical neurons contain both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors: an immunocytochemical double-labeling study.** *Synapse* 4(4):319-326.
- Seamans, J. K., Floresco, S. B. i Phillips, A. G. (1995) **Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex.** *Behav Neurosci* 109(6):1063-1073.
- Seamans, J. K., Floresco, S. B. i Phillips, A. G. (1998) **D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat.** *J Neurosci* 18(4):1613-1621.
- Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomeza, J., Basile, A. S., Alzheimer, C. i Wess, J. (2004) **M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity.** *J Neurosci* 24(45):10117-10127.
- Semba, K. (2000) **Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance.** *Behav Brain Res* 115(2):117-141.
- Semba, K. i Fibiger, H. C. (1989) **Organization of central cholinergic systems.** *Prog Brain Res* 79:37-63.
- Semba, K. i Fibiger, H. C. (1992) **Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study.** *J Comp Neurol* 323(3):387-410.
- Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H. i Bunney, B. S. (1989) **Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin.** *J Comp Neurol* 290(2):213-242.

- Shallice, T. i Burgess, P. W. (1991) **Deficits in strategy application following frontal lobe damage in man.** *Brain* 114 ( Pt 2):727-741.
- Sienkiewicz-Jarosz, H., Czlonkowska, A. I., Siemiakowski, M., Maciejak, P., Szyndler, J. i Plaznik, A. (2000) **The effects of physostigmine and cholinergic receptor ligands on novelty-induced neophobia.** *J Neural Transm* 107(12):1403-1412.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. i Wojtowicz, J. M. (2005) **A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory.** *Neuroscience* 130(4):843-852.
- Solomon, N. G., Yeager, C. S. i Beeler, L. A. (2002) **Social transmission and memory of food preferences in pine voles (*Microtus pinetorum*).** *J Comp Psychol* 116(1):35-38.
- Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R. i Buhl, E. H. (1998) **Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex.** *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3):113-135.
- Sos-Hinojosa, H., Guillazo-Blanch, G., Vale-Martinez, A., Nadal, R., Morgado-Bernal, I. i Marti-Nicolovius, M. (2003) **Parafascicular electrical stimulation attenuates nucleus basalis magnocellularis lesion-induced active avoidance retention deficit.** *Behav Brain Res* 144(1-2):37-48.
- Squire, L. R. (1992) **Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans.** *Psychol Rev* 99(2):195-231.
- Squire, L. R. (1993) **The hippocampus and spatial memory.** *Trends Neurosci* 16(2):56-57.
- Steckler, T., Andrews, J. S., Marten, P. i Turner, J. D. (1993) **Effects of NBM lesions with two neurotoxins on spatial memory and autoshaping.** *Pharmacol Biochem Behav* 44(4):877-889.
- Steiner, R. A., Hohmann, J. G., Holmes, A., Wrenn, C. C., Cadd, G., Jureus, A., Clifton, D. K., Luo, M., Gutshall, M., Ma, S. Y., Mufson, E. J. i Crawley, J. N. (2001) **Galanin transgenic mice display cognitive and neurochemical deficits characteristic of Alzheimer's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):4184-4189.
- Steininger, T. L., Rye, D. B. i Wainer, B. H. (1992) **Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies.** *J Comp Neurol* 321(4):515-543.
- Steriade, M. (2000) **Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation.** *Neuroscience* 101(2):243-276.
- Strupp, B. J., Bunsey, M., Bertsche, B., Levitsky, D. A. i Kesler, M. (1990) **Enhancement and impairment of memory retrieval by a vasopressin metabolite: an interaction with the accessibility of the memory.** *Behav Neurosci* 104(2):268-276.
- Sutherland, R. J. i Rudy, J. W. (1989) **Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia.** *Psychobiology* 17:129-144.

Swanson, L. W. (1981) **A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat.** *Brain Res* 217(1):150-154.

Sziklas, V. i Petrides, M. (1993) **Memory impairments following lesions to the mammillary region of the rat.** *Eur J Neurosci* 5(5):525-540.

Szymusiak, R. (1995) **Magnocellular nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation.** *Sleep* 18(6):478-500.

Szymusiak, R., Alam, N. i McGinty, D. (2000) **Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep.** *Behav Brain Res* 115(2):171-182.

## T

Tonkiss, J. i Rawlins, J. N. (1992) **Mammillary body lesions and restricted subicular output lesions produce long-lasting DRL performance impairments in rats.** *Exp Brain Res* 90(3):572-582.

