

## **Efecto de la Administración Crónica de Cafeína, bajo un Modelo de Estrés Crónico Variable, en el Aprendizaje y la Recuperación de una Tarea Espacial**

### *Effect of Chronic Administration of Caffeine, under a Variable Chronic Stress Model, in Learning and Recovery of a Space Task*

Edgard Mesa, María Teresa Salas & Aneska Ossandón<sup>1</sup>

Se ha planteado que el aprendizaje está relacionado de manera interdependiente con el proceso de la memoria en tanto que para que dicho aprendizaje sea reproducido con posterioridad debe haber sido almacenado previamente. Sin embargo, diversos factores afectan de manera positiva y/o negativa el aprendizaje, entre estos factores encontramos la cafeína y el estrés respectivamente. Para evaluar de qué manera influye la administración crónica de cafeína, bajo un modelo de estrés crónico variable, sobre la adquisición y la recuperación del aprendizaje de una tarea espacial; se utilizaron 40 ratas machos entrenadas en el laberinto circular de Barnes. El entrenamiento consistió de 8 ensayos de adquisición (intervalo entre ensayos, IEE, de 5 minutos) en donde los animales debían aprender a encontrar una caja meta, ubicada en uno de los 18 agujeros del laberinto. Los resultados sugieren que la administración crónica de cafeína (55 mg/kg) influye positivamente en la recuperación de la memoria espacial, más no en la adquisición. Sin embargo, el estrés no parece afectar significativamente el proceso de aprendizaje y memoria.

Palabras clave: aprendizaje, estrés, cafeína, tarea espacial

*It has been suggested that learning is related interdependently with the process of memory; since for learning to be reproduced later on, it had to be stored before. However, various factors affect learning in a positive and/or negative manner, such as caffeine and stress respectively. We used 40 male rats trained in the Barnes circular maze to assess the influence of chronic administration of caffeine, under a variable chronic stress model, on the acquisition and retrieval of learning in a spatial task. The training consisted of 8 acquisition trials (interval between trials, IEE, 5 min) in which the animals learned to find a goal box, located in one of the 18 holes of the labyrinth. The results suggest that chronic administration of caffeine (55 mg / kg) has a positive impact on retrieval of spatial memory, but not in the acquisition. Stress does not appear to significantly affect the process of learning and memory.*

*Keywords: learning, stress, caffeine, spatial task*

---

Recepción del artículo: 05 de diciembre de 2013. Aprobación del artículo 28 de diciembre de 2012

<sup>1</sup> Profesores de Química y Ciencias, Universidad de Playa Ancha de Ciencias de la Educación. Correos electrónicos: edgard.mesa@gmail.com; teresa.salas@gmail.com; ane.ossandon@gmail.com

Este proyecto contó con el apoyo del Fondo para Tesis de Pre y Posgrado 2011, de la Dirección General de Investigación de la Universidad de Playa Ancha.

El aprendizaje y la memoria han sido un permanente reto a la investigación en fisiología, neurología, psicología y en general a todas las disciplinas que tienen que ver con el ser humano. El aprendizaje ha sido definido como un proceso en el cual los seres vivos modifican su conducta para adaptarse al entorno. Estas experiencias se traducen en cambios sobre el sistema nervioso central que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos (Morgado, 2005+). Se ha planteado que el aprendizaje está relacionado de manera interdependiente con el proceso de la memoria, en tanto que para que dicho aprendizaje sea reproducido con posterioridad debe haber sido almacenado previamente. Sin embargo, diversos factores afectan de manera positiva y negativa el proceso de aprendizaje, entre estos factores encontramos la cafeína y el estrés respectivamente.

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es considerada el psicoestimulante activo más consumido en el mundo (Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig, & Zvartau, 1999+) y está presente en diversas plantas, las cuales se usan en la preparación de bebidas estimulantes como té, cocoa y café. El mecanismo de acción de la cafeína se caracteriza básicamente porque sus efectos ocurren primeramente a nivel cerebral, donde un factor clave para entender los efectos producidos luego de una ingesta de dosis de cafeína son los receptores de adenosina. La adenosina es un nucleósido de purina ubicuo que se forma a partir del adenosin trifosfato (ATP), participa como inhibidor general del sistema nervioso que produce sedación, relajación y ansiolisis en el SNC (Fontinha y cols., 2009+). Entre otros efectos sobre el organismo (vasodilatación coronaria, relajación de la musculatura lisa gastrointestinal, etc.). Hasta hoy se reconocen cuatro tipos de receptores de adenosina, distribuido ampliamente por el organismo: A1, A2a, A2b y A3, con una localización específica para cada uno. Debido a que la adenosina posee una mayor afinidad a los receptores A1 y A2a la mayoría de las acciones farmacológicas se deben a estos receptores, siendo la participación de A2b y A3 cuantitativamente despreciable (Moratalla, 2008+).

Las metilxantinas actúan como antagonistas competitivos de los receptores de adenosina. Esto produce una inhibición de la fosfodiesterasa que da lugar a un aumento de las concentraciones de AMPc y de GMPc, una activación de canales de K<sup>+</sup> y una inhibición de los canales de calcio de tipo N. En cerebro los receptores de adenosina inhiben la liberación de numerosos neurotransmisores (GABA, acetilcolina, dopamina, glutamato, noradrenalina y serotonina), la cafeína producirá el efecto contrario.

El estrés por su parte afecta negativamente el proceso de aprendizaje y memoria. Cuando un sujeto se encuentra en una situación estresante, se disparan los niveles de cortisol y corticosterona, en humanos y mamíferos, como ratas respectivamente, generando la consecuente disminución de espinas dendríticas en la región CA3. Esto ha quedado explícitamente demostrado cuando se han realizado investigaciones en que se administra la hormona reguladora del estrés (corticosterona) ocasionando el mismo efecto (McEwen, 1999+). Por otro lado, cuando se ha establecido los efectos del estrés crónico sobre la neurogénesis, tanto en animales como en personas, se advierte que existe baja proliferación celular en el giro dentado. Más detalladamente, se ha observado mediante tomografía por resonancia magnética, que existe una reducción del volumen total de la formación hipocampal (10%); esto en animales (ratas específicamente) sometidas a estrés mediante modelo de estrés psicosocial (Alfonso, 2005+). Siendo el estrés una condición que afecta las conexiones sinápticas, se asume que debiese tener repercusiones en la memoria, ya que cuando se aplican modelos para medir aprendizaje (como por ejemplo laberinto espacial de Barnes) se obtienen resultados concretos donde se puede observar que existe una disminución en el aprendizaje y la memoria (Troncoso, Lamprea, Cuestas, & Múnera, 2010+) resultados que han sido corroborados por otros investigadores, quienes han demostrado un bloqueo en la inducción de LTP en el área CA1, no así de LTD aumentándola en esta zona (Foy, Stanton, Levine & Thompson, 1987+). En tanto en el área CA3, el estrés produce una retracción de las dendritas apicales en las neuronas piramidales (Alfonso, 2005+). Los efectos adversos del estrés sobre el aprendizaje se cree que son mediados principalmente por los receptores de baja afinidad (de glucocorticoides) en el hipocampo, los cuales son ocupados por las hormonas adrenales que se encuentran en altas concentraciones en situaciones de estrés. En presencia de cafeína los efectos adversos del estrés se potencian, ya que el estrés crónico causa una disminución de receptores A1 de adenosina y un aumento en los receptores A2A de adenosina de las terminaciones nerviosas del hipocampo, inhibiendo el papel que cumple la cafeína.

