



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS DEL
HIPOCAMPO Y LA CORTEZA PERIRRINAL DURANTE LA
CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE
OBJETOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ERNESTO FERNANDO SALDÍVAR PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS:

ISRAELA BALDERAS MORENO



MÉXICO, D.F.

ENERO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Existen
más
cosas
en el
cielo y
en la
tierra,
cerebro,
que tu
filosofía
no
alcanza
a
soñar.*



Agradezco fundamentalmente a toda mi familia el haberme apoyado en la realización de éste trabajo; reconozco que sin cada uno de ellos no hubiera terminado. También agradezco a mis amig@s, de lo cuales no doy nombres para no cometer injusticias a su honor, pero cada uno sabe de mi aprecio de manera directa.

Agradezco también a la UNAM la oportunidad de estudiar en ella; esto implica un reconocimiento a todos los profesores, trabajadores y alumnos que conocí. Nos la rifamos.

Dedico este trabajo con amor a Nela y a todas aquellas cosas que se pierden, marchitan o mueren, a las cosas que se piensan están pérdidas en la luna, o en los silencios o en las horas que pasan y ya no vuelven nunca más. También a las que se disipan en el humo; a las cosas que se pierden en el abismo o en el fondo de nuestros bolsillos, a las almas que se bañan en aguas del Leteo, entre sueños olvidados y recuerdos imposibles, un beso o un adiós.

Me reservo también el apoyar las experimentaciones primitivas en animales vivos pues cada cosa peculiar que tenga vida es sagrada, no solo por su cerebro, sino por todo su cuerpo.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Metodología	18
Resultados	24
Discusión	32
Conclusión	39
Referencias	40

RESUMEN

La capacidad cognoscitiva que consiste en detectar la novedad o familiaridad de un estímulo es una función de la memoria de reconocimiento, la cual puede ser de corto o largo plazo. En este trabajo se probaron los efectos de la administración post-adquisición del antagonista a receptores muscarínicos, escopolamina, en un paradigma que evalúa la memoria de reconocimiento de objetos en ratas. La escopolamina fue administrada bilateralmente en la corteza perirrinal o en el hipocampo de ratas inmediatamente después de la adquisición y la memoria de reconocimiento se probó a corto plazo (90 minutos) y a largo plazo (24 horas). Los resultados muestran que la escopolamina deterioró la memoria de reconocimiento a corto plazo cuando fue inyectada en la corteza perirrinal o en el hipocampo. Sin embargo, la memoria a largo plazo solamente se deterioró cuando la administración fue en la corteza perirrinal. Cuando la administración fue retardada 160 minutos después de la adquisición, no se obtuvo ningún efecto sobre la memoria de reconocimiento.

Estos datos indican que la memoria a corto plazo requiere de la activación de los receptores muscarínicos, tanto en la corteza perirrinal como del hipocampo, mientras que para la memoria a largo plazo depende solamente de la actividad de los receptores muscarínicos en la corteza perirrinal. Estos resultados dan evidencia de una participación diferencial de la actividad muscarínica durante la formación de la memoria de reconocimiento en estas dos estructuras del lóbulo temporal medial.

INTRODUCCIÓN

Una de los procesos básicos de los organismos dotados de sistema nervioso es la memoria. La memoria es el proceso a través del cual un organismo puede retener y evocar la información que experimenta (Bailey C., Bartsch D., Kandel E., 1996) quedando manifestada a través de los cambios conductuales que suponen, también, cambios plásticos entre la conectividad de un sistema neuronal.

El estudio científico de la memoria concibe sistemas de memorias, los cuales se componen de mecanismos para la adquisición, retención y evocación de la información que utilizan ciertas reglas de operación (Tulving, 1985 en Bermúdez & Prado, 2001). A mediados del siglo XX, Gerard y Hebb propusieron la teoría del trazo dual de la memoria, la cual sugiere que la estabilización de la actividad neuronal reverberante, subyacente de la memoria a corto plazo, produce memoria a largo plazo (Gerard, 1949 y Hebb, 1949 en McGaugh, 2000). Sin embargo, el hallazgo acerca de que algunos inhibidores de síntesis de proteínas, como la anisomicina, no evitan el aprendizaje de tareas pero sí interrumpen la memoria del entrenamiento, sugiere la existencia de, al menos, dos etapas de la memoria en la cual la síntesis de proteínas es solamente requerida para la consolidación de la memoria a largo plazo (McGaugh, 2000). Las fases de la consolidación de la memoria, al parecer, no se encuentran secuencialmente ligadas como es propuesto por la hipótesis del trazo dual, y se distinguen por la persistencia en el tiempo de la información (fig. 1): la memoria de corto plazo tiene la cualidad de ser transitoria y de una duración de unos segundos hasta algunas horas, por lo que también es llamada memoria de trabajo. La memoria de largo plazo es persistente a través del tiempo y puede durar horas y meses (Bermúdez & Prado, 2001). Por último, se ha postulado la existencia de la memoria de larga duración, la cual implica la interacción de sistemas cerebrales sobre la reorganización en los sistemas de memoria y la estabilización de conexiones distribuidas que permiten que la información se almacene más allá de los meses, años e incluso en toda la historia de vida (McGauh, 2000).

Un modelo tentativo de la taxonomía de la memoria, propuesto por Squire y Morgan (1996), subdivide los contenidos mnémicos de largo plazo en dos (fig. 2). La memoria no declarativa es un tipo de memoria que no es accesible al recuerdo consciente, es poco flexible y provee un acceso muy limitado al recuerdo consciente y a los sistemas de respuestas que no estuvieron involucrados en el aprendizaje original (Bermúdez & Prado, 2001).

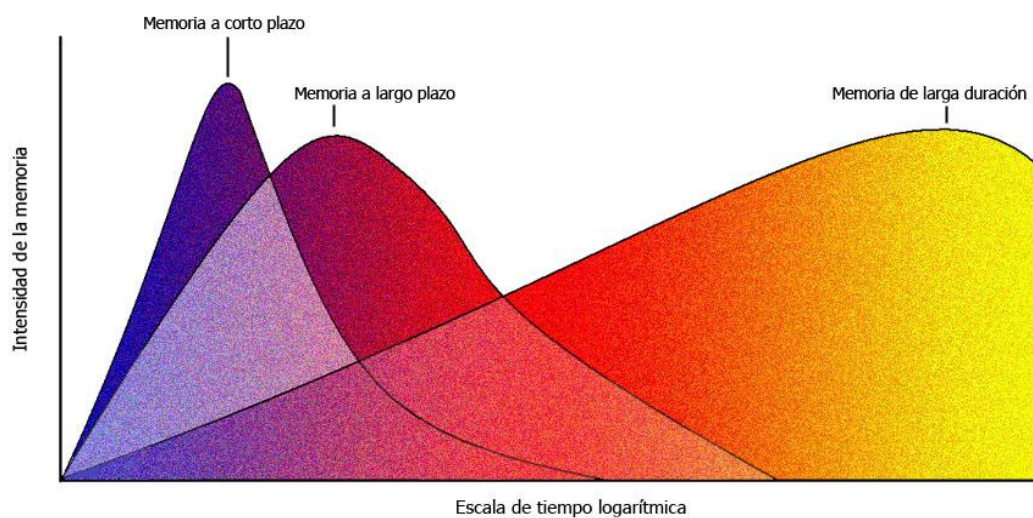


Fig. 1. Fases de la consolidación de la memoria. La teoría del trazo dual ha sugerido que la memoria a corto plazo y las distintas fases en la memoria a largo plazo, no se encuentran secuencialmente ligadas ya que la síntesis de proteínas solo es requerida para la consolidación a largo plazo. La evidencia de que distintos fármacos pueden bloquear selectivamente la memoria a corto plazo (segundos a horas) o la memoria a largo plazo (horas a meses) sugieren que las distintas etapas de la memoria consisten de procesos independientes que actúan en paralelo. Etapas posteriores en la consolidación que resultan en memorias que perduran toda la vida, involucran la reorganización y la distribución estabilizada de las conexiones en los sistemas cerebrales (*modificado de McGaugh, 2000*).

Consta, además, de cuatro subtipos:

1. Memorias de habilidades, consiste en hábitos motores y cognitivos cuyos sustratos neuronales son las cortezas estriada, motora y el cerebelo (McCormick, Clark, Lavond, & Thompson, 1982 en Squire, 2004).
2. El *priming*, fenómeno en el que una conducta es facilitada o entorpecida por la información a la que se tuvo acceso recientemente y es procesada por la neocorteza (Tulving, & Schacter, 1990).

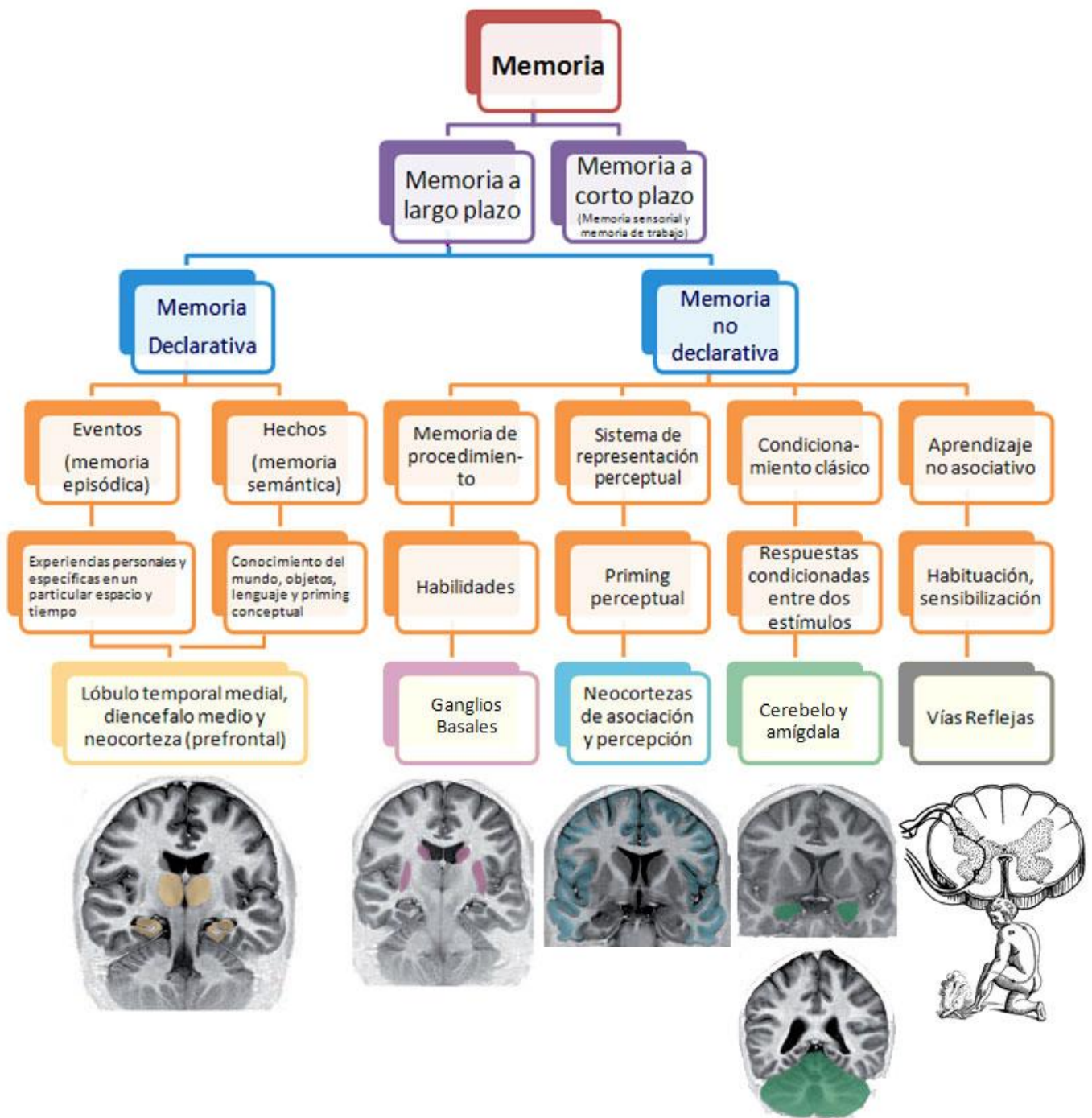


Fig. 2 Taxonomía de la memoria a largo plazo, propuesto por Squire y Morgan (1996). En este modelo, la memoria a largo plazo es dividida en dos clases. La memoria no declarativa comprende diversos aprendizajes inconscientes y memoria de habilidades, cuyos cambios conductuales son independientes del lóbulo temporal medial. Por otro lado, la memoria declarativa se caracteriza por su evocación consciente y tiene dos subclases: memoria episódica, que consiste de memoria para eventos autobiográficos; y la memoria semántica, que consiste en el conocimiento enciclopédico del mundo. Las memorias semánticas son impersonales y no requieren de un contexto autobiográfico, mientras que las memorias episódicas son personales. Esto incluye el cuándo y cómo sucedieron los episodios y se encuentran acompañados por una sensación de experiencia personal, llamada conciencia auto-noética (modificado de Squire & Morgan, 1996; Henke, 2010)

3. Aprendizaje asociativo básico, que establece relación entre estímulos y respuestas que involucra a la musculatura esquelética con el cerebelo (Schacter & Tulving, 1994).