Torres, E. M., Perry, T. A., Blockland, A., Wilkinson, L. S., Wiley, R. G., Lappi, D. A. i Dunnet, S. B. (1994) **Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system.** *Neuroscience* 63(1):95-122.

Tronel, S., Feenstra, M. G. i Sara, S. J. (2004) **Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation.** *Learn Mem* 11(4):453-458.

Tronel, S. i Sara, S. J. (2002) **Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval.** *Learn Mem* 9(3):105-111.

Tronel, S. i Sara, S. J. (2003) **Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning.** *J Neurosci* 23(13):5472-5476.

Turchi, J. i Sarter, M. (1997) **Cortical acetylcholine and processing capacity: effects of cortical cholinergic deafferentation on crossmodal divided attention in rats.** *Brain Res Cogn Brain Res* 6(2):147-158.

Turchi, J. i Sarter, M. (2001) **Bidirectional modulation of basal forebrain N-methyl-D-aspartate receptor function differentially affects visual attention but not visual discrimination performance.** *Neuroscience* 104(2):407-417.

## U

Uylings, H. B. i van Eden, C. G. (1990) **Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans.** *Prog Brain Res* 85:31-62.

## V

- Vale-Martinez, A., Baxter, M. G. i Eichenbaum, H. (2002a) **Selective lesions of basal forebrain cholinergic neurons produce anterograde and retrograde deficits in a social transmission of food preference task in rats.** *Eur J Neurosci* 16(6):983-998.
- Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., Marti-Nicolovius, M., Nadal, R., Arevalo-Garcia, R. i Morgado-Bernal, I. (2002b) **Electrolytic and ibotenic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis interrupt long-term retention, but not acquisition of two-way active avoidance, in rats.** *Exp Brain Res* 142(1):52-66.
- Valsecchi, P., Choleris, E., Moles, A., Guo, C. i Mainardi, M. (1996) **Kinship and familiarity as factors affecting social transfer of food preferences in adult Mongolian gerbils.** *J Comp Psychol* 110:243-251.
- Valsecchi, P. i Galef, B. G., Jr. (1989) **Social influences on the food preferences of house mice (*Mus musculus*).** *Int J Comp Psychol* 2:245-256.
- Van der Werf, Y. D., Jolles, J., Witter, M. P. i Uylings, H. B. (2003) **Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning.** *Cortex* 39(4-5):1047-1062.
- Van Eden, C. G. i Buijs, R. M. (2000) **Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions.** *Prog Brain Res* 126:49-62.
- Van Eden, C. G., Lamme, V. A. i Uylings, H. B. (1992) **Heterotopic Cortical Afferents to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. A Combined Retrograde and Anterograde Tracer Study.** *Eur J Neurosci* 4(1):77-97.
- van Haaren, F., De Bruin, J. P., Heinsbroek, R. P. i Van de Poll, N. E. (1985) **Delayed spatial response alternation: effects of delay-interval duration and lesions of the medial prefrontal cortex on response accuracy of male and female Wistar rats.** *Behav Brain Res* 18(1):41-49.
- Verdier, D. i Dykes, R. W. (2001) **Long-term cholinergic enhancement of evoked potentials in rat hindlimb somatosensory cortex displays characteristics of long-term potentiation.** *Exp Brain Res* 137(1):71-82.
- Vertes, R. P. (2002) **Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens.** *J Comp Neurol* 442(2):163-187.
- Vertes, R. P. (2004) **Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat.** *Synapse* 51(1):32-58.
- Vician, L., Lim, I. K., Ferguson, G., Tocco, G., Baudry, M. i Herschman, H. R. (1995) **Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6):2164-2168.

## W

- Wainer, B. H. i Mesulam, M. M. (1990) **Ascending cholinergic pathways in rat brain.** *In* Brain Cholinergic Systems M. Steriade i D. Biesold, editors. ed. Oxford Univ. Press, Oxford. 65-119.