Son muchas las investigaciones que relacionan la cafeína y el estrés, sin embargo los resultados de esas investigaciones varían de acuerdo a las diferentes manipulaciones experimentales. Algunos estudios sugieren que las acciones psicoestimulantes de la cafeína se ven afectadas por el estrés (Meyer & Caston, 2004+).

Tanto la administración de cafeína cómo la exposición a condiciones de estrés, son capaces de aumentar los niveles de excitación del SNC, en consecuencia la liberación de varios

neurotransmisores, tales como la noradrenalina y adenosina, donde ambos desempeñan un papel importante en la modulación de la liberación sináptica (Boulenger, Marangos, Zander, & Hanson, 1986+; Lane, 1983+).

La hipótesis de que la cafeína puede intensificar la respuesta al estrés es la planteada por el trabajo de Henry y Stephens (1979+). Ellos demostraron que la sustitución del café por el agua potable aumentó considerablemente las tasas de enfermedades y mortalidad en los ratones que viven enjaulados en grandes comunidades, donde la tensión y la típica interacción competitiva condujeron a patologías cardiovasculares y renales.

Otros estudios han demostrado que la administración de dosis dependiente de cafeína puede mitigar muchos de los efectos adversos que se originan producto de la exposición a múltiples factores estresantes (Lieberman, Tharion, Shukitt, Speckman, & Tulley, 2002+). Otras investigaciones señalan que el estrés, actúa como antagonista del papel inhibitorio de la cafeína, referente al comportamiento exploratorio, potenciando de la misma forma su acción sobre la desinhibición del comportamiento (Meyer & Caston, 2004+). Esto puede deberse a que el estrés crónico causa una disminución en la densidad de receptores de adenosina A1, acompañados por un marcado aumento de la densidad de receptores A2A de las terminaciones nerviosas del hipocampo (Cunha, Canas, Oliveira & Cunha, 2006+).

El objetivo de esta investigación fue determinar de qué manera influye la administración crónica de cafeína sobre la adquisición y la recuperación del aprendizaje de una tarea espacial en roedores de la cepa Sprague dawley sometidas a un modelo de estrés crónico variable.

## **Método**

### **Animales**

Se utilizaron 40 ratas jóvenes, machos de la cepa Sprague dawley con un peso aproximado de 250-350 gramos, y aproximadamente 3 meses de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Luego de ser recibidos, los animales fueron trasladados a las instalaciones del laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas Universidad de Playa Ancha, alojados en cajas de policarbonato, en grupos de tres o cuatro animales. Durante la experimentación, los animales se mantuvieron en una habitación especialmente diseñada con un

ciclo de 12 horas de luz- oscuridad y temperatura constante a  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , proporcionándoles alimentos y agua ad libitum. Tanto los procedimientos y manipulaciones experimentales se encuentran regidos bajo los Marcos en Ética de la Investigación Científica con Seres Vivos (Arias y cols., 2007+), propuestos por el Comité asesor de Bioética de CONICYT.

Los 40 animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos experimentales:

- Grupo 1: (n=10) Grupo control al cual no se le aplicó ningún tipo de fármaco o tratamiento, solo una dosis de solución salina intraperitoneal (i.p.).
- Grupo 2: (n=10) Grupo estrés - sin cafeína, donde se encuentran animales que son sometidos a estrés crónico variable, sin tratamiento de dosis de cafeína.
- Grupo 3: (n=10) Grupo estrés - cafeína, conformado por animales que son sometidos a modelo de estrés crónico variable y además tratados con dosis de cafeína.
- Grupo 4: (n=10) Grupo sin estrés - cafeína conformado por animales que no son sometidos a estrés crónico variable pero tratados con dosis de cafeína.

### **Tratamiento Farmacológico**

Los animales fueron sometidos a los siguientes tratamientos; (a) control-control, solución salina (NaCl 0,9%), como vehículo; (b) control-cafeína, (Merck), administrada por vía intraperitoneal (i.p.), en una solución salina (NaCl 0,9%), en dosis de 55 mg/Kg/día; (c) estrés-control; aplicación de estrés crónico variable y solución salina (NaCl 0,9%); (d) estrés-cafeína; aplicación de estrés crónico variable y cafeína (Merck), administrada por vía intraperitoneal (i.p.), en una solución salina (NaCl 0,9%), en dosis de 55 mg/Kg/día. La aplicación de estrés crónico variable implicó un tratamiento de 10 días de exposición.

### **Entrenamiento y Evaluación de la Tarea de Memoria Espacial**

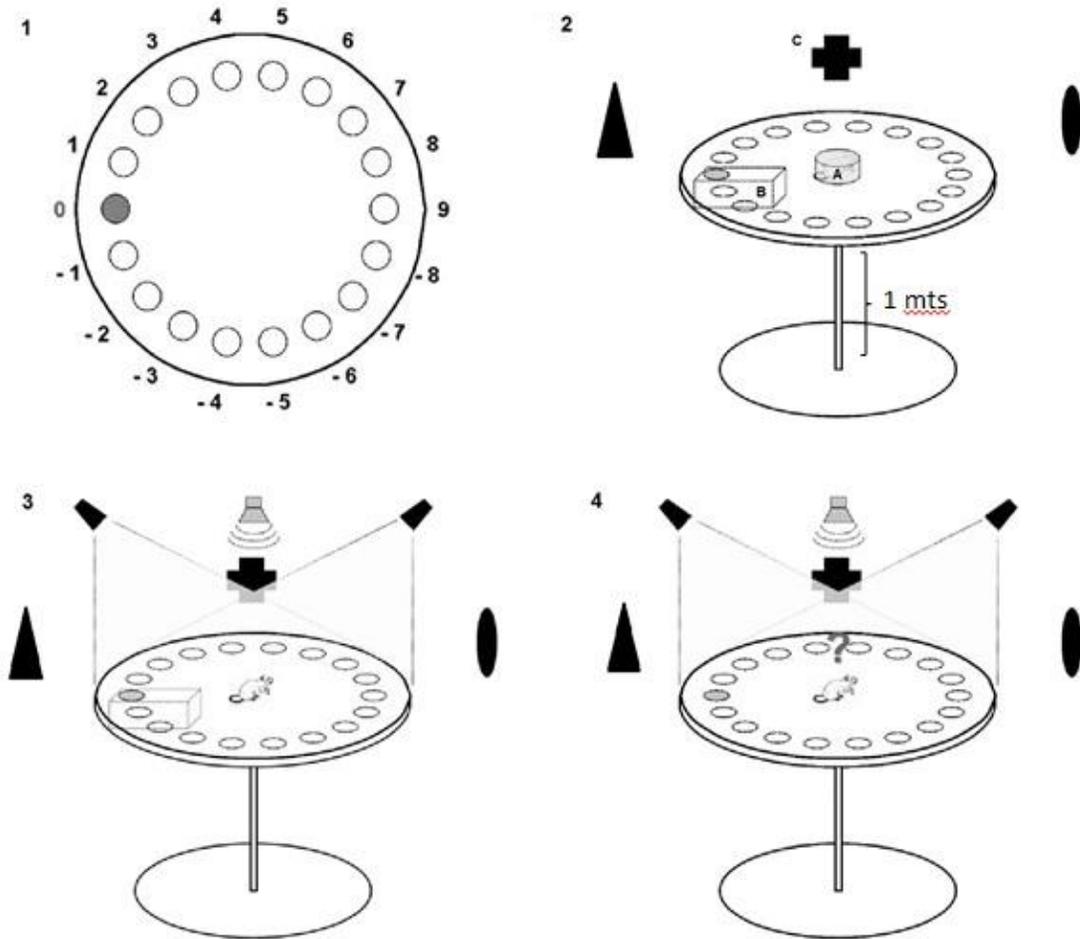
Para la evaluación de la memoria espacial, se utilizó el Laberinto circular de Barnes (Claro, Gamba, Múnera & Lamprea, 2009+). Éste consiste en una plataforma negra circular de acrílico (120 cm de diámetro) elevada a un metro del suelo, con 20 orificios de escape en periferia. Sólo uno de los orificios está comunicado con una caja de escape o caja meta. En el centro de éste se encuentra un cilindro o caja de inicio o salida cuyo objetivo es introducir cuidadosamente al animal para dar inicio a la prueba.