4. Aprendizaje no asociativo, que consiste en la adquisición por la simple presentación de los estímulos cuyo procesamiento es a través de vías reflejas (Schacter & Tulving, 1994).

Por otro lado, la memoria declarativa es definida como la memoria consciente para los hechos y eventos y es de dos subtipos: la memoria episódica (o memoria para los eventos personales) la cual engloba experiencias personales y específicas en un particular espacio/tiempo. La memoria semántica contiene información en general o "enciclopédica del mundo" (Zola-Morgan & Squire; 1993); para evaluarlas se usan mediciones explícitas que requieren del recuerdo consciente de la información. La memoria declarativa consiste en un sistema que adquiere información rápidamente, es accesible al recuerdo o evocación consciente y además es flexible y disponible a múltiples sistemas de respuesta (Bermúdez & Prado, 2001).

En contraste con las memorias no declarativas, en las cuales la fase de adquisición de la información son extensas, la memoria declarativa requiere de pocas exposiciones al material que será aprendido (Winters B., Saksida L. y Bussey T. 2008) y su sustrato neuronal es el lóbulo temporal medial (LTM), cuya actividad es responsable de procesar, codificar y almacenar la información (fig. 3). Este modelo surge tras las deficiencias observadas en la memoria del paciente HM, reportado por Scoville y Milner en 1957, y también tras las experimentaciones en animales que se encaminaron a replicar los déficits observados en él.

Henry Molaison (HM) fue una persona que sufrió de severos ataques epilépticos clónicos-tónicos cuyo foco de origen parecía ser en varias estructuras del LTM. Los éxitos terapéuticos que implicaban, en ese entonces, la lobotomía del lóbulo frontal y la cercana relación entre la corteza posterior orbital y la temporal medial

(Scoville & Milner, 1957) inclinaron el tratamiento de HM hacia la extirpación quirúrgica de varias estructuras como la amígdala, la corteza perirrinal (PRh) y la entorrinal así como del hipocampo anterior; la corteza parahipocampal no fue removida en gran medida y tanto el neocortex temporal como el tronco temporal permanecieron intactos (fig. 4) (Corkin et al., 1997).

Después de que se removieron estas estructuras, el paciente HM dejó de tener crisis epilépticas sin presentar ningún deterioro en cuanto sus capacidades intelectuales y, en opinión de su familia, ni de su personalidad; sin embargo, presentó una conducta inesperada: no reconoció a nadie del personal del hospital (a excepción del cirujano William Scoville, quien conocía desde hace años) ni tampoco podía recordar el camino para llegar al baño o recordar qué había desayunado. Los eventos de cada día durante su estancia en el hospital después de la operación le eran imposibles de recordar; dramáticamente diez meses después de la operación no logró memorizar el nuevo domicilio donde habitaba (Scoville & Milner, 1957); y más aún, 10 años después, no pudo reconocerse en un espejo.

De estos déficits, Scoville y Milner (1957) concluyeron que las estructuras removidas provocaron una densa amnesia anterógrada y una amnesia retrógrada temporal para aquellas memorias conscientes. De esta manera, se sugirió que las estructuras del LTM, en especial el hipocampo, se hallaban involucradas en la formación de las memorias declarativas a largo plazo.

El patrón de amnesia observado reveló que el LTM es crítico para la adquisición, el acceso temporal y la consolidación de recuerdos conscientes (Milner, 1972 en Greene, A., Gross W., Elsinger C., Rao S., 2006) apoyándose también por los reportes previos de Milner y Penfield acerca de dos pacientes con lobectomía parcial del lóbulo temporal del hemisferio dominante y con deterioros en la memoria similares a HM (Penfield, 1955 en Scoville & Milner, 1957). Una de las capacidades cognoscitivas más deterioradas de HM fue en la memoria de reconocimiento.

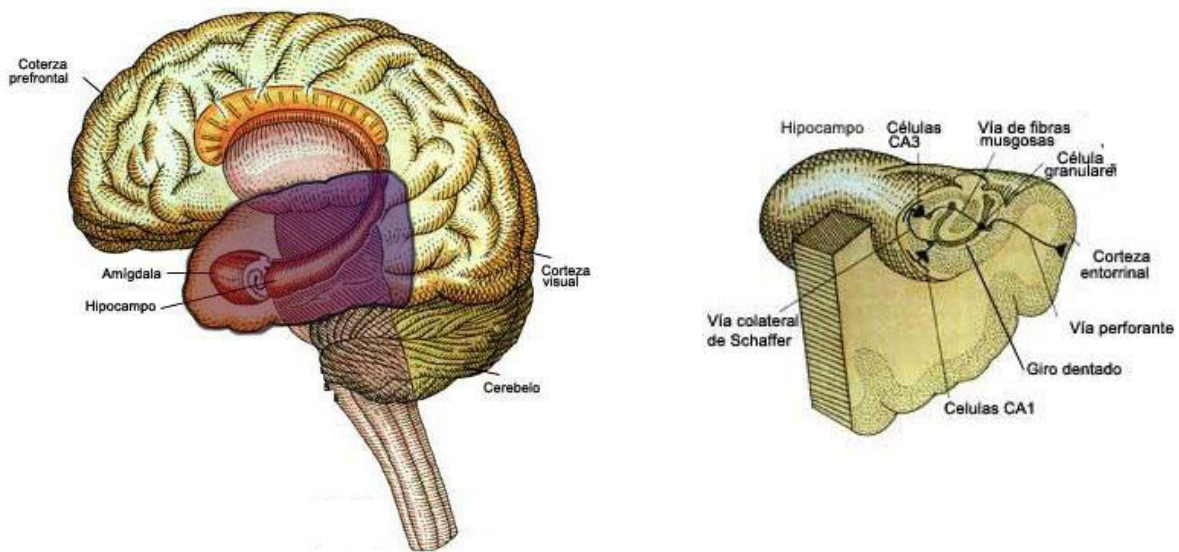


Fig. 3 Esquema de varias estructuras del LTM; El hipocampo se encuentra localizado en la profundidad de la porción media del lóbulo temporal. La información fluye hacia y a lo largo del hipocampo por medio de tres vías principales que están indicadas en la imagen ampliada que se ve a la derecha de la figura: la vía perforante que circula desde la corteza entorrinal a las células granulares del giro dentado; la vía de las fibras musgosas que va desde las células granulares del giro dentado a las piramidales de la región CA3 del hipocampo; la vía colateral de Schaffer que proyecta desde las células de región CA3 a las de la región CA1. (Figura modificada de Squire y Kandel, 2000).

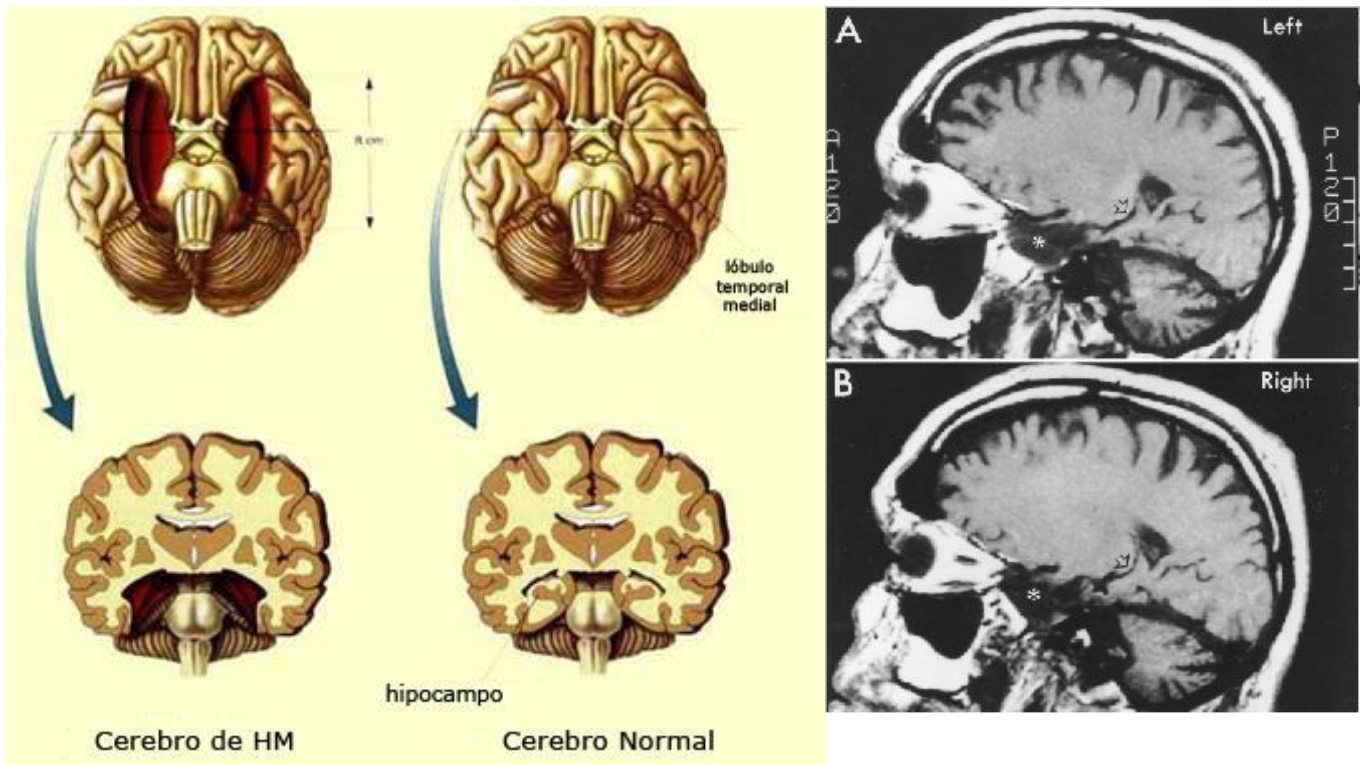


Fig. 4 . Izquierda: esquema de las lesiones de HM contrastadas con un cerebro normal; **Derecha :** Cortes parasagitales de la izquierda (A) y derecha (B) del cerebro de HM. Las porciones removidas bilateralmente del lóbulo temporal se indican con un asterisco. (Modificado de Siegel, 2003 y Corkin, 1997).

El reconocimiento es una función cognoscitiva que consiste en saber si algo ha sido experimentado previamente (Winters et al., 2008) y se acompaña de dos componentes: el juicio de familiaridad del estímulo experimentado y la información contextual (espacial y temporal; cuándo y dónde fue experimentado) que acompañan al estímulo (Mandler, 1980 en Squire, 2004).

La investigación neurocientífica se encaminó a evaluar y replicar los déficits en la memoria de reconocimiento sobre modelos animales; para evaluarla en bebés humanos y primates no humanos se diseñó el paradigma de la tarea de no igualación a la muestra demorada y su contraparte, la tarea de igualación a la muestra demorada (traducción del inglés *delayed nonmatching-to-sample task* y sus acrónimo *DNMS*; así como *delayed matching-to-sample task* o *DMS*) (Mishkin & Delacour, 1975) (*fig. 5*). Este paradigma consta de dos fases: una es la adquisición de la información seguida de una fase de elección/prueba intermediadas por un periodo de demora, cuya duración es variable. La fase de adquisición consiste en dar a un mono un objeto sobre el cual hay comida y el mono debe desplazar el objeto para obtener el alimento; después sucede el periodo de demora, o retención de la información, y enseguida se le da al mono dos objetos; uno de estos objetos es el mismo que anteriormente contenía la comida (objeto familiar) y el otro objeto es uno "novedoso", al que nunca ha tenido acceso.