- Waite, J. J. i Thal, L. J. (1996) **Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin.** *Life Sci* 58(22):1947-1953.
- Waite, J. J., Wardlow, M. L. i Power, A. E. (1999) **Deficit in selective and divided attention associated with cholinergic basal forebrain immunotoxic lesion produced by 192-saporin; motoric/sensory deficit associated with Purkinje cell immunotoxic lesion produced by OX7-saporin.** *Neurobiol Learn Mem* 71(3):325-352.
- Wang, Y., Fontanini, A. i Katz, D. B. (2006) **Temporary basolateral amygdala lesions disrupt acquisition of socially transmitted food preferences in rats.** *Learn Mem* 13(6):794-800.
- Ward, N. L. i Hagg, T. (2000) **BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo.** *Exp Neurol* 162(2):297-310.
- Weinberger, N. M. (2003) **The nucleus basalis and memory codes: auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory.** *Neurobiol Learn Mem* 80(3):268-284.
- Weinberger, N. M. (2004) **Specific long-term memory traces in primary auditory cortex.** *Nat Rev Neurosci* 5(4):279-290.
- Weinberger, N. M. i Bakin, J. S. (1998) **Learning-induced physiological memory in adult primary auditory cortex: receptive fields plasticity, model, and mechanisms.** *Audiol Neurootol* 3(2-3):145-167.
- Wenk, G. L. (1997) **The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress.** *Neurobiol Learn Mem* 67(2):85-95.
- Wenk, G. L., Harrington, C. A., Tucker, D. A., Rance, N. E. i Walker, L. C. (1992) **Basal forebrain neurons and memory: a biochemical, histological, and behavioral study of differential vulnerability to ibotenate and quisqualate.** *Behav Neurosci* 106(6):909-923.
- Wenk, G. L., Markowska, A. L. i Olton, D. S. (1989) **Basal forebrain lesions and memory: alterations in neurotensin, not acetylcholine, may cause amnesia.** *Behav Neurosci* 103(4):765-769.
- Wenk, G. L., Stoehr, J. D., Quintana, G., Mobley, S. i Wiley, R. G. (1994) **Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192 IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats.** *J Neurosci* 14(10):5986-5995.
- Wenk, H., Bigl, V. i Meyer, U. (1980) **Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats.** *Brain Res* 2(3):295-316.
- Wesnes, K. i Warburton, D. M. (1983) **Effects of scopolamine on stimulus sensitivity and response bias in a visual vigilance task.** *Neuropsychobiology* 9(2-3):154-157.
- Wesnes, K. i Warburton, D. M. (1984) **Effects of scopolamine and nicotine on human rapid information processing performance.** *Psychopharmacology (Berl)* 82(3):147-150.

- Whishaw, I. Q., Tomie, J. A. i Kolb, B. (1992) **Ventrolateral prefrontal cortex lesions in rats impair the acquisition and retention of a tactile-olfactory configural task.** *Behav Neurosci* 106(4):597-603.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T. i Delon, M. R. (1982) **Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain.** *Science* 215(4537):1237-1239.
- Wiley, R. G., Oeltmann, T. N. i Lappi, D. A. (1991) **Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor.** *Brain Res* 562(1):149-153.
- Wilkinson, L. S., Humby, T., Killcross, A. S., Torres, E. M., Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (1998) **Dissociations in dopamine release in medial prefrontal cortex and ventral striatum during the acquisition and extinction of classical aversive conditioning in the rat.** *Eur J Neurosci* 10(3):1019-1026.
- Wilson, W. J. i Cook, J. A. (1995) **Perseverative errors and reversal of a visual discrimination following basal forebrain lesions in the rat.** *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 55(4):295-299.
- Williams, M. J., Mohler, E. G. i Givens, B. (1999) **The role of the medial prefrontal cortex in attention: Altering predictability of task difficulty.** *Psychobiology* 27(4):462-469.
- Winocur, G. (1990) **Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions.** *Behav Brain Res* 38(2):145-154.
- Winocur, G., McDonald, R. M. i Moscovitch, M. (2001) **Anterograde and retrograde amnesia in rats with large hippocampal lesions.** *Hippocampus* 11(1):18-26.
- Winocur, G. i Moscovitch, M. (1999) **Anterograde and retrograde amnesia after lesions to frontal cortex in rats.** *J Neurosci* 19(21):9611-9617.
- Winslow, J. T. i Camacho, F. (1995) **Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice.** *Psychopharmacology (Berl)* 121(2):164-172.
- Wood, H. i de Belleruche, J. (1991) **Induction of c-fos mRNA in cerebral cortex by excitotoxin stimulation of cortical inputs: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors.** *Brain Res* 545(1-2):183-190.
- Woolf, N. J. (1991) **Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord.** *Prog Neurobiol* 37(6):475-524.
- Woolf, N. J. i Butcher, L. L. (1982) **Cholinergic projections to the basolateral amygdala: a combined Evans Blue and acetylcholinesterase analysis.** *Brain Res Bull* 8(6):751-763.
- Woolf, N. J. i Butcher, L. L. (1986) **Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain.** *Brain Res Bull* 16(5):603-637.