El laberinto se encuentra ubicado en una sala aislada de experimentación, iluminada por una luz roja de 60 W y dos focos reflectores de 150 W ubicadas a dos metros del suelo. El laberinto está basado en la tendencia natural de los roedores a buscar espacios oscuros y cerrados. Los animales deben aprender, mediante claves espaciales externas al laberinto (señales visuales), fijadas en las paredes durante la etapa de experimentación, que no cambian a lo largo del entrenamiento y han sido sugeridos como pistas contextuales que ayudan en la orientación de los animales.

El entrenamiento de Barnes fue dividido en tres fases:

1. **Habitación.** Esta fase consiste en una sesión de habitación al laberinto y a la sala de experimentación, la cual es realizada entre las 10:00 y las 10:30 de la mañana. La realización de la sesión es la siguiente: a) el sujeto es introducido en la caja meta no instalada en el laberinto durante dos minutos al cabo de los cuales se devuelve a la caja de consolidación por un minuto, b) el animal es introducido de nuevo en la caja meta, esta vez instalada en el laberinto por un período de dos minutos, al cabo de los cuales es llevado a la caja de consolidación por un minuto, c) finalmente el animal se introduce en la caja de salida o inicio durante dos minutos.
2. **Adquisición del aprendizaje.** Posterior a la fase de habitación (24 horas), se ejecutó la fase de adquisición, la cual consiste en realizar ocho ensayos (E1-E8) con un intervalo de 5 minutos entre cada uno de ellos. El inicio del ensayo, consistió en introducir el animal durante 30 segundos en la cámara cilíndrica (caja de salida), ubicada en el centro del laberinto. Al cabo de este tiempo, se retira la caja de salida, encendiendo simultáneamente la luz y la fuente de sonido (ruido blanco de 90 dB), de esta forma se permite la exploración del animal libremente por la plataforma por cuatro minutos, hasta que el animal se introduzca en la caja meta (las tres cuartas partes anteriores de su cuerpo), si el animal no se introduce a la caja meta por sí mismo, el experimentador debe guiarlo gentilmente hasta llegar a su destino. Se mantendrá en la caja meta por un período de un minuto para luego ser traslado a la caja de consolidación (caja hogar).
3. **Recuperación.** Posteriormente, veinticuatro horas después de la última sesión de entrenamiento, se llevó a cabo el período de prueba del aprendizaje. En esta fase se realizaron dos ensayos idénticos a la sesión de adquisición: el primer ensayo consiste en una prueba con caja, cuyo objetivo es evaluar la ejecución de la tarea espacial; el segundo

ensayo consiste en una prueba sin caja meta y evalúa si el sujeto retiene la ubicación espacial de la caja (indicado por la persistencia en la exploración del agujero meta) consistente en un ensayo de cuatro minutos.



*Figura 1.* Laberinto circular de Barnes, versión modificada de Troncoso y cols. (2010+). [1] Perspectiva superior del laberinto en la cual se puede observar la disposición de 18 orificios del laberinto (0 a -17). El agujero que se presenta de color gris oscuro, corresponde al agujero meta (agujero 0), en cuya parte inferior se encuentra dispuesta una caja de escape, también conocida como caja meta. [2] En el centro del laberinto se ubica una caja de salida (A), donde los animales son ubicados antes de realizar los ensayos de la sesión de adquisición, enumerados del 1 al 8 (E1 a E8) y el primer ensayo de la sesión de evaluación del aprendizaje (prueba con caja, PCC). La sala de experimentación dispone de claves visuales extra-laberínticas (cruz, triángulo, círculo y cuadrado) (C). [3] Cuando se comienza a realizar los ensayos de adquisición (E1 a E8) y la prueba con caja (PCC), la caja de salida ubicada al centro del laberinto se levanta, coincidiendo al mismo

tiempo con el encendido de luces y fuente de sonido, los cuales se encuentran dispuestos en el techo de la sala de experimentación. [4] En el instante de realizar el segundo ensayo de evaluación de aprendizaje (prueba sin caja, PSC) es evaluada la retención del aprendizaje espacial con la retirada de la caja meta.

### **Variables Evaluadas**

En la etapa de adquisición del aprendizaje se observó: (a) latencia de escape, tiempo en segundos que emplea el animal para encontrar la caja meta, (b) errores de agujero, correspondiente al número de exploraciones por medio de golpes de la nariz o de deflexiones de la cabeza en agujeros diferentes al agujero meta o en éste sin ingresar y (c) distancia recorrida, distancia relativa en centímetros entre la exploración de áreas, periferia y agujeros.

En la prueba con caja se estimaron los mismos parámetros que en la adquisición. Para la prueba sin caja, se midió la siguiente variable: (a) latencia de exploración del agujero meta y (b) porcentaje de frecuencia de exploración del agujero meta y de los otros agujeros en relación con su posición con respecto al meta.

### **Modelo de Estrés**

El estrés crónico variable (ECV) fue adaptado de un modelo de estrés variable (Espinosa, 2010+), pero con algunas modificaciones. Los animales se dividieron en dos grupos: grupo estresado y grupo no estresado, con una duración de 10 días para ambos grupos de experimentación. La experiencia comenzó con el grupo de animales estresados. Al finalizar este período se inició la experimentación con el grupo de animales no estresados. Para el grupo de animales estresados se usó un ciclo de 10 días de estrés variable. Los estímulos estresantes individuales y el tiempo en que estos eran aplicados cada día se han descrito en la Tabla 1.

En resumen estos estímulos estresantes fueron: (a) 24h de privación de alimentos, (b) 24h de privación de agua, (c) 1,5h de inmovilización, (d) 24h de aislamiento, (e) natación forzada durante 5 minutos, (f) hacinamiento durante la noche, (g) estímulo footshock. La aplicación del estrés empezó en diferentes momentos cada día de la mañana de acuerdo al ciclo circadiano de secreción de corticosterona, de forma aleatoria con el propósito de evitar su predicción. La inmovilización se indujo mediante la restricción de movimientos. De acuerdo con el ciclo circadiano de secreción de corticosterona, la inducción de estrés de cada animal se programó de modo tal que empezara después de las 7:00 a.m. y finalizara antes de las 11:30 a.m. Aislada de la

sala de experimentación, cada animal fue introducido con las medidas pertinentes de manipulación en un cilindro de PVC (base: 6 cm, altura: 20 cm). Este presenta dos bases laterales, las cuales están tapadas con perforaciones. Dentro de este cilindro el animal puede respirar y mover sus extremidades, pero no puede girar sobre su eje dorso-ventral. Cada animal permaneció durante un período de una hora y media dentro del cilindro con su eje mayor dispuesto horizontalmente. La natación forzada se llevó a cabo colocando al animal en un tanque de cristal de 44 x 33 x 30 cm con 22 cm de profundidad de agua a una temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 5 minutos por cada animal. Para el tratamiento de footshock, se acondicionó una jaula, la cual en su superficie se aplicó una corriente de 25 voltios a través de una red electrificada de choques alternos. La exposición del estímulo fue controlada con precisión, por un tiempo de 6 minutos separados por intervalos de 2 minutos por cada animal de experimentación. Finalmente, el peso corporal de los animales se midió al comienzo y al final del tratamiento como un parámetro indirecto de activación del eje HPA. Asimismo se determinó el peso de las glándulas suprarrenales una vez que los animales fueron perfundidos.