La diferencia entre ambas tareas radica en la regla que sigue cada una; por ejemplo, en la tarea DNMS el mono debe desplazar el objeto novedoso para obtener el alimento, y en la DMS debe desplazar el objeto familiar ya que este contiene el alimento. La elección correcta del objeto, dependiendo de la tarea, es un indicador del reconocimiento de dicho objeto. De estas primeras experimentaciones en primates no humanos se sugirió que el hipocampo y la amígdala eran importantes para la memoria de reconocimiento de objetos (Zola-Morgan & Squire en 1985).



Fig. 5 El paradigma DMS. Este paradigma se realizó con la intención de recrear los déficits que presentó HM; en la primera fase se le muestra al mono donde se encuentra la comida y tras un periodo de retardo se le prueba a que el mono recuerde el objeto familiar.

En posteriores investigaciones en las que únicamente se evaluó la tarea DNMS, se encontró que la lesión de estructuras adyacentes al hipocampo como la corteza perirrinal (PRh) y regiones parahipocampales provocaron déficits similares a los encontrados con lesiones combinadas entre el hipocampo, amígdala y tejido cortical del LTM (Zola-Morgan et al 1989). Monos con lesiones en la corteza rinal (combinada con la PRh y la entorrinal) presentaron severos deterioros en la discriminación visual en las tareas DNMS y DMS; tales deterioros dependían del periodo de demora ya que los animales lesionados podían ejecutar bien la tarea con un periodo corto de demora (10 segundos) mientras que con un periodo mayor (60 segundos o más) la ejecución se deterioraba (Meunier et al., 1993; Eacott et al., 1994 en Winters et al., 2008). En otro estudio se demostró que el daño de la corteza PRh provocaban serios déficits para la memoria de reconocimiento de objetos en una tarea de DNMS, aún cuando el hipocampo se encontraba totalmente intacto (Murray y Mishkin en 1998). Este hallazgo fue replicado y confirmado con lesiones por excitotoxicidad en el hipocampo y la amígdala; tales lesiones no deterioraron la ejecución de tareas DNMS y en contraste, la disfunción de la PRh sí ocasionó un deterioro sustancial en el reconocimiento del objeto (Buffalo et al., 1999). Trabajos con electrofisiología en macacos demuestran que, en tareas de reconocimiento visual, más del 25% de neuronas de la región anterior parahipocampal responden mucho más fuerte a un estímulo que es novedoso comparado con otro estímulo experimentado previamente (Brown & Aggleton, 2001; Desimone, 1996; Fahy, Riches, & Brown, 1993 en Winters et al.2008); referido como *supresión por repetición*, este patrón de cambio neuronal es apropiado para realizar juicios de familiaridad ya que las

respuestas están atenuadas después de un sola exposición del estímulo (Saksida y Bussey, 2010).

La corteza PRh (fig.6) es una región cortical definida como una corteza de asociación polimodal de orden superior, que recibe entradas unimodales de todas las modalidades sensoriales, así como aferencias de distintas áreas de asociación polimodales (Burwell, 1998). Las vías provienen de las cortezas frontal, parietal, temporal, cingulada, occipital y el complejo subicular, además de enviar proyecciones directa e indirectas al hipocampo (Winters et al., 2008). Cabe señalar que la corteza perirrinal se encuentra interconectada con la amígdala y la corteza insular, regiones que han sido relacionadas al aprendizaje gustativo en ratas (Bermudez & Yamamoto, 1998).

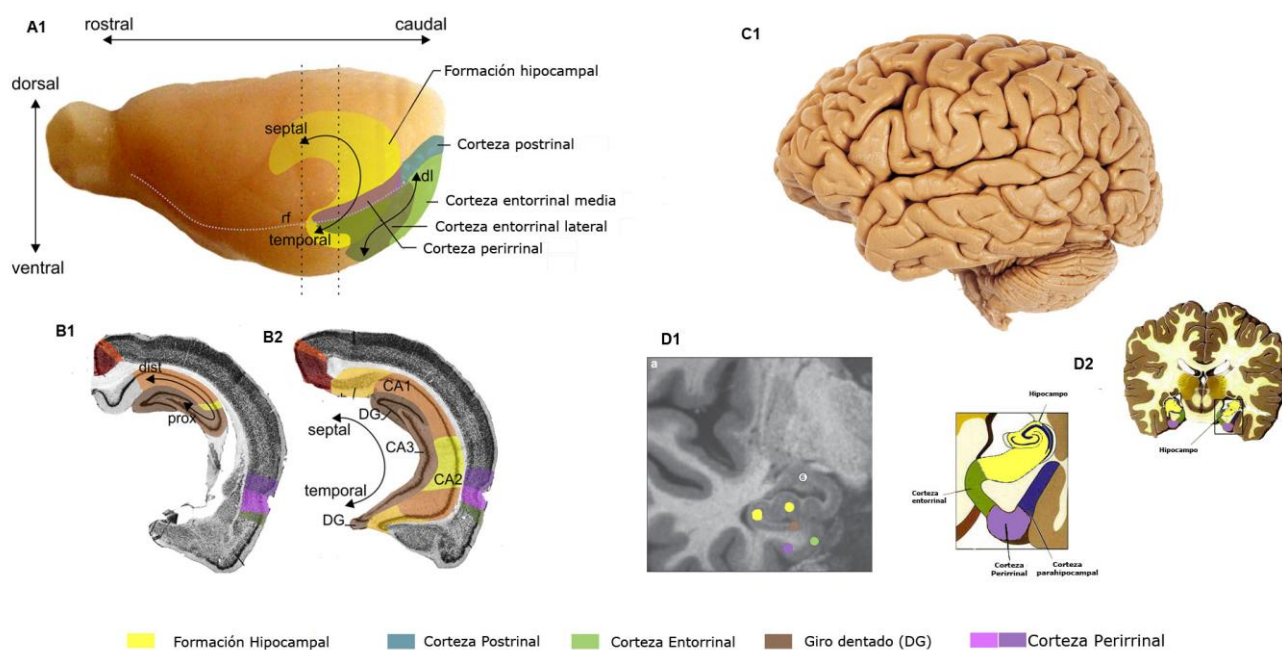


Fig. 6 Representación de la localización de la corteza perirrinal y otras estructuras del lóbulo temporal medial en una vista lateral del cerebro de rata (A1); las imágenes B1 y B2 corresponden a las vistas internas donde con colores, se han delimitado las estructuras correspondientes. En el caso del cerebro humano (C1) estas cortezas se encuentran más ventrales; a figura D1 es una imagen por resonancia magnética de las estructuras del LTM de un sujeto sano de 24 años, resaltadas por el mismo código de colores (a excepción del número 6, que corresponde a la amígdala). D2 es una representación esquemática de un corte coronal donde son resaltadas la corteza rinal, perirrinal y parahipocampal (*modificado de Sugar et al., 2011; Dickerson & Eichbaum, 2010*)

Una forma de evaluar la memoria de reconocimiento visual en roedores consiste en una variación del paradigma DNMS llamada Reconocimiento Espontáneo de

Objetos (en inglés *Spontaneous Object Recognition; SOR*) el cual surge como una propuesta para evaluar aquellas memorias relacionadas a un evento único (Ennaceur & Delacour, 1988) y además es uno de los paradigmas más utilizados en la actualidad (Winters et al., 2008).

Este paradigma se basa en una gama de conductas que consisten en la exploración, orientación, agresión y neofobia como respuesta ante la novedad de un estímulo. La novedad de un 'estímulo' está en función del contraste entre la percepción presente y la experiencia pasada; este tipo de conductas pueden presentar dos tendencias: acercamiento, que además puede ser considerada como 'preferencia' y la conducta de evitación (Corey, 1978). El paradigma 'SOR' se basa en la preferencia de los roedores por explorar agudamente los objetos que le son novedosos, abarcando una exploración tanto visual como locomotora (Corey, 1978). Además ofrece ventajas al no requerir un entrenamiento previo o el involucramiento de un reforzamiento explícito; propone una forma de estudiar la memoria de reconocimiento de objetos sin complicaciones potenciales respecto a la interpretación conductual, además de que no requerir de fases largas de entrenamiento o de consideraciones motivacionales (Winters et al., 2008).

El paradigma típico de esta tarea consiste en dos fases: una de muestra y otra de prueba, separadas por un periodo de retención de la información. La fase de muestra consiste en colocar a la rata dentro del aparato experimental (un escenario abierto inescapable), donde se encuentran dos objetos idénticos (A1-A2) a los que nunca antes ha tenido acceso. Se deja al animal durante un periodo de tiempo determinado y después es retirado. Terminado el periodo de retención, el animal es reintroducido al aparato experimental pero con una tercera copia del objeto mostrado en la adquisición (A3) y con otro objeto considerado como novedoso (B) al que nunca antes ha tenido acceso (fig.7). Las ratas normales prefieren explorar el objeto novedoso durante esta fase, por lo que el tiempo que invierte el animal explorando ambos objetos es medido y la proporción del tiempo total de exploración es considerado como un índice de reconocimiento (IR) de alguno de los objetos (Winters et al., 2008).

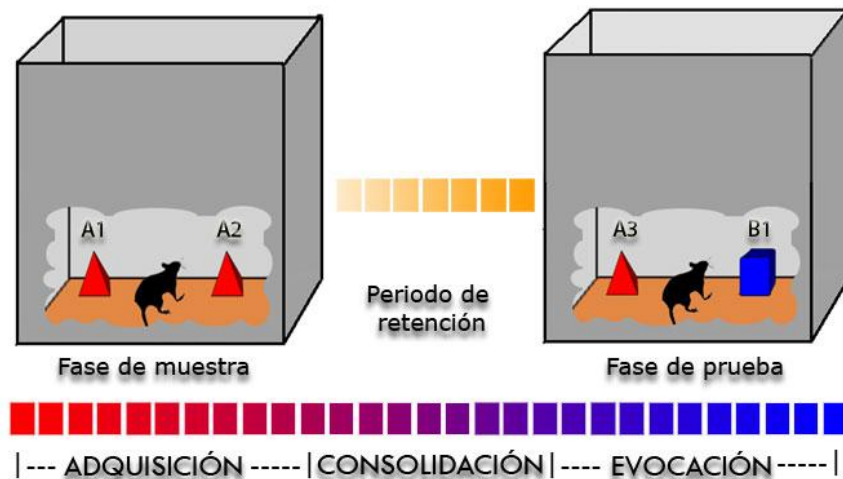


Fig. 7 Paradigma experimental 'Reconocimiento espontáneo de objetos' (SOR); en la fase de adquisición el animal es expuesto a dos objetos similares, después existe un periodo de retención que puede ser variable dependiendo si se quiere medir memoria a corto o largo plazo. Finalizado este periodo sigue la fase de prueba donde se encuentra un objeto que es copia del expuesto durante la adquisición junto con otro objeto nuevo.

Las técnicas de canulación en el sistema nervioso central permiten manipular farmacológicamente las funciones de cualquier estructura neuronal, como por ejemplo las del LTM. Cada fase en el paradigma SOR tiene su correspondiente a los mecanismos que conforman el sistema de memoria para el reconocimiento de objetos (adquisición=muestra/ consolidación= retención/ evocación=prueba).

Una de los fármacos más utilizados para la investigación neurocientífica de la memoria es la escopolamina, la cual es un antagonista no selectivo ya que esta molécula muestra una falta de selectividad a todos los subtipos de receptores (m1-m5) (Bolden et al., 1992). La administración sistémica o específica de la escopolamina, se estandarizó como un fármaco que inducía déficits cognitivos en humanos sanos y animales, similares a los de una demencia relacionada al envejecimiento (Ebert y Kirch, 1998; Flood y Cherkin, 1986). De hecho, la observación clínica de que la anestesia hecha con escopolamina frecuentemente ocasionaba amnesia, estimuló la investigación de sus efectos anticolinérgicos sobre la memoria humana (Klinkenberg & Blokland, 2010). El uso de la escopolamina como modelo farmacológico de la "amnesia colinérgica" fue adecuado y ancló a la hipótesis de la disfunción geriátrica de la memoria, postulada por Bartus y su equipo (Bartus et al., 1982 en Klinkenberg & Blokland, 2010).