- Woolf, N. J., Eckenstein, F. i Butcher, L. L. (1983) **Cholinergic projections from the basal forebrain to the frontal cortex: a combined fluorescent tracer and immunohistochemical analysis in the rat.** *Neurosci Lett* 40(2):93-98.
- Works, S. J., Wilson, R. E. i Wellman, C. L. (2004) **Age-dependent effect of cholinergic lesion on dendritic morphology in rat frontal cortex.** *Neurobiol Aging* 25(7):963-974.
- Wrenn, C. C., Harris, A. P., Saavedra, M. C. i Crawley, J. N. (2003) **Social transmission of food preference in mice: methodology and application to galanin-overexpressing transgenic mice.** *Behav Neurosci* 117(1):21-31.
- Wrenn, C. C., Kinney, J. W., Marriott, L. K., Holmes, A., Harris, A. P., Saavedra, M. C., Starosta, G., Innerfield, C. E., Jacoby, A. S., Shine, J., Iismaa, T. P., Wenk, G. L. i Crawley, J. N. (2004) **Learning and memory performance in mice lacking the GAL-R1 subtype of galanin receptor.** *Eur J Neurosci* 19(5):1384-1396.
- Wrenn, C. C., Marriott, L. K., Kinney, J. W., Holmes, A., Wenk, G. L. i Crawley, J. N. (2002) **Galanin peptide levels in hippocampus and cortex of galanin-overexpressing transgenic mice evaluated for cognitive performance.** *Neuropeptides* 36(6):413-426.
- Wrenn, C. C. i Wiley, R. G. (2001) **Lack of effect of moderate Purkinje cell loss on working memory.** *Neuroscience* 107(3):433-445.

## Z

- Zaborszky, L., Cullinan, W. E. i Braun, A. (1991) **Afferents to basal forebrain cholinergic projection neurons: an update.** *Adv Exp Med Biol* 295:43-100.
- Zaborszky, L. i Duque, A. (2000) **Local synaptic connections of basal forebrain neurons.** *Behav Brain Res* 115(2):143-158.
- Zaborszky, L., Gaykema, R. P., Swanson, D. J. i Cullinan, W. E. (1997) **Cortical input to the basal forebrain.** *Neuroscience* 79(4):1051-1078.
- Zaborszky, L., Pang, K., Somogyi, J., Nadasdy, Z. i Kallo, I. (1999) **The basal forebrain corticopetal system revisited.** *Ann N Y Acad Sci* 877:339-367.
- Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G. i Arnsten, A. F. (1997) **Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance.** *J Neurosci* 17(21):8528-8535.
- Zhang, Y., Hakes, J. J., Bonfield, S. P. i Yan, J. (2005) **Corticofugal feedback for auditory midbrain plasticity elicited by tones and electrical stimulation of basal forebrain in mice.** *Eur J Neurosci* 22(4):871-879.



Arribats a aquest punt, només em queda agrair-vos a tots els que heu fet possible la realització d'aquesta tesi l'ajuda que he rebut al llarg de tot aquest temps. La tesi presentada ha estat molt més que un seguit d'experiments i resultats, i heu estat molts els que cada dia heu fet que hagi valgut la pena haver començat aquest viatge. Per això, només volia donar-vos les gràcies a tots vosaltres, tant els que des de dins com des de fora del laboratori, heu fet que avui hagi arribat fins aquí. Als qui ja no els hi puc agrair, em quedo amb el record de les bones estones i els moments compartits.

També voldria donar les gràcies de manera especial ...

A les meves directores,  
la Dra. Anna Vale Martínez i  
la Dra. Margarita Martí Nicolovius,  
per la seva ajuda i dedicació constant.

*Quan surts per fer  
el viatge cap a Ítaca  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.  
Has de pregar que el camí sigui llarg,  
que siguin moltes les matinades  
que entraràs en un port  
que els teus ulls ignoraven,  
i vagis a ciutats  
per aprendre dels que saben.*

*Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.  
Has d'arribar-hi, és el teu destí,  
però no forcis gens la travessia.  
És preferible que duri molt anys,  
que siguis vell quan fondegis la illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí  
sense esperar que el doni més riqueses.*

*Ítaca t'ha donat el bell viatge,  
sense ella no hauries sortit.  
I si la trobes pobre, no és que Ítaca  
t'hagi enganyat.  
Savi, com bé t'has fet,  
sabràs el què volen dir les Ítaques.*

**Konstandinos Kavafis**