Tabla 1. *Estímulos utilizados durante el tratamiento de ECV, durante la mañana entre las 8:00 y las 12:00 horas.*

| Día de tratamiento | Estímulo estresante       | Duración |
|--------------------|---------------------------|----------|
| 1                  | Aislamiento               | 24 hrs   |
| 2                  | Privación de agua         | 24 hrs   |
| 3                  | Footshock                 | 6 min    |
| 4                  | Nado forzado              | 5 min    |
| 5                  | Hacinamiento              | 24 hrs   |
| 6                  | Aislamiento               | 24 hrs   |
| 7                  | Privación de agua         | 24 hrs   |
| 8                  | Restricción de movimiento | 1:30 hrs |
| 9                  | Privación de alimentos    | 24 hrs   |
| 10                 | Footshock                 | 6 min    |

### **Análisis Estadísticos**

Todos los datos obtenidos fueron traspasados a un software de hoja de cálculo (Microsoft Excel 2010) y procesados por GraphPad Prism Software.

## Diseño experimental

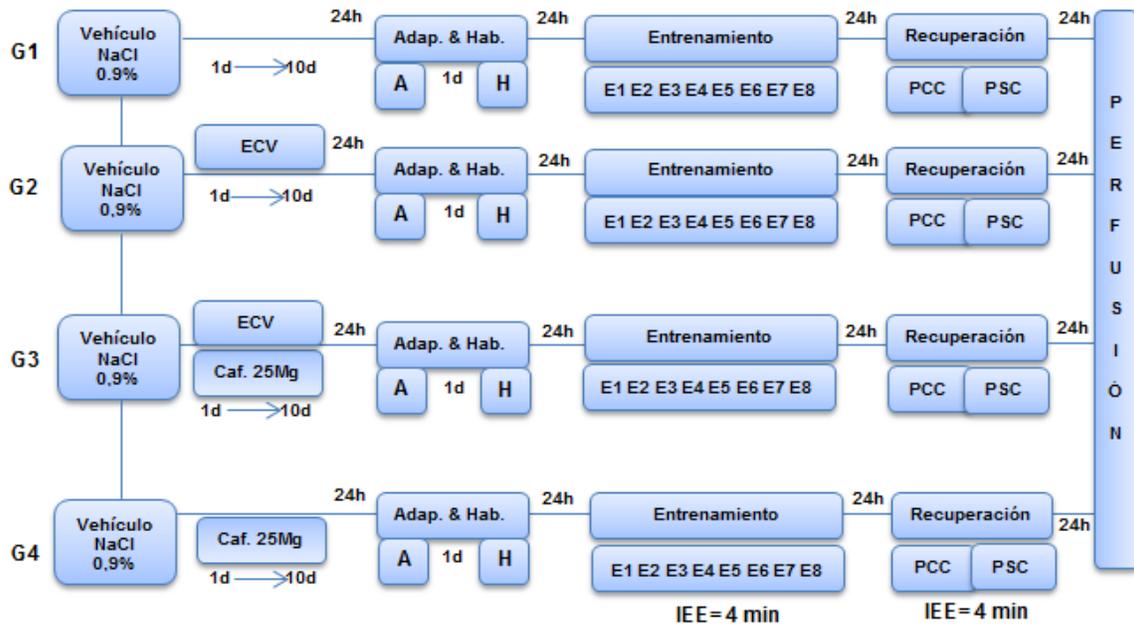


Figura 2. Diseño experimental. Grupos experimentales (G1-G4). Abreviaturas: ECV= Estrés Crónico Variable; Adap. & Hab.= Adaptación y Habitación; E1-E8= ensayos de entrenamiento del 1 al 8; PCC= Prueba con caja; PSC= Prueba sin caja; IEE= Intervalo entre ensayos.

## Resultados

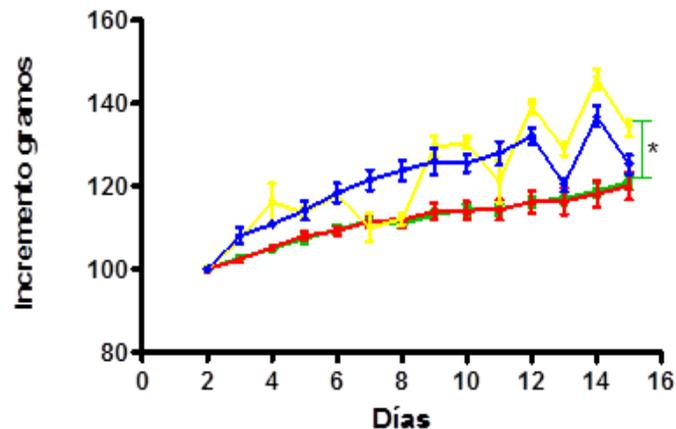
### Determinación de parámetros fisiológicos relacionados con el estrés crónico

La literatura señala que los sujetos que son expuestos a situaciones de estrés crónico, presentan cambios fisiológicos y/o conductuales; la efectividad de los modelos de estrés dependerá de estos cambios provocados en el animal. De hecho, la validez de un modelo se mide según éste reproduzca en los animales, fenómenos observados en los seres humanos. En este trabajo se utilizaron dos parámetros importantes para determinar estos cambios.

### Cambios Fisiológicos en el Peso Corporal

Los cuatro grupos de animales fueron manipulados y pesados en un período de 5 días previo a los tratamientos de estrés e inyección, de esta manera comprobar que el crecimiento entre ellos fuese homogéneo y que la manipulación diaria no fuese un elemento que alterase este parámetro.