La investigación de la participación del hipocampo y la corteza perirrinal, y también de los efectos de la escopolamina sobre la memoria de reconocimiento, establecieron un debate acerca de la participación de ambas estructuras y del sistema colinérgico, en la formación tanto a corto como a largo plazo (Winters et al., 2008).

De primera mano se ha sugerido que el hipocampo procesa información contextual y espacial, que es relevante para tareas donde se evalúa el reconocimiento de objetos; si es lesionada pueden encontrarse deterioros sobre esta función cognitiva, tanto en humanos, monos y ratas (Winters et al., 2008). Empero, se ha argumentado que el daño del hipocampo sobre el reconocimiento de objetos es menos severo que el déficit observado con las lesiones en la corteza perirrinal (Murray, 2000 y Prusky et al., 2004 en Winters et al., 2008).

Winters y colaboradores (2004) demostraron que existe una doble disociación funcional entre el hipocampo y la PRh para el reconocimiento de objetos (fig. 8a). La lesión excitotóxica con ácido iboténico en el hipocampo de un grupo de ratas o la PRh, demostró que el deterioro sobre el reconocimiento de objetos fue más severo en el grupo de PRh con varios periodos de retraso que iban de los 0, 15, 60 minutos o las 24 horas, mientras que el grupo que tenía lesionado el hipocampo mostraba índices similares al grupo control. En este mismo estudio se evaluó la memoria espacial con un laberinto radial; la tarea consistió en recordar una serie de ocho recompensas previamente entrenadas y se midió el número de errores para encontrarlas. Los resultados indicaron que aquel grupo que tenía la lesión en el hipocampo tuvo un mayor número de errores que el grupo perirrinal o el control. Los autores concluyeron que esto daba evidencia de la doble disociación funcional entre la corteza perirrinal y el hipocampo, pues ambas estructuras funcionan para cosas distintas: el hipocampo es importante para el reconocimiento espacial pero no para el reconocimiento de objetos, mientras que la corteza perirrinal sí lo es.

Apoyando esta idea, Warburton et al. (2003) reportó que las infusiones sistémicas, o directas, de escopolamina en la PRh deterioran la exploración del objeto novedoso cuando se administran previamente a la fase de adquisición, más no cuando se hace después (fig.8b).

Por otra parte Winters et al (2006), reportaron que la escopolamina provoca un efecto paradójico en la memoria de reconocimiento ya que puede deteriorar o facilitararlo (fig.8c). Las infusiones que son realizadas antes de la adquisición de la información provocan un deterioro sustancial sobre el reconocimiento de objetos si son probadas con un periodo de retención de 24 horas; sin embargo, si la administración fue inmediatamente después, a los 20 o 40 minutos, o a las 8-15 o 20 horas después de la fase de adquisición, existe una facilitación paradójica en la consolidación de la memoria de reconocimiento. Sin embargo, no existe ningún efecto si la administración de la escopolamina es antes de la fase de prueba; por lo que la actividad colinérgica en esta estructura, es relativa al momento de adquirir y consolidar la información, que será evocada después de 24 horas o en periodos que van de los 20 minutos hasta las 20 horas.

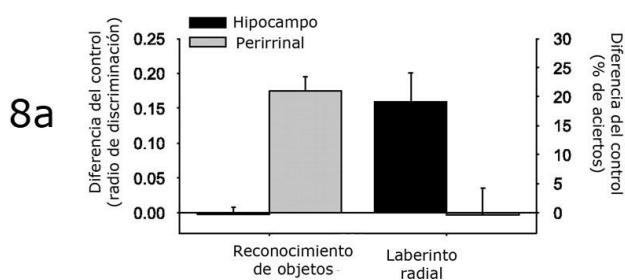


Fig. 8a. Esta figura ilustra los efectos de la doble disociación de las lesiones en la corteza perirrinal y el hipocampo en la memoria de reconocimiento y espacial. Las diferencias en las medias fueron calculadas para cada grupo y su lesión substrayendo la ejecución de cada tarea con respecto al nivel de desempeño del grupo control. (Modificado de Winters et al., 2004).

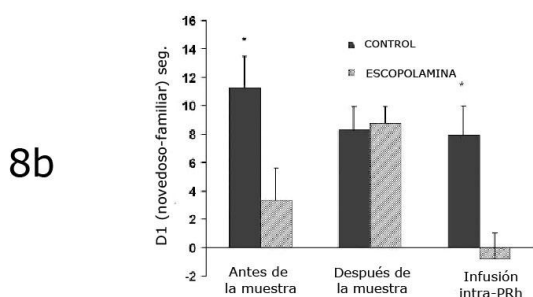


Fig 8b. Gráfica que muestra el deterioro provocado tras la administración de escopolamina antes de la fase de muestra; este efecto no se presenta si la escopolamina se inyecta después de la fase de adquisición. Las administraciones directas sobre la PRh también deterioran la exploración del objeto novedoso (Modificado de Warburton et al. 2003.)

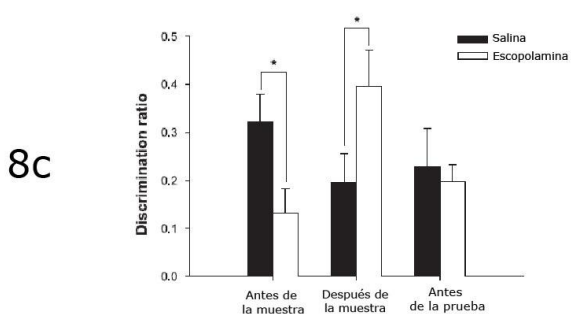


Fig. 8c. Efecto paradójico de la escopolamina al administrarse en la PRh; la infusión antes de la fase de muestra tiene el efecto de deteriorar el índice de reconocimiento (IR) mientras su infusión después de la fase de muestra mejora el IR. La administración antes de la fase de prueba no tiene ningún efecto (Modificado de Winters et al., 2006)

Por otra parte Tinsley et al. (2011) reportó que las administraciones de escopolamina en la PRh antes de la fase de muestra interrumpen la memoria a corto plazo pero no largo plazo. También ha sido demostrado que la administración de escopolamina en el hipocampo dorsal antes de la fase de muestra, deteriora la memoria de reconocimiento cuando la prueba se realiza con un periodo de retraso a la muestra de tres minutos (Hunsaker *et al.*, 2007).

Cabe señalar que la actividad colinérgica del hipocampo es relevante durante la memoria de reconocimiento. Midiendo con microdiálisis *in vivo* la liberación de acetilcolina, se ha registrado que existe un aumento de hasta un 250% respecto a sus niveles basales cuando una rata es expuesta a un objeto novedoso (Deegrot et al., 2005); la figura 10 muestra los principales grupos de neuronas colinérgicas del cerebro de rata.

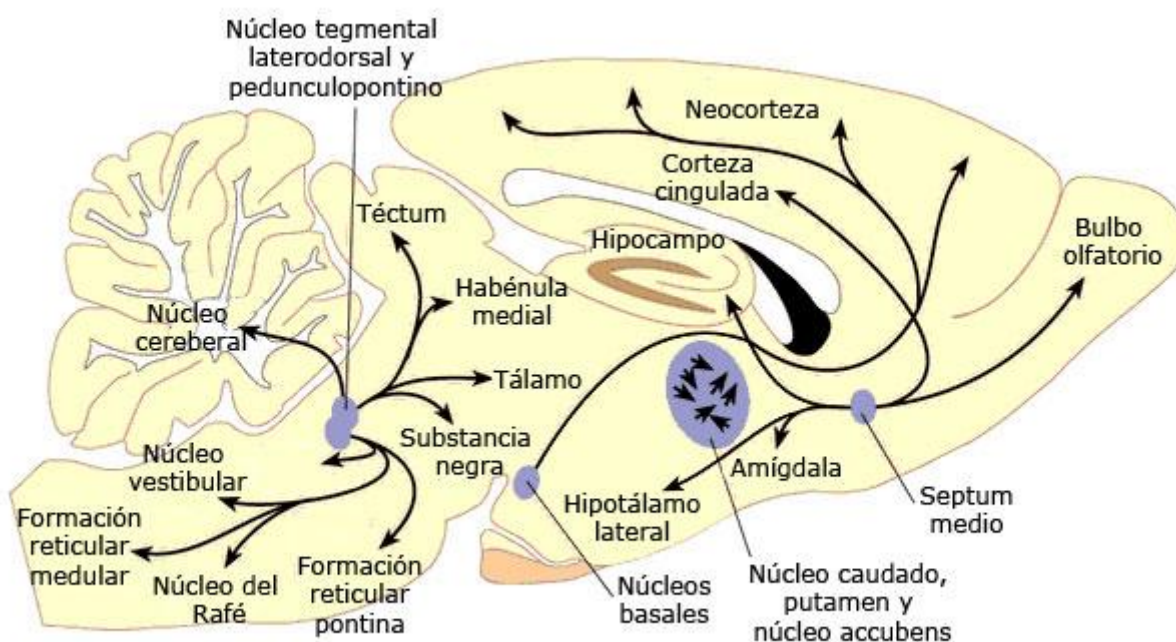


Fig 10. Esquema mediosagital del cerebro de rata que muestra los principales grupos de neuronas colinérgicas y la distribución de sus axones y botones terminales.

La acetilcolina tiene diferentes efectos fisiológicos sobre las redes corticales; en particular, los niveles de ACh se muestran altos cuando animales, como ratas o gatos, se encuentran despiertos y explorando su ambiente, corriendo a lo largo de las paredes o el suelo, o explorando objetos novedosos con la nariz (fig. 11).

Registros con electroencefalograma del hipocampo y la corteza entorrinal, caracterizan este periodo por oscilaciones de larga amplitud en la serie de frecuencias theta, mientras que la neocorteza muestra frecuencias altas, actividad de baja amplitud con sincronizaciones locales y algunos periodos theta en ciertas regiones (Hasselmo & McGaughy, 2004).



Fig. 11 Representación esquemática de los datos obtenidos a través de microdiálisis y donde se muestran los cambios en los niveles de acetilcolina durante las fases de vigilia y sueño. Durante la vigilia activa, los animales muestran niveles más altos de ACh que durante una vigilia pasiva (comer, acicalamiento, inmovilidad). Los niveles de ACh decaen hasta en 1/3 durante el sueño de ondas lentas pero se incrementan, de manera similar a la vigilia activa, durante la fase de sueño MOR (modificado de Hasselmo & McGaughy, 2004)

El incremento de ACh durante la vigilia es fuerte en las ratas cuando inicialmente son expuestas a un ambiente novedoso; los niveles de acetilcolina aumentan dramáticamente durante la ejecución de tareas donde es requerida la atención para la detección de algún estímulo (Himmelheber et al., 2000; Arnold et al., 2002, en Hasselmo & McGaughy, 2004).

Estos niveles altos de ACh durante la vigilia activa pudieran ser apropiados para establecer la dinámica neuronal apropiada para la atención a las entradas sensoriales o la codificación de nueva información. Al mismo tiempo, la supresión colinérgica que retroalimenta a las conexiones excitatorias previenen la interferencia del procesamiento interno de información previamente almacenada. Niveles bajos de acetilcolina en la vigilia pasiva y el sueño de ondas cortas, proveen una supresión de la retroalimentación excitatoria, permitiendo una mayor difusión de la actividad en el hipocampo y del hipocampo a la corteza

entorrinal, facilitándose así el proceso de consolidación (Hasselmo & McGaughy, 2004).

Bajo esta teoría, el bloqueo de la modulación colinérgica provocada por antagonistas muscarínicos podrían bloquear la capacidad para cambiar las dinámicas de evocación y aprendizaje; sin dicho cambio en la dinámica, las nuevas asociaciones no podrían ser almacenadas como nuevas representaciones específicas y la información se perdería en una multitud de asociaciones recolectadas (Hasselmo, 1994).

Para proveer datos comparables acerca de la participación de la corteza perirrinal y el hipocampo, y su relación con la actividad muscarínica en la memoria de reconocimiento tanto a corto como largo plazo, en este estudio se utilizó el paradigma SOR y se administró escopolamina, con variables periodos de retención para realizar pruebas tanto a corto como a largo plazo en grupo independientes de ratas. Este tipo de estudio ayudan a dilucidar los mecanismos de neurotransmisión que subyacen a la formación de una memoria de reconocimiento. Su importancia radica en que la memoria de reconocimiento es una de las capacidades cognoscitivas que se encuentran más deterioradas en demencias como el Alzheimer.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La actividad de los receptores muscarínicos colinérgicos del hipocampo y de la corteza perirrinal, tienen una participación diferencial sobre la memoria de reconocimiento de objetos, tanto a corto como a largo plazo?

Objetivo

- Analizar la participación de los receptores muscarínicos, utilizando escopolamina, en la memoria de reconocimiento de objetos tanto a corto como a largo plazo.

METODOLOGÍA

Sujetos

Se utilizaron 99 ratas macho de la cepa Wistar provenientes del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con un peso de 250-300 gr. al inicio de los experimentos.

Los animales fueron habituados durante una semana dentro del vivarium del Instituto; cada animal habitó una caja individual de acrílico con acceso libre a agua y comida, en un cuarto donde la temperatura estuvo constante a 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (de 7 a 19 hrs las luces se encontraban encendidas). Los experimentos fueron realizados en la fase de luz.

Cirugía

Se realizó cirugía estereotáxica a las ratas (fig. 12) para implantar cánulas guía bilaterales sobre el hipocampo dorsal o la corteza perirrinal, a través de las cuales se les administró el fármaco escopolamina. Se anestesió a los animales con una mezcla de ketamina (83.49 mg/kg) y xilacina (8.58 mg/kg) vía intraperitoneal. Se trepano el cráneo con una fresa dental siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1986):

Corteza	Anterioposterior	Lateral	Dorsoventral
Perirrinal (PRh)	-3mm	±6.5mm	-7mm
Hipocampo dorsal (Hip)	-3.6 mm	±3.0	-3.3 mm



Fig 12. Rata Wistar montada sobre un estereotáxico para colocarle cánulas a través de las cuales pueda llegar a administrarse, de manera intracerebral, el fármaco escopolamina.

Además, se colocó un mandril en cada cánula guía para prevenir la obstrucción de esta y antes de cualquier manipulación experimental los animales tuvieron una semana para su recuperación.

Las microinyecciones se realizaron con agujas dentales 30 GA, removiendo el mandril primeramente y conectando las microjeringas Hamilton de 10 μ l con una tubería de

polietileno.

El volumen total inyectado para cada rata fue de 0.5 μ l por hemisferio cerebral a una tasa de 0.5 μ l/min dejando un minuto extra el inyector para procurar una mejor difusión del fármaco. Al grupo control le fue administrada solución salina al 0.9%.

Fármaco

El fármaco que se administró fue bromhidrato de escopolamina (Sigma-Aldrich). El fármaco se disolvió en solución salina al 0.9%. El volumen total administrado fue 30 μ g/0.5 μ l-por hemisferio (Gutiérrez, 2004).

Aparatos y objetos experimentales

El aparato experimental (fig. 13) que se uso en la tarea de reconocimiento de objetos fue un escenario abierto de dimensiones de 40X40 cm y 60 cm de altura hecho de madera y pintado de color gris con la superficie cubierta de aserrín; la iluminación del cuarto experimental se realizó con luz blanca.

Sobre el aparato experimental se colocó una videocámara conectada a un monitor y grabadora DVD con la cual se registró la conducta del animal. Este aparato estuvo en un cuarto aislado de sonido, con ruido blanco (esto es una señal que contiene todas las frecuencias a la misma potencia) para evitar interferencias en la estimulación auditiva del animal.

Los objetos que se utilizaron fueron focos de cristal blanco con dimensiones de 6 cm diámetro y 11 cm de longitud y frascos de cristal transparente de 5.5 cm de diámetro y 5 cm de largo. Estos objetos fueron, cualitativamente, distintos en forma y color, aunque ambos estaban hechos de vidrio. Los objetos estuvieron adheridos al escenario experimental con velcro y se procuró que ninguno de los objetos fueran de la preferencia natural del animal. Se eliminaron las pistas olfativas antes y

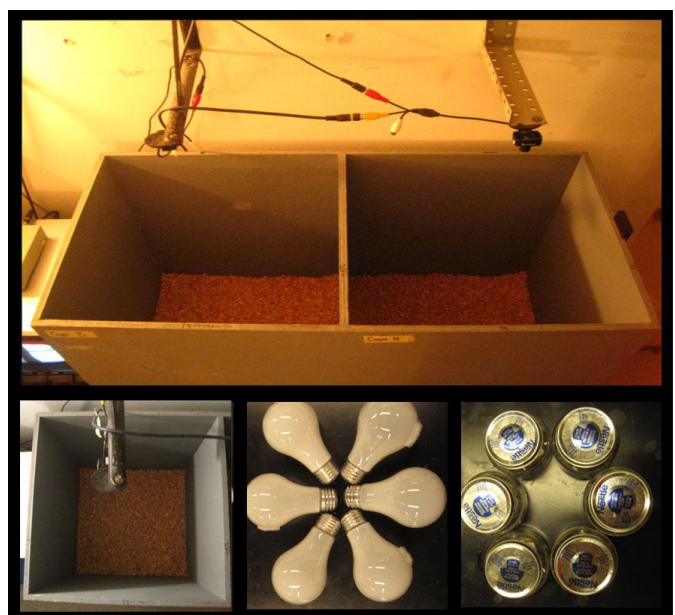


Fig. 13. El aparato experimental y los objetos usados para la tarea de reconocimiento de objetos.

después de su uso limpiándose con alcohol al 70%.

Procedimientos conductuales

Para cada sesión experimental, los animales fueron trasladados del vivarium al cuarto experimental dos horas antes del inicio de la tarea experimental y después de la tarea, se les dejó otras dos horas con la intención de evitar condiciones estresantes u otras variables que pudieran interferir con la ejecución de la tarea.

Todos los experimentos se llevaran a cabo con grupos independientes. El criterio que se tomó como exploración consistió en que la nariz estuviera a una distancia menor de 1 cm, o que ésta tocara al objeto; además la posición de los objetos fue contrabalancea. Dar vueltas o posarse sobre el objeto no fue considerado como una conducta exploratoria. Las ratas que tuvieron un tiempo total de exploración menor a 10 segundos se descartaron del análisis estadístico.

Protocolo experimental de la tarea de reconocimiento de objetos basado en el paradigma SOR

Basado en el modelo experimental propuesto por Ennaceur y Delacour (1988), donde se evalúa la memoria de trabajo a través de la conducta de exploración en un escenario inescapable para el roedor, se habilitó un protocolo experimental que consistió de 3 fases (fig. 14):

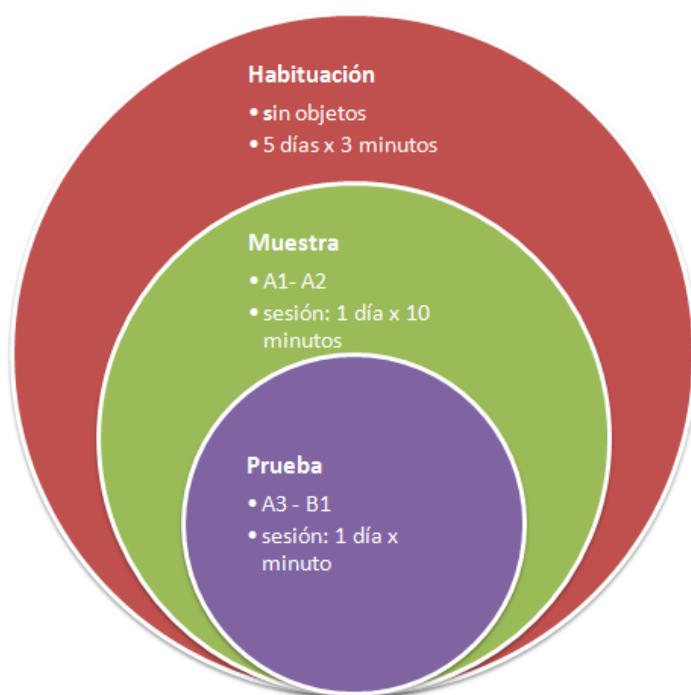


Fig. 14. Diagrama del protocolo experimental por fases; la duración de cada fase está representada por el tamaño del círculo

1. Fase de habituación

Previamente a la fase de muestra los animales fueron habituados durante 5 días al aparato experimental; cada sesión fue de 3 minutos y sin objeto alguno.

2. Fase de Muestra / Adquisición (A1-A2) x 10 minutos + fármaco

En esta fase los animales se colocaron dentro del aparato experimental con dos objetos similares (A1- A2), dispuestos sobre la superficie y fijados con velcro. Se cronometró diez minutos al momento de introducir a la rata al aparato y después se procedió a sacarla. Dependiendo del grupo experimental, se hicieron las manipulaciones farmacológicas inmediatamente o 160 minutos después.

3. Periodo de Retención

Después de la muestra de los objetos el intervalo de retención fue de dos tipos: para la memoria a largo plazo el periodo fue de 24 horas mientras que para la memoria a corto plazo fue de 90 minutos.

4. Fase de Prueba (A3-B1) x 1 minuto

En esta fase el animal fue reintroducido al aparato experimental con una copia del objeto expuesto en la fase de adquisición (A3) y con un objeto novedoso (B1). Se cronometró un minuto y se devolvió al animal a su caja. Esta conducta también quedó registrada en video.

Finalizadas las fases se procedió a sacrificar a todos los animales para extraer su cerebro y proceder con el análisis histológico para observar y corroborar el sitio de inyección.

Grupos Experimentales.

Experimento 1. Este experimento evaluó los efectos de la escopolamina sobre la memoria de corto plazo; la administración del fármaco se realizó inmediatamente que concluyó la fase de adquisición y después de 90 minutos se realizó la prueba.

PRH-VEH (n=9)	PRH-SCOP (n=10)
HIP-VEH (n=8)	HIP-SCOP (n=8)

Experimento 2. En este experimento se evaluaron los efectos de la inmediata administración de escopolamina sobre la memoria de largo plazo. La prueba se realizó a las 24 horas después de que concluyó la fase de adquisición.

PRH-VEH (n=9)	PRH-SCOP (n=9)
---------------	----------------

HIP-VEH (n=8)	HIP-SCOP (n=12)
---------------	-----------------

Experimento 3. En este experimento la administración de escopolamina se realizó a los 160 minutos que concluyó la fase de adquisición y la prueba se realizó a las 24 horas.

PRH-VEH (n=6)	PRH-SCOP (n=6)
---------------	----------------

HIP-VEH (n=7)	HIP-SCOP (n=7)
---------------	----------------

Histología

El sacrificio de los animales consistió de una sobredosis de 1.5 ml de pentobarbital sódico para uso veterinario y se perfundieron con solución salina al 0.9%. El cerebro se removió y se almacenó a 4° C bajo una solución fijadora de tejidos (formaldehído al 4%) durante 24 horas. Después se cambiaron a una solución con sacarosa, primero al 10%, después al 20% y finalmente al 30%.

Después, el cerebro se colocó sobre un micrótopo donde fue congelado con dióxido de carbono para obtener rebanadas coronales de 40um de grosor, de las zonas en donde fueron implantadas las cánulas. Los cortes se montaron sobre laminillas con gelatina para ser teñidos con la técnica de violeta de cresilo para su análisis bajo microscopio con la intención de corroborar el sitio de la cánula (fig. 15).