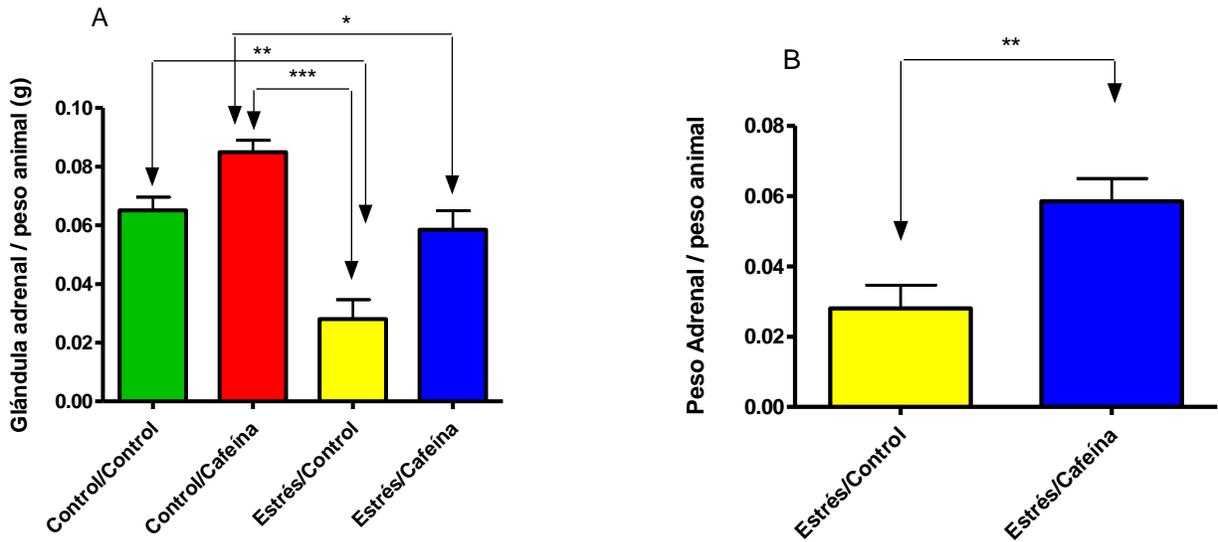
Para determinar variaciones en la ganancia de pesos en los animales previos a los tratamientos, se determinó inicialmente la pendiente de la curva de crecimiento porcentual al peso de inicio. El análisis indicó que todos los animales presentaron una curva de ganancia de peso similar durante el período de evaluación (día 1 al día 4) (Figura 1). Después del período de manipulación y pesaje, los animales fueron sometidos al tratamiento farmacológico y de estrés crónico variable por un período de 10 días en los cuales se continuaba con el registro de pesos.



*Figura 3.* Ganancia en peso corporal previo y durante los tratamientos. En verde el grupo Control-control, en amarillo el grupo Estrés-Control, en azul el grupo Estrés-Cafeína y en rojo el grupo Control-Cafeína. A) La gráfica muestra la variación en las pendientes de las curvas de crecimiento de los cuatro grupos experimentales. El análisis comparativo ANOVA entre los grupos por los diferentes tratamientos arroja diferencias significativas entre el grupo control/control y control/estrés ( $p < 0.005$ ).

### **Peso de las Glándulas Adrenales**

Ya se ha planteado que el estrés crónico variable produce una alteración del eje HPA, generando con esto un aumento en los niveles de secreción de glucocorticoides y por ende un aumento en el peso de la glándula adrenal. La Figura 2 A muestra diferencias significativas entre los grupos control/cafeína y estrés/control ( $p < 0.0001$ ); control/control y estrés/control ( $p < 0.001$ ) y control/cafeína y estrés/cafeína ( $p < 0.05$ ). Si comparamos el peso de las glándulas adrenales por grupos y aplicamos una prueba t-student (Figura 2 B) arroja diferencias significativas entre el grupo iii, estrés/control y el grupo iv, estrés/cafeína ( $P = 0.0076$ ).



*Figura 4.* Pesos estandarizados de las glándulas adrenales. Serie experimental agrupada de la siguiente manera; i) control-control; solución salina (NaCl 0,9%), como vehículo; ii) control-cafeína, (i.p.), en una solución salina (NaCl 0,9%), en dosis de 55 mg/Kg/día; iii) Estrés-control; aplicación de ECV y solución salina (NaCl 0,9%); iv) Estrés-cafeína; aplicación de ECV y cafeína, (i.p.), en una solución salina (NaCl 0,9%), en dosis de 55 mg/Kg/día. A) La gráfica muestra diferencias significativas entre los grupos i y iii; ii y iii; ii y iv. Análisis ANOVA. B). Análisis t-test, para el peso de las glándulas adrenales. Los datos muestran diferencias significativas entre los grupos iii (estrés/control) y iv (estrés/cafeína) ( $P=0.076$ ) ó ( $p<0,05$ ).

### Adquisición y Prueba con Caja

La Figura 5 A muestra la latencia de llegada al agujero meta (tiempo que emplea el animal en encontrar la caja meta) durante los 8 ensayos de entrenamiento y la prueba con caja realizada 24 horas después del último ensayo de adquisición. Un análisis de varianza para los cuatro grupos, no mostró diferencias significativas en el tiempo empleado para encontrar la caja meta ( $F=0,6339$ ;  $P=0,5986$ ). En relación a la latencia de llegada para los grupos control/control y control/cafeína ( $P=0.207$ ), en un análisis estadísticos t-test, se aprecia diferencias significativas para ambos grupos, donde la administración de cafeína aumenta la latencia de llegada (Figura 5 A1).