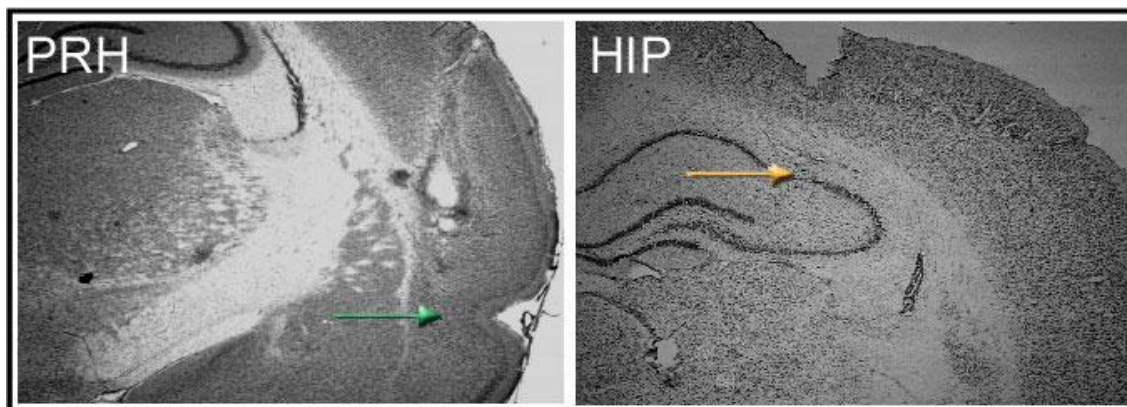


Fig. 15 Fotografía representativa de las rebandas del cerebro bajo microscopio.

En la figura Izquierda y con flecha verde, se muestra un cerebro del grupo de corteza perirrinal y en la derecha, del grupo hipocampo.

Análisis de datos y estadística

La conducta que se consideró exploratoria fue cronometrada y con esto se calculó un índice de reconocimiento (IR), entendido como el tiempo de exploración del objeto nuevo expresado en función del tiempo total dedicado a la exploración de los dos objetos (TIEMPO DE EXPLORACIÓN DEL OBJETO NUEVO/ TIEMPO TOTAL DE EXPLORACIÓN). Un índice de igual o menor a 0.5 indicó que no había preferencia por alguno de los objetos mientras un índice de reconocimiento mayor a 0.5 mostró que existía preferencia por algún objeto.

Se procuró que el experimentador no supiera a qué grupo experimental pertenecía el sujeto al cual cronometraba con la intención de evitar sesgos en sus mediciones.

Utilizando el software estadístico StatView se compararon el promedio de los índices de reconocimiento entre grupos aplicando las siguientes pruebas estadísticas:

- Prueba t para una muestra, usada para identificar si los IR fueron significativamente diferentes del 0.5.
- Prueba t no pareada para encontrar diferencias entre los grupos salina y escopolamina.
- ANOVA de dos vías (entre fármaco y estructura cerebral) con un test post hoc de Bonferroni para la fase de prueba. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Experimento 1. Infusiones de escopolamina en la corteza perirrinal o en el hipocampo dorsal deterioran la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo.

En la fase de muestra, todos los grupos mostraron tiempos de exploración similares para cada uno de los dos objetos idénticos. La prueba t de una muestra mostró que la preferencia por los objetos no fue diferente del nivel de oportunidad (0.5) en cada uno de los grupos ($p > 0.05$) (ver figura 16A y 16B, adquisición).

En la prueba a corto plazo, las ratas que fueron tratadas con solución vehículo tanto en la PRh como el HIP mostraron una preferencia estadísticamente significativa por explorar el objeto novedoso. Por otro lado los animales que fueron tratados con escopolamina, tanto en PRh como el HIP, no mostraron preferencia por explorar el objeto novedoso. Una ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo por el efecto del fármaco [$F(1,31) = 9.887, p < 0.01$], aunque sin diferencias entre las regiones cerebrales [$F(1,31) = 0.05, p = 0.95$] y sin interacción [$F(1,31) = 0.18, p = 0.73$].

Estos resultados muestran que la administración de escopolamina en la corteza perirrinal y en el hipocampo, inmediatamente después de la fase de muestra, afectan la memoria de reconocimiento a corto plazo. Es importante destacar que los tiempos totales de exploración (ver tabla 1A y 2A) para la prueba a corto plazo no revelaron diferencias significativas cuando las ratas fueron tratadas con solución salina o escopolamina, tanto en la corteza perirrinal o el hipocampo, indicando que la escopolamina no tuvo un efecto perjudicial en las habilidades motoras del animal o en su conducta exploratoria.

Estos resultados confirman el requerimiento de la señalización colinérgica tanto en el hipocampo como en la corteza perirrinal para la formación de la memoria de reconocimiento en el corto plazo.

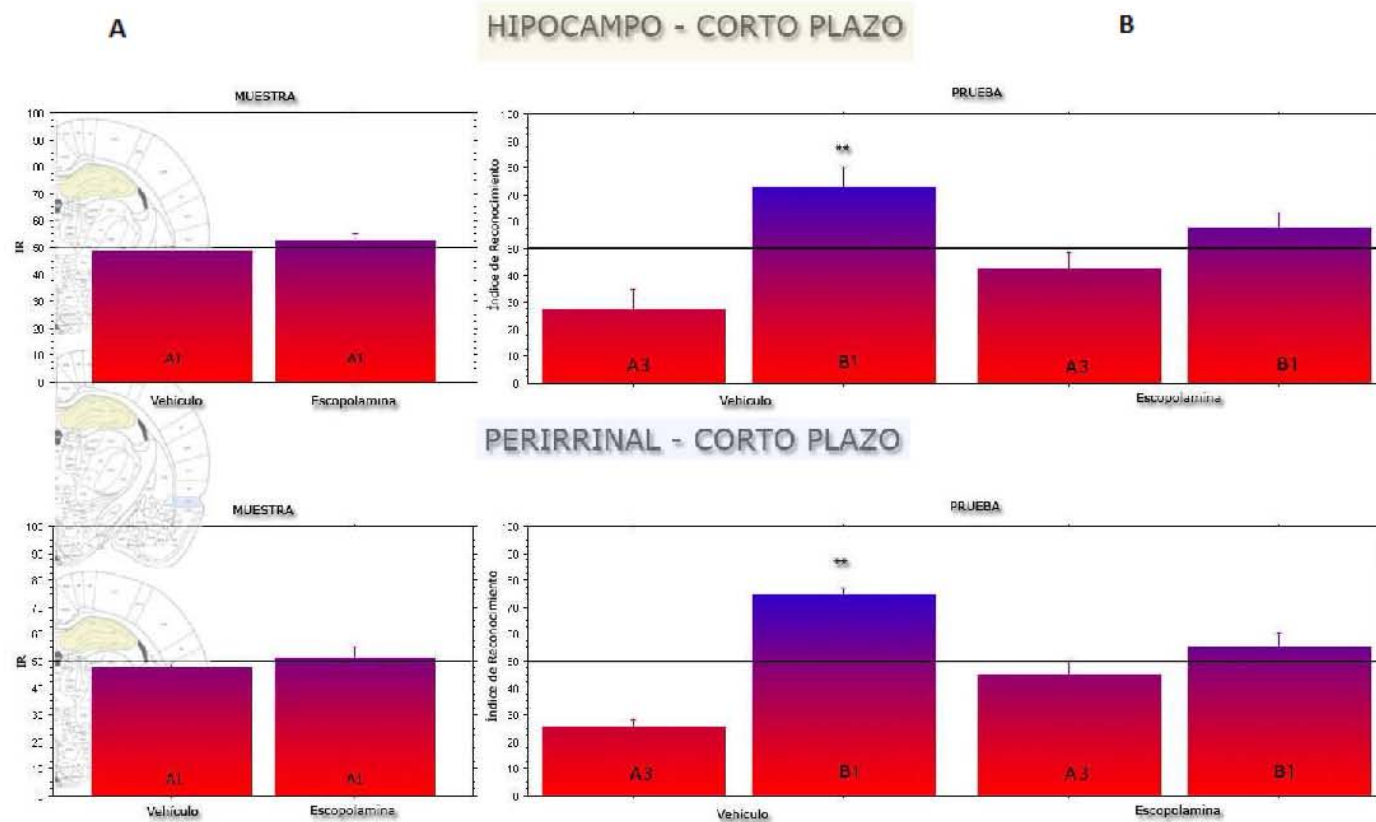
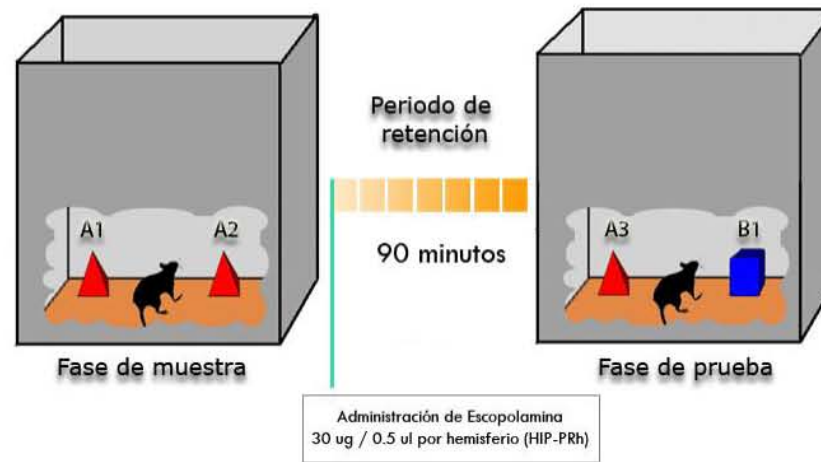


Fig. 16. Gráfica del índice de reconocimiento durante la fase de muestra y prueba a corto plazo. Los resultados indican que en la fase de muestra, todos los animales mostraron explorar ambos objetos (A1-A2) en tiempos similares. Durante la fase de prueba, aquellos animales tratados con solución vehículo mostraron un IR estadísticamente significativo del azar (que en la gráfica es visto como la línea que lo divide). En contraste, los animales tratados con escopolamina, tanto en el hipocampo como en la corteza perirrhinal, mostraron una conducta de reconocimiento que no fue diferente del azar.

Experimento 2. La administración de escopolamina en la corteza perirrinial, pero no en el hipocampo dorsal, deteriora la memoria a largo plazo.

En la fase de muestra, todos los grupos exploraron en tiempos similares cada uno de los dos objetos idénticos. La prueba t de una muestra mostró que la preferencia por los objetos no fue diferente del nivel de oportunidad (0.5) en todos los grupos ($p > 0.05$) (ver figura 17A y 17B, adquisición).

En la prueba de memoria a largo plazo, las ratas con microinfusión de solución salina mostraron una preferencia significativa por explorar el objeto novedoso sin importar la estructura cerebral. Por otro lado la administración de escopolamina en la corteza perirrinial afectó la preferencia por explorar el objeto novedoso, mientras que en el hipocampo no se deterioró la discriminación entre el objeto familiar y el novedoso. La prueba ANOVA de dos vías reveló que no existe un efecto principal por el fármaco [$F(1,34) = 2.17, p = 0.15$] o estructura [$F(1,34) = 0.40, p = 0.53$]. Sin embargo, un efecto por la interacción entre el fármaco y la estructura fue observado [$F(1,34) = 9.88, p < 0.01$]. La prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones pareadas, mostró que el grupo de escopolamina de la corteza perirrinial fue diferente del grupo control ($p < 0.01$); mientras que en el grupo de hipocampo escopolamina y vehículo no hubo diferencias ($p = 0.32$). Los tiempos totales de exploración a largo plazo no mostraron diferencias significativas con la salina o escopolamina tanto en la corteza perirrinial o el hipocampo (ver tabla 1B y 2B).

Los resultados indican que la corteza perirrinial está involucrada en la consolidación a largo plazo de la memoria de reconocimiento mediante la actividad muscarínica, mientras que el hipocampo no.

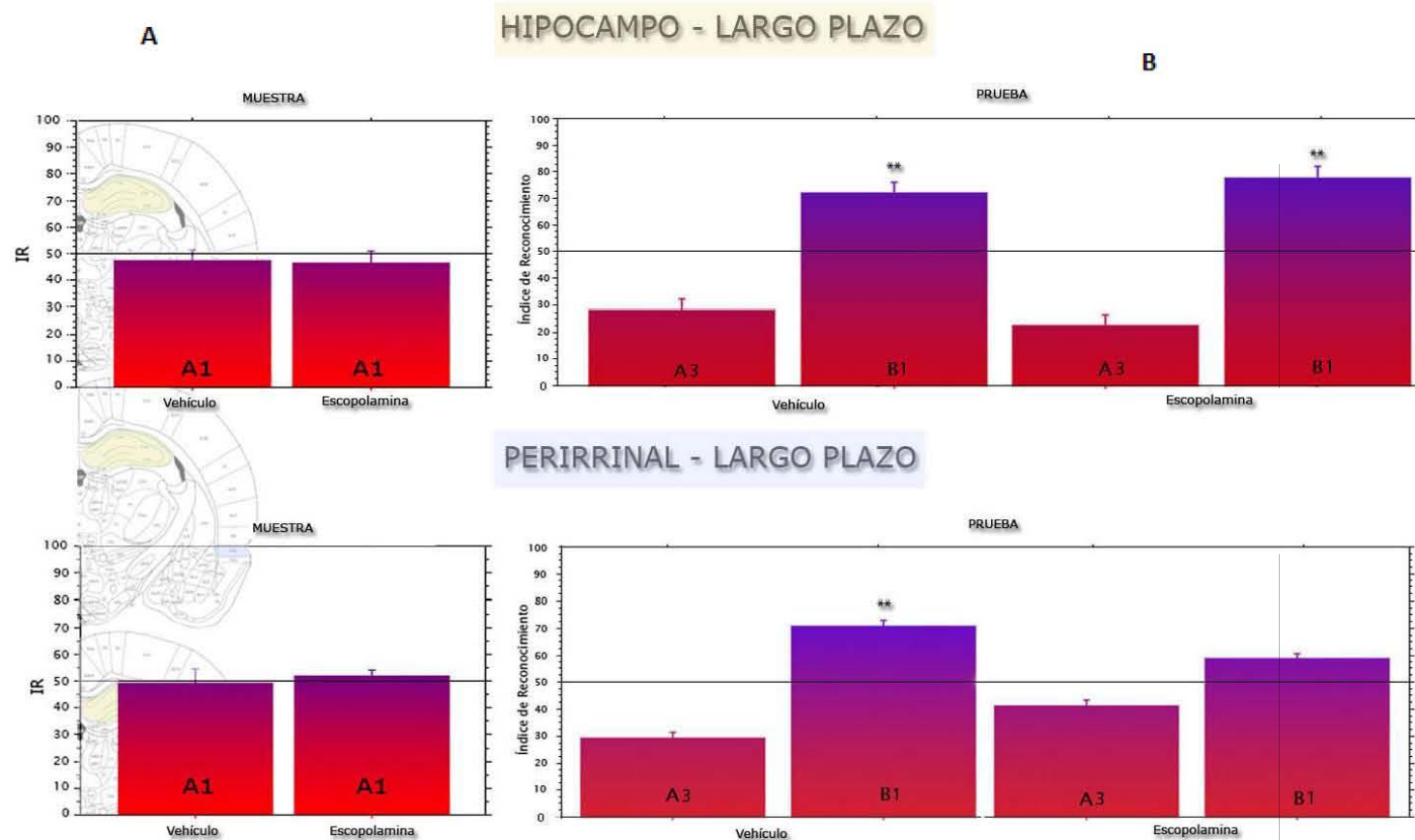
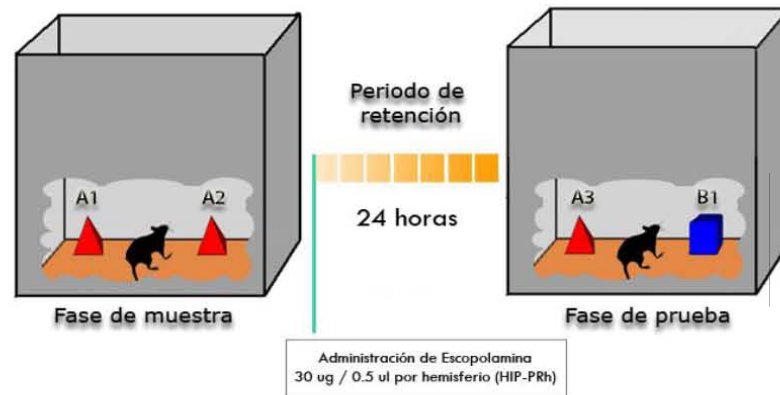


Fig. 17. Gráficas del índice de reconocimiento durante la fase de muestra y prueba a largo plazo. Los resultados indican que en la fase de muestra, todos los animales mostraron exploraron ambos objetos (A1-A2) en tiempos similares. Durante la fase de prueba, aquellos animales tratados con solución vehículo y con escopolamina en el hipocampo, mostraron un IR estadísticamente significativo del azar. Sin embargo, los animales que recibieron escopolamina en la corteza perirrhinal mostraron una conducta de reconocimiento al objeto novedoso (B1) que no fue diferente del azar.

Experimento 3. Infusiones 160 minutos después de la fase de muestra en la corteza perirrinal o el hipocampo dorsal no afectan la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos.

Para probar los efectos no específicos de la escopolamina, se administró escopolamina o solución vehículo 160 minutos después de la fase de muestra en la corteza perirrinal o el hipocampo dorsal y la prueba a largo plazo se realizó 24 horas después.

En la fase de muestra, todos los grupos mostraron tiempos similares de exploración de cada uno de los dos objetos idénticos.

La prueba t de una muestra no indicó preferencia por alguno de los objetos en alguno de los grupos ($p > 0.05$) (ver figura 15A y 15B, adquisición).

En la prueba a largo plazo todos los grupos pasaron un mayor tiempo estadísticamente significativo explorando el objeto novedoso. La ANOVA de dos vías no reveló efectos significativos del fármaco [$F(1,22) = 0.02, p = 0.89$], estructura [$F(1,22) = 0.02, p = 0.90$] o por la interacción del fármaco y la estructura [$F(1,22) = 1.70, p = 0.21$].

Los tiempos de exploración total (ver tabla 1C y 2C) de la prueba a largo plazo no tuvieron diferencias significativas entre las ratas tratadas con salina o escopolamina en la corteza perirrinal o el hipocampo. Estos resultados sugieren que la actividad de los receptores muscarínicos de la corteza perirrinal están involucrados en la formación a largo plazo de una memoria de reconocimiento, que se produce en las primeras dos horas y media.

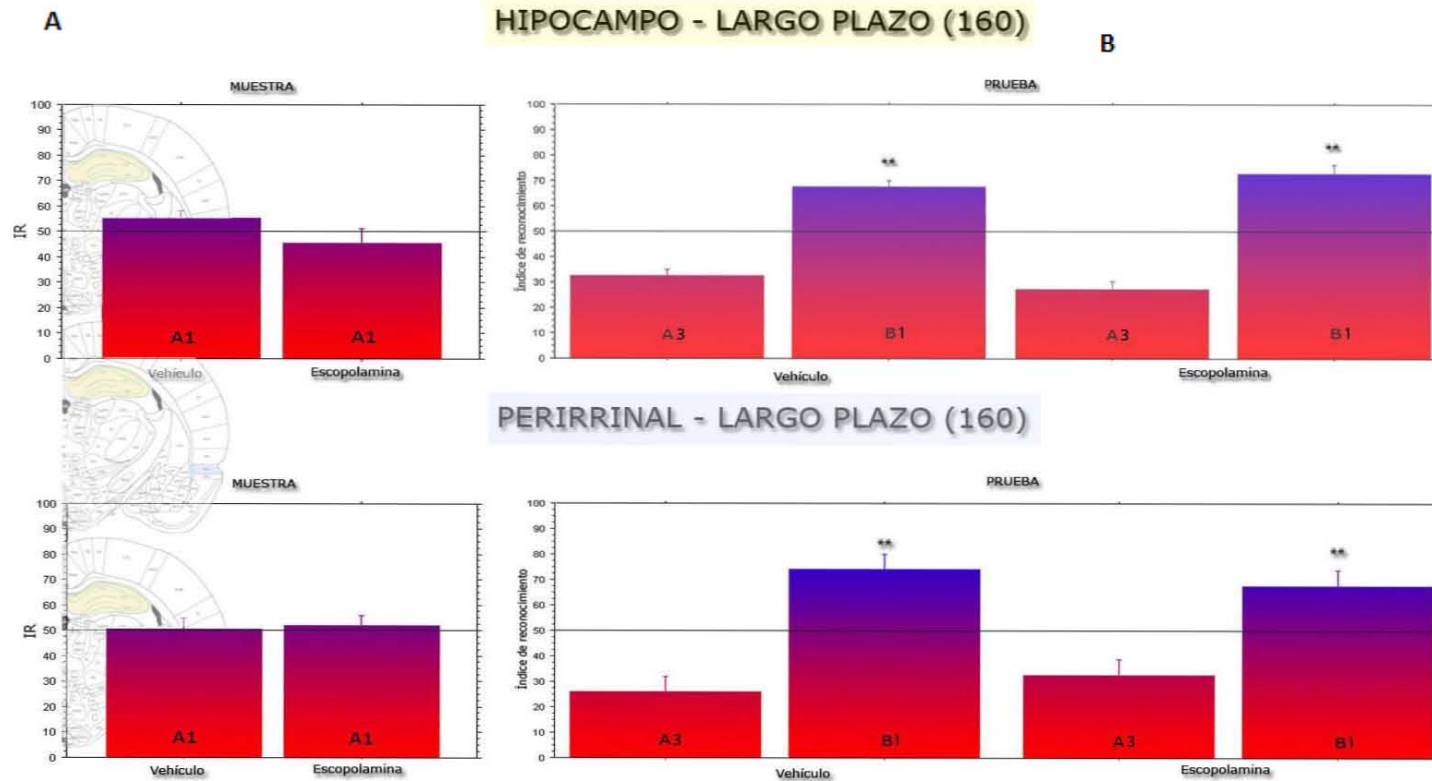
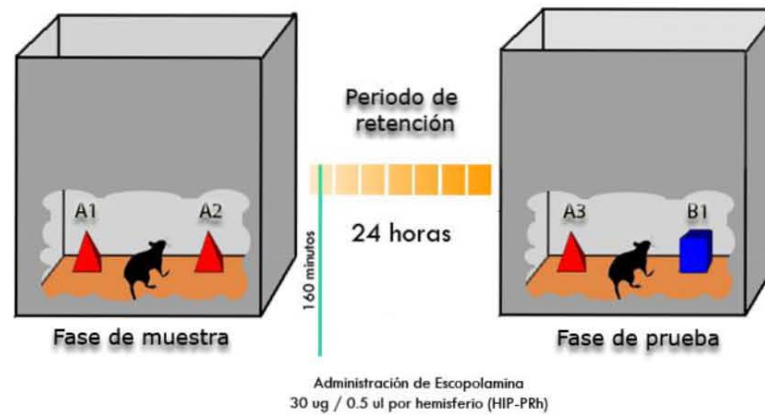


Fig. 18 Gráficas del índice de reconocimiento durante la fase de muestra y prueba a largo plazo 160 minutos. Los resultados indican que durante la fase de muestra, todos los animales reconocieron ambos objetos como novedosos pues los exploraron en proporciones que no fueron distintos del azar. Para la fase de prueba, el IR para el objeto novedoso de todos los grupos fue estadísticamente significativo del azar.

Corteza Perirrinal

Tiempo de exploración totales (segundos)

A B C

Corto plazo		Largo plazo		Largo plazo - 160	
Salina	Escopolamina	Salina	Escopolamina	Salina	Escopolamina
10.11 ± 2.6	12.40 ± 1.8	11.11 ± 2.0	11.55 ± 2.4	23.0 ± 2.0	25.3 ± 5.3
t = 0.72 p = 0.48		t = 0.14 p = 0.89		t = 0.41 p = 0.69	

Tabla 1. Tiempos totales de exploración en segundos. Ninguna de las pruebas estadísticas mostró diferencias significativas en los tiempos de exploración de todos los grupos tratados en la corteza perirrinal.

Hipocampo dorsal

Tiempo de exploración totales (segundos)

A B C

Corto plazo		Largo plazo		Largo plazo - 160	
Salina	Escopolamina	Salina	Escopolamina	Salina	Escopolamina
14.37 ± 3.1	8.25 ± 2.6	9.5 ± 2.	14.41 ± 2.4	17.8 ± 3.3	15.0 ± 1.6
t = 1.50 p = 0.16		t = 1.33 p = 0.20		t = 0.77 p = 0.46	

Tabla 2. Tiempos totales de exploración en segundos. Ninguna de las pruebas estadísticas mostró diferencias significativas en el tiempo de exploración de todos los grupos tratados en el hipocampo.