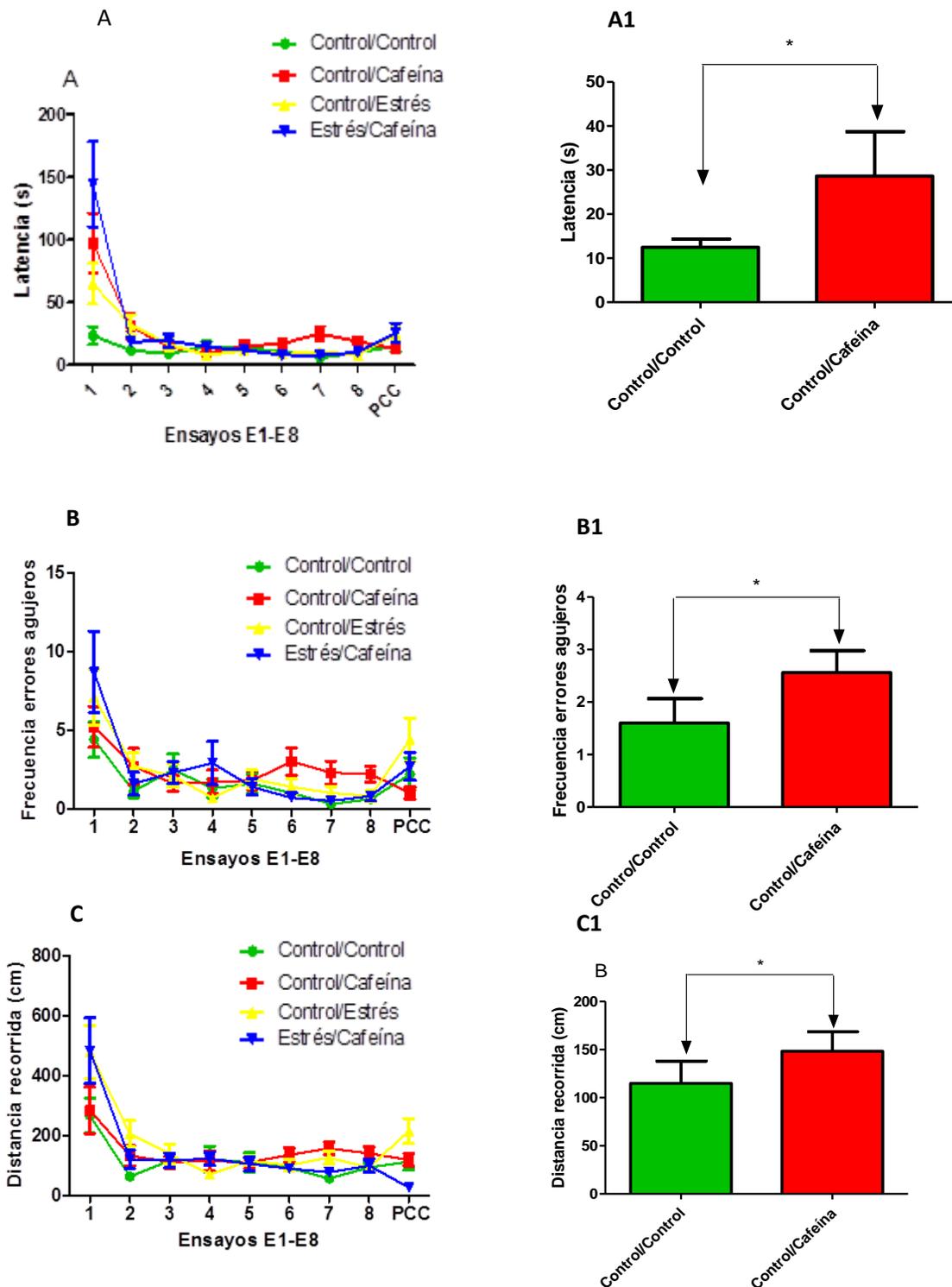


Figura 5. Evolución temporal de la latencia, errores de agujero, distancia y velocidad del recorrido durante la sesión de adquisición y primer ensayo de la sesión de evaluación o prueba con caja (PCC). A. Latencia de llegada al agujero meta a lo largo de los ocho ensayos de

adquisición (1 a 8) y la prueba de recuperación con caja (PCC), A1 Latencia de llegada, prueba t-test, promedio ( $\pm$ SEM) de la latencia de llegada al agujero meta. B. Errores ponderados a lo largo de los ocho ensayos de adquisición (1 a 8) y la PCC. B1 Frecuencia errores de agujero, prueba t-test, promedio ( $\pm$ SEM) de la frecuencia de errores de agujeros C. Distancia recorrida a lo largo de los ocho ensayos de adquisición (1 a 8). C1 Distancia recorrida (cm), prueba t-test, promedio ( $\pm$ SEM) de la distancia recorrida en centímetros.

La Figura 5 B muestra la frecuencia de errores de agujero (número de exploraciones por medio de golpes de la nariz o de deflexiones de la cabeza en agujeros diferentes al agujero meta o en éste sin ingresar) en la fase de adquisición y en la prueba con caja (PCC). La Figura 5 B1 muestra diferencias significativas para los grupos control/control y control/cafeína ( $P=0.0458$ ), en un análisis estadísticos t-test para ambos grupos.

La Figura 5 C muestra la distancia recorrida (distancia relativa en centímetros entre la exploración de áreas, periferia y agujeros) de los animales en la prueba conductual, laberinto circular de Barnes. El ANOVA no arroja diferencias significativas para los grupos si se analizan en conjunto la totalidad de los ensayos ( $F= 0,4984$   $P= 0,6860$ ). Un análisis comparativo t-test para los grupos control/control y control/cafeína (Figura 5 C1) muestra diferencias significativas para ambos grupos ( $P=0.0499$ ).

### **Evaluación (Prueba sin Caja)**

Segundo ensayo de evaluación, cuando la caja meta fue retirada del laberinto. Los análisis de ANOVA y las comparaciones post Hoc no muestran diferencias significativas para los cuatro grupos (Figura 6A). Sin embargo al aplicar un análisis comparativo t-test, sí arroja diferencias significativas entre los grupos control/control y control/cafeína (Figura 6B).

La Figura 7 muestra el porcentaje de frecuencia de exploración del agujero meta y de los otros agujeros en relación con su posición con respecto al meta. El análisis Two Way ANOVA muestra diferencias significativas. Las comparaciones post hoc indican diferencias significativas entre la exploración del agujero meta y agujeros opuestos.

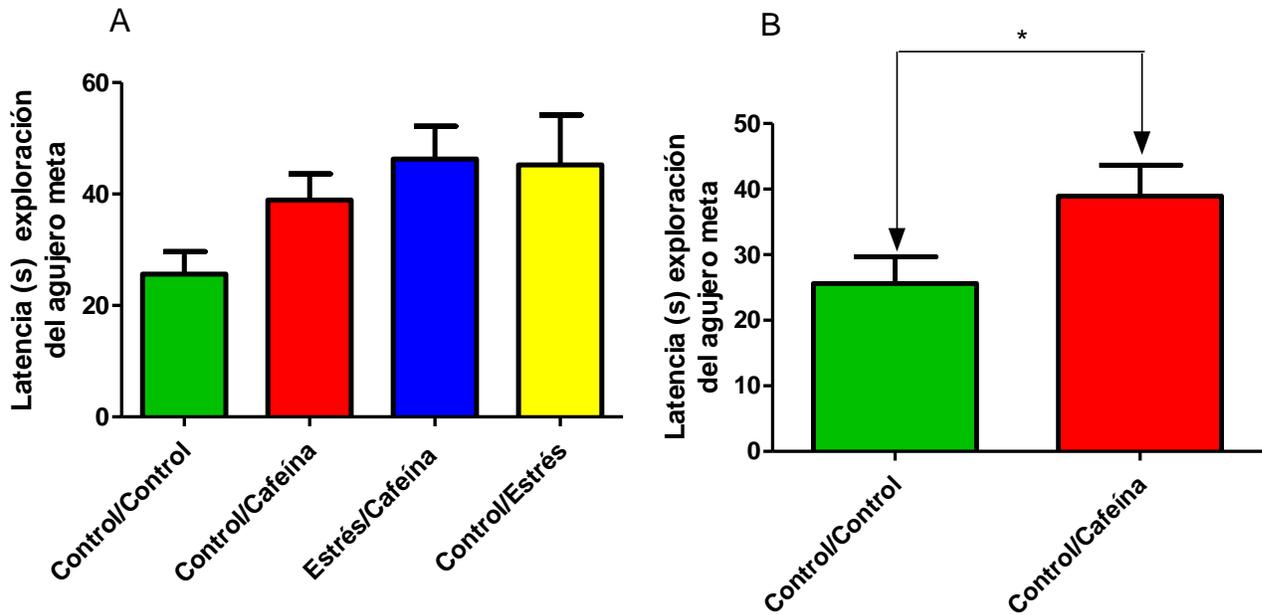


Figura 6. Latencia (s) PSC, ANOVA y t-test. A) Promedio ( $\pm$ SEM) de la latencia de exploración del agujero meta durante la fase de evaluación. El análisis estadístico ANOVA, no muestra diferencias significativas entre los grupos B) Una prueba t-test realizada para los grupos control/control y control/cafeína demuestra que sí existe diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ).

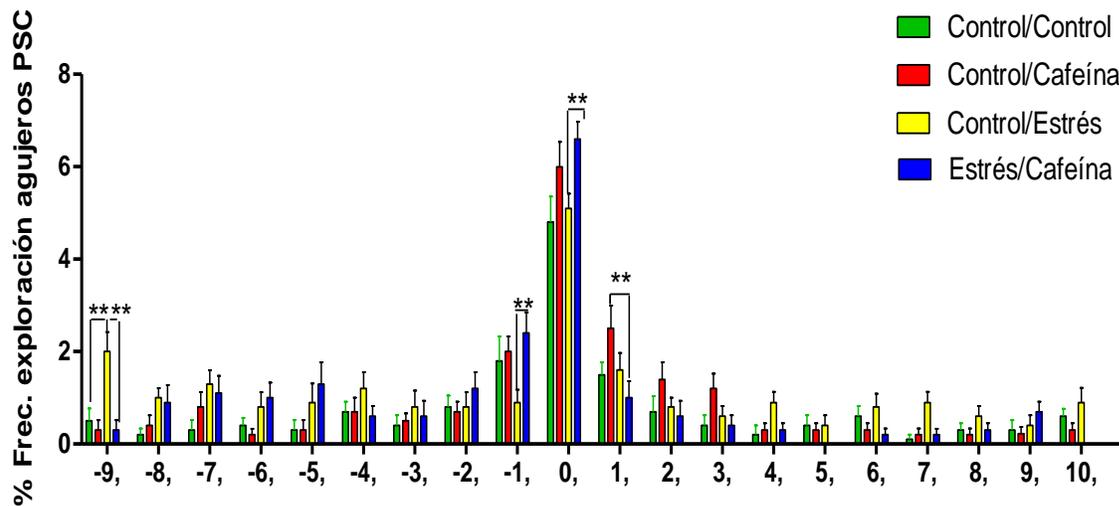


Figura 7.- Porcentaje de frecuencia de exploración agujeros PSC. Promedio ( $\pm$  SEM) del porcentaje de exploración de cada agujero durante la prueba sin caja. 0 corresponde al agujero meta en la fase de entrenamiento. La prueba Two Way ANOVA arroja diferencias significativas en los agujeros: -9 entre los grupos Control/control y Control/Estrés ( $p < 0.01$ ); Control/Estrés y

Estrés/Cafeína ( $p < 0.01$ ), -1 entre los grupos Control/Estrés y Estrés/Cafeína ( $p < 0.01$ ), 0 entre los grupos Control/Estrés y Estrés/Cafeína, 1 entre los grupos Control/Cafeína y Estrés/Cafeína.

## Discusión

### Parámetros Fisiológicos

La disminución de peso corporal constituye la mayoría de las veces un parámetro confiable para determinar si existe la presencia de estrés (Espinosa, 2010+). Los datos analizados en nuestra investigación muestran claramente que los animales sometidos a estrés tendieron a variar su peso corporal siendo más irregulares que los animales control, quienes mantuvieron su peso uniforme o bien lo aumentaron con el transcurso de los días. Se puede evidenciar una diferencia significativa entre el grupo control/control y control/estrés ( $p < 0.005$ ). Este fenómeno se podría presentar debido a que los efectos del estrés sobre el peso corporal son determinados por la severidad del estrés y por la percepción del individuo al estrés, ya que animales bajo estrés poco severos incrementan el consumo de alimento, mientras que estresores más severos, tales como restricción o inmovilización, inhiben el consumo de alimento y tienen efectos de larga duración sobre el peso corporal y comportamiento (Oropeza, 2007+).

Cuando se realiza un análisis comparativo de los 4 grupos experimentales respecto al peso de sus glándulas adrenales se puede observar que hubo diferencias significativas entre ellas. Dichas diferencias son más significantes entre el grupo estrés/control y estrés/cafeína ( $P = 0.076$ ). Estas observaciones pueden ser de vital importancia, ya que pueden constituir un referente importante acerca del comportamiento de los animales en la ejecución de tareas en el laberinto de Barnes. Cuando un animal se encuentra sometido bajo condiciones estresantes lo que se lograría esperar es un aumento de peso de dichas glándulas, debido a que existe una hiperactivación constante del eje HPA, por lo tanto existen concentraciones elevadas de hormonas de la corteza y la médula adrenal, aumento de peso de las glándulas adrenales y actividad gonadal reducida (Alfonso, 2005+).

Sin embargo en esta investigación se obtuvo el fenómeno contrario, es decir, los pesos de las glándulas adrenales de los grupos bajo condiciones de estrés (estrés/control y estrés/cafeína) fueron evidentemente más bajos. Esta situación se debe a que el estrés promueve un aumento en

la secreción de glucocorticoides, lo que podría, aunque no en todos los casos, inducir una hipertrofia de la glándula adrenal, que es la productora de esta hormona (Arancibia, 2010+).

### **Efectos de la Cafeína sobre el Aprendizaje Espacial en Laberinto de Barnes**

Las investigaciones respecto a los efectos del estrés sobre la actividad locomotora, el comportamiento exploratorio, y la inhibición conductual son controvertidos. En efecto, varios estudios claramente demuestran que el estrés disminuye la exploración y potencia la inhibición de la conducta, otros estudios más recientes muestran un aumento de la conducta de exploración y una desinhibición después de una experiencia estresante.

Nuestros resultados muestran que el tiempo de exploración empleado por los animales antes de encontrar la caja meta que se encuentra emplazada en el laberinto circular de Barnes no presenta diferencias significativas entre el grupo control/control y control/cafeína ( $p < 0.05$ ), donde el primero de ellos emplea menos tiempo en encontrar la caja meta a diferencia del grupo control/ cafeína, el que emplea mucho más tiempo en dicho objetivo.

La razón por la cual el grupo control/cafeína utilizó más tiempo en ejecutar la tarea radica en que existe un deterioro de la coordinación motora. Se sabe que la cafeína ejerce efectos bifásicos (psicoestimulantes) sobretodo para la locomoción, exploración o reactividad de comportamiento (Meyer & Caston, 2004+).

Este deterioro se puede deber a que existe una degeneración de las neuronas piramidales del hipocampo específicamente en la región CA3 provocando una baja respuesta en la ejecución de algunas tareas (Meraz y Bañuelos, 2009+; Chen, Yang, Huang & Hsu, 2010+; Olivares, Toledo, Vera, Perez & Aboitiz, 2008+). De todas formas es necesario mencionar que los animales entrenados durante la fase de adquisición presentan una reducción progresiva en las latencias de inicio al agujero meta.

Por otra parte cuando se realiza el análisis de frecuencia de errores por agujeros, es decir el número de exploraciones de agujeros diferentes al agujero meta, se encuentran diferencias significativas entre los grupos control/control y control/cafeína ( $p < 0.05$ ). De la misma manera existen diferencias significativas entre ensayos 1 (E1) y ensayo 8 (E8) y prueba con caja (PCC) ( $p < 0.0001$ ). Esta conducta indica que el protocolo usado funciona correctamente, debido a que los errores al ejecutar la tarea se reducen considerablemente, refiriéndose tal vez a que hubo una retención de la ejecución aprendida durante la fase de adquisición.

Los resultados anteriores se condicen con la distancia recorrida por los animales. Al existir una disminución de la frecuencia de exploración conforme transcurrían los ensayos la distancia recorrida también fue menor. Es así como no existe una diferencia significativa entre los grupos respecto a la distancia recorrida en la prueba circular de laberinto de Barnes. De la misma manera, al analizar el progreso de los ensayos, se puede concluir que todos los grupos emplearon significativamente menos tiempo en encontrar la caja meta. Sin embargo realizando un análisis estadístico t-test muestra diferencias significativas entre el grupo control/control y control/cafeína ( $P=0.0499$ ), es decir, los animales control recorrieron menos distancia que el grupo control/cafeína, lo que se puede explicar, por las acciones que ejerce la cafeína sobre la exploración antes mencionada.

Así también al analizar la velocidad empleada por los grupos en la ejecución de la tarea sobre el laberinto circular de Barnes no se encontraron diferencias significativas entre ellos, debido a que al emplear menor frecuencia de errores por agujeros como también menor distancia se deduce que también existe una disminución en la velocidad empleada por el animal.

Al analizar los resultados del segundo ensayo de evaluación (PSC), se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo cuando se realiza un análisis comparativo t-test se encuentran diferencias significativas entre los grupos control/control y control/cafeína ( $p<0.05$ ). Este último explora en menor frecuencia el agujero meta a diferencia del grupo control/cafeína que explora mucho más dicho agujero. Esta tendencia se debe, producto del deterioro en la coordinación motora mencionada anteriormente, provocando acción sobre el grupo control/cafeína en relación a la exploración del resto de agujeros del laberinto circular.

En relación al análisis del porcentaje de frecuencia de exploración del agujero meta y del resto de los agujeros del laberinto, se puede evidenciar claramente que el grupo control/cafeína presenta una preferencia por el agujero 1 a diferencia del grupo estrés/cafeína; de la misma manera el grupo estrés/cafeína presenta una preferencia por el agujero 0 a diferencia del grupo control/estrés; el grupo estrés/cafeína presenta preferencia por el agujero -1 a diferencia del grupo control/estrés y por último se puede observar que el grupo control/control presenta preferencia por el agujero -9 a diferencia del grupo control/estrés, de la misma manera que existe esa preferencia por parte del grupo control/estrés a diferencia del grupo estrés/cafeína. Para los agujeros 0, 1 y -1 el análisis sugiere que los grupos a los cuales se le administró cafeína presentan

una frecuencia de exploración mayor en comparación a los grupos que solamente estaban estresados. Este fenómeno se presentaría debido al efecto potenciador que produce la cafeína sobre la memoria (Lieberman y cols., 2002+). Sin embargo el agujero -9 presenta diferencias significativas entre los grupos control/estrés y control/control, provocado posiblemente por el estrés.

También se puede observar que el grupo estrés/cafeína a diferencia del grupo control/estrés, presentó el menor porcentaje de exploración para este agujero, lo que se condice con el hecho de que la cafeína provocaría un efecto potenciador sobre la memoria. Dicha tendencia del grupo estrés/cafeína se puede deber a que una vez adquirida la información de la posición del agujero meta durante los 8 ensayos, ésta puede ser recuperada, proceso que implica la activación de la información previamente almacenada y la exhibición de las respuestas conductuales aprendidas en el contexto de su entrenamiento o en contextos semejantes (Vargas, 2009+).

En esta investigación se sugiere que la administración crónica de cafeína (55 mg/kg) influye positivamente en la recuperación de la memoria espacial más no en la adquisición. Sin embargo el estrés no parece afectar significativamente el proceso de aprendizaje y memoria.

Finalmente, se considera adecuado realizar un estudio inmunohistoquímico de las neuronas hipocampales de CA1, CA3 y GD con anti-BDNF, para observar interacciones moleculares y un análisis histológico de esta área para determinar si existen diferencias significativas a nivel celular, a través del mapeo de espinas dendríticas. Del mismo modo, se podría someter a un control negativo con bloqueadores de receptores de adenosina en otro grupo experimental, de esta manera inhibir el efecto de la cafeína sobre el aprendizaje.

## Referencias

- Alfonso, J. (2005). *Identificación de genes regulados por estrés y sus efectos sobre neuronas del hipocampo*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de General San Martín, Argentina.
- Arancibia, D. (2012). *Efectos del estrés sobre proteínas asociadas al remodelamiento dendrítico hipocampal en ratas tratadas con el antidepresivo tianeptina*. (Tesis no publicada). Universidad de Playa Ancha, Valparaíso.
- Arias, J., Kottow, M., León, F., Lira, E., Michaud, P., Salinas, R., et al. (2007). *Marcos normativos en ética de la investigación científica con seres vivos*. Santiago: CONICYT.

- Boulenger, J., Marangos, P., Zander, K. & Hanson, J. (1986). Stress and Caffeine: effects on central adenosine receptors. *Clinical Neuropharmacology*, 9 (1), 79-83.
- Chen, C-C., Yang, C-H., Huang, C.-C., & Hsu, K.-S. (2010). Acute stress impairs hippocampal mossy fiber-CA3 long-term potentiation by enhancing cAMP-specific phosphodiesterase 4 activity. *Neuropsychopharmacology*, 35 (7), 1605-1617. doi: 10.1038/npp.2010.33
- Claro, S., Gamba, M., Múnera, A., & Lamprea, M. (2009). Efecto de la restricción calórica en el aprendizaje y la recuperación de una tarea espacial en ratas expuestas a estrés agudo. *Suma Psicológica*, 16 (1), 53-64.
- Cunha, G., Canas, P., Oliveira, C., & Cunha, R. (2006). Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2a receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience*, 141, 1775-1781. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.05.024
- Espinosa, A. (2010). *El estrés crónico como elemento potenciador de la degeneración de las neuronas del hipocampo inducida por inflamación. Posible implicación en enfermedades neurodegenerativas*. Sevilla: CSI-F.
- Foy, M. R., Stanton, M. E., Levine, S., & Thompson, R. F. (1987). Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*, 48 (1), 138-149.
- Fontinha, B., Delgado, J., Madroñal, N., Ribeiro, J., Sebastiao, A. & Gruart, A. (2009). Adenosine A2A receptor modulation of hippocampal CA3-CAI synapse plasticity during associative learning in behaving mice. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1865–1874. doi: 10.1038/npp.2009.8
- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51 (1), 83-133.
- Henry, J., & Stephens, P. (1979). Caffeine as an intensifier of stress-induced hormonal and pathophysiologic changes in mice. *Pharmacology Biochemistry & Behaviour*, 13, 719-727. doi: 10.1016/0091-3057(80)90017-9
- Lane, J. (1983). Caffeine and cardiovascular responses to stress. *Psychosomatic Medicine*, 45 (5), 447-451.

- Lieberman, H., Tharion, W., Shukitt, B., Speckman, K., & Tulley, R. (2002). Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Psychopharmacology*, *164* (3), 250-261. doi: 10.1007/s00213-002-1217-9
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual Reviews of Neuroscience*, *22*, 105-122.
- Meraz, T., & Bañuelos, P. (2009). Efecto del Estrés crónico sobre la remodelación dendrítica en la región CA3 del hipocampo. *e-Gnosis*, *7* (3).
- Meyer, L., & Caston, J. (2004). Stress alters caffeine action on investigatory behaviour and behavioural inhibition in the mouse. *Behavioural Brain Research*, *149* (1), 87-93.
- Moratalla, R. (2008). Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos*, *10* (3), 201-207.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, *40* (5), 289-297. Disponible en: <http://www.revneurolog.com/sec/resumen.php?id=2005004>
- Olivares, R., Toledo, C., Vera, Y., Perez, H., & Aboitiz, F. (2008). Efecto del estrés sobre el sistema nervioso central. *Avances en Ciencias Veterinarias*, *23* (1 y 2), 43-49. Disponible en: <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/9080>
- Oropeza, J. (2007). *Estrés por subalimentación, ruido y calor en la eficiencia reproductiva de ratas de la cepa Wistar*. (Tesis no publicada). Universidad Autónoma de Chihuahua, México.
- Troncoso, J., Lamprea, M., Cuestas, D., & Múnera, A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. *Acta Biológica Colombiana*, *15* (1), 207-221. Disponible en: <http://www.revista.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/9692>
- Vargas, D. (2009). *Efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas de Novo sobre la extinción de un aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes*. (Tesis no publicada). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.