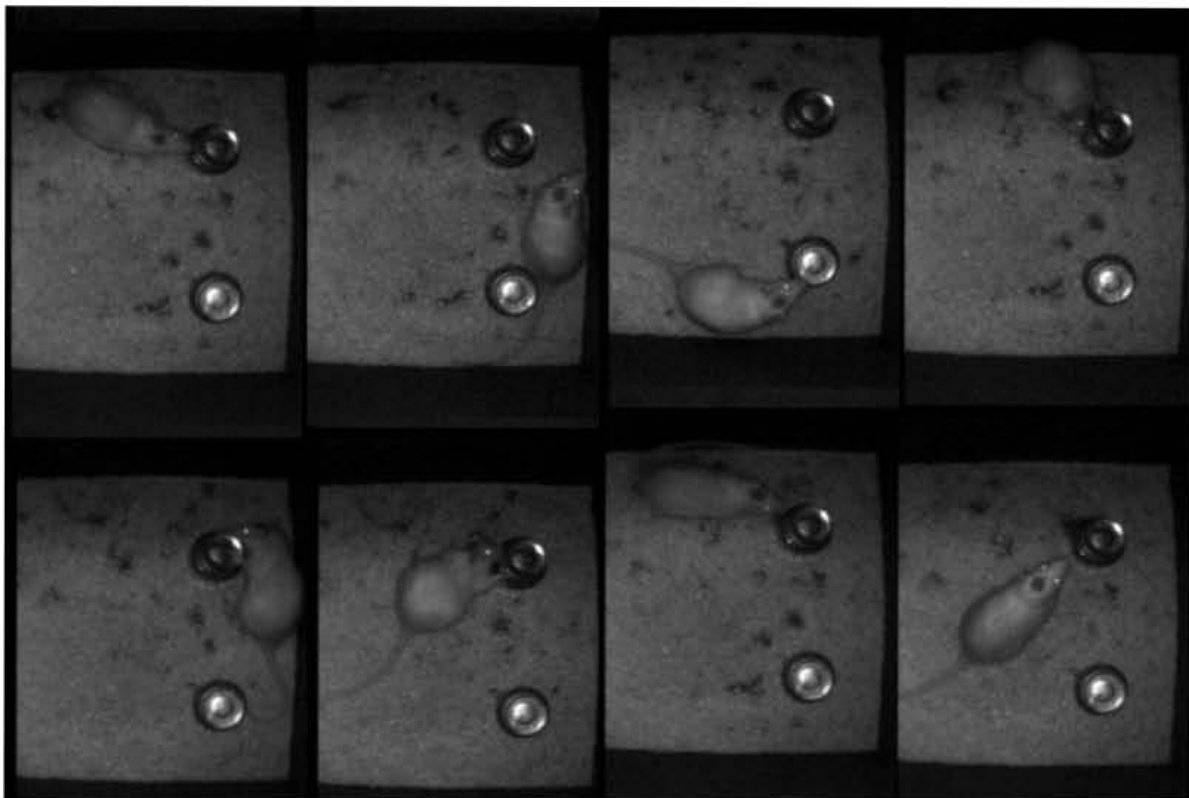
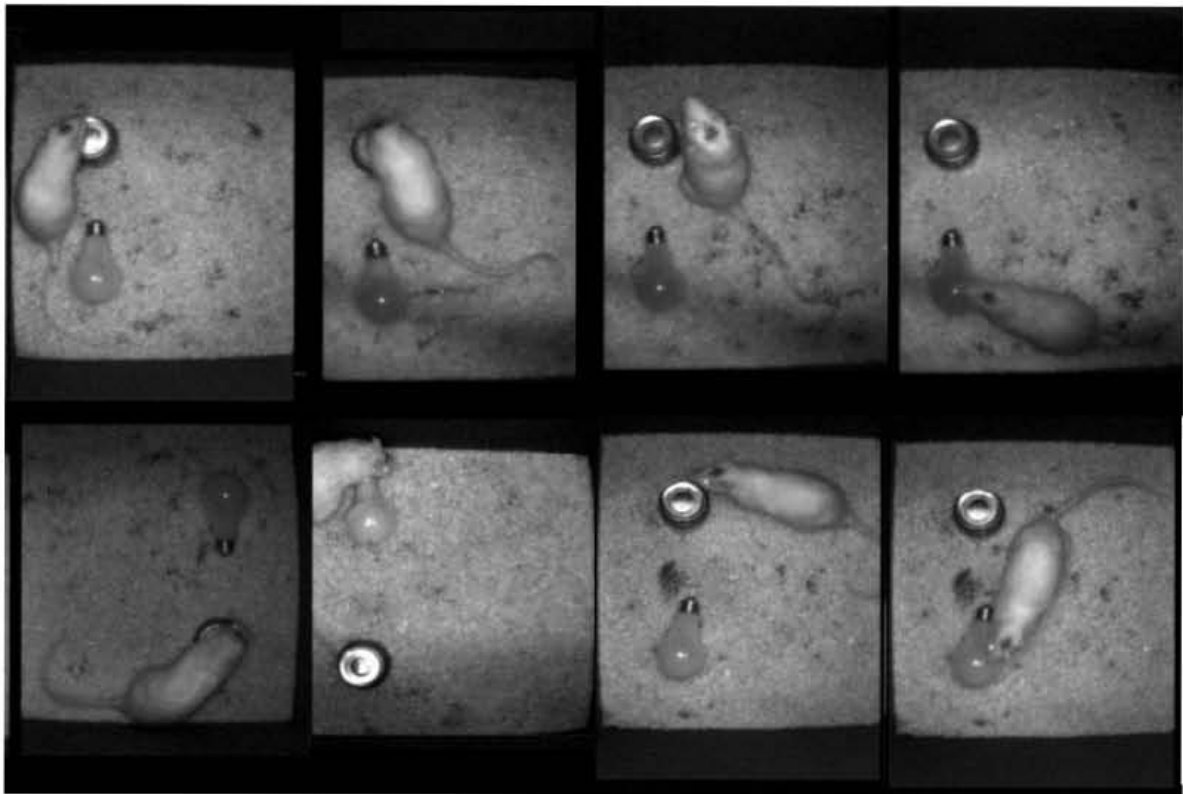


Fig. 19 Ejemplos de la conducta de la conducta exploratoria analizada en video.

DISCUSIÓN

El antagonista de los receptores muscarínicos, escopolamina, mostró que la actividad de éstos en la corteza perirrinal y el hipocampo, participan en la formación de la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo; sin embargo, su administración afectó el reconocimiento de los objetos a largo plazo solamente cuando se realizó en la corteza perirrinal mientras que en el hipocampo no tuvo efecto. Finalmente, la administración retrasada 160 minutos después de la fase de muestra, tanto en la corteza perirrinal como en el hipocampo, no tuvo efecto sobre la memoria a largo plazo.

Estos resultados contrastan con el estudio de Winters *et al.* (2006), en donde la administración de escopolamina facilitó el reconocimiento de objetos a largo plazo. En este estudio, el grupo inyectado con solución salina tuvo un índice de reconocimiento (IR) significativamente inferior al grupo que no fue manipulado farmacológicamente además de que no fue observada diferencia del IR entre el grupo escopolamina y el grupo que no recibió inyección, lo cual sugiere que el protocolo de inyección usado en este estudio pudo haber tenido un efecto perjudicial para la formación de la memoria de reconocimiento a largo plazo que fue bloqueado por la escopolamina. Las diferencias de los resultados entre ambos estudios pudieran explicarse a través de los protocolos experimentales utilizados: en el protocolo del trabajo de Winters *et al.* (2006) la fase de habituación se realizó durante dos minutos, mientras que en el presente trabajo la habituación fue durante cinco días. Es posible que los días adicionales de la habituación en el presente estudio, hayan ayudado a reducir el estrés inducido por el procedimiento de la manipulación farmacológica, pues se ha reportado que el nivel de alerta emocional (emotional arousal) inducido por la experiencia del entrenamiento, afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, debido a una sinergia entre la liberación de glucocorticoides y la activación noradrenérgica en la amígdala basolateral (Okuda *et al.*, 2004; Roozental *et al.*, 2006). Al respecto, también se ha reportado previamente que la amígdala basolateral no participa durante la consolidación de la memoria de reconocimiento debido a que el protocolo, similar al de esta tesis, induce un

mínimo de despertar emocional (Balderas et al., 2008). Por otra parte, este protocolo es útil para evaluar el reconocimiento de objetos a corto plazo (90 minutos) como a largo plazo (24 horas) (Bermúdez-Ratonni et al., 2005; Balderas et al., 2008).

Recientemente se ha reportado que la administración de escopolamina en la corteza perirrinal, antes de la fase de muestra, interrumpe la a memoria corto plazo (periodo de retención de 20 minutos) pero no a largo plazo (24 horas) (Tinsley et al., 2011). La discrepancia de estos resultados y los de este trabajo podrían ser por el hecho de que la administración, en el estudio de Tinsley, fue antes de la fase de muestra. Una explicación a esto es que la infusión intracerebral de cierto fármacos mantienen una disponibilidad óptima, una hora después de su administración (Day et al., 2003) por lo que la eficacia del fármaco pudo no deteriorarse y no bloquear a los receptores muscarínicos.

En otro estudio, Rossato y colaboradores demostraron que la síntesis de proteínas en el hipocampo era necesaria para la consolidación de una memoria de reconocimiento de objetos (Rossato et al., 2007). Contrario al protocolo usado en el presente estudio, Rossato utilizó dos diferentes objetos durante la fase de muestra, por lo que la información espacial para la posición específica de cada objeto en relación a la arena, podría ser relevante para proporcionar pistas contextuales, lo que explicaría la participación del hipocampo. Se ha reportado que la lesión del hipocampo deteriora la memoria de reconocimiento cuando hay cambios en las posiciones relativas de los objetos, pero no cuando un objeto novedoso es presentado (Mumby et al., 2002). De acuerdo con esto, Wan y su equipo demostraron que la proteína Fos se incrementa significativamente en la región CA1 del hipocampo, una hora y media después de cuando se presentan a la rata combinaciones espaciales novedosas de estímulos familiares, pero no cuando las ratas son expuestas solamente al estímulo novedoso (Wan et al., 1999).

En otro estudio, Balderas *et al.* (2008) demostró que la síntesis de proteínas en la corteza perirrinal, pero no en el hipocampo, es necesaria para la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Por otra parte, Warburton *et al.*

(2003) demostró que la novedad de un estímulo induce la expresión de la proteína Fos una hora y media después de la exposición al estímulo en la corteza perirrinal, pero no en el hipocampo. Además, la administración sistémica de escopolamina interrumpió la expresión de Fos producida por la novedad del estímulo en la corteza perirrinal sin que se afectaran los niveles basales de Fos en el hipocampo (Warburton, et al., 2003).

Se ha postulado que una serie de eventos moleculares que conllevan la síntesis de proteínas, conducen a cambios en las propiedades de las neuronas. Tales eventos incluyen la activación de cascadas de segundos mensajeros, de los reguladores transcripcionales y múltiples olas de ARNm mensajero; algunas proteínas producen cambios funcionales en las neuronas y sus sinapsis, mientras otras conducen a cambios estructurales (McGaugh, 2000); los cambios en las propiedades de las neuronas son mediados por la expresión de genes, contenidos en cada célula del organismo. En el caso de las neuronas, es posible que los cambios neuroquímicos sean el primer paso de una señalización que conduce a cambios morfológicos en el ensamblaje de redes neuronales (Degroot *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos se inclinan en apoyar que este primer paso, y que sirve para la consolidación de la memoria de reconocimiento a largo plazo, es señalizado por la actividad colinérgica de la corteza perirrinal a través de sus receptores muscarínicos.

Cinco subtipos diferentes de receptores muscarínicos han sido caracterizados (Caulfield, 1993). Aunque en un principio solamente se lograron diferenciar tres subtipos de receptores (M1, M2 y M3), con el desarrollo de métodos moleculares más precisos (Yasuda et al., 1992) se pudo acordar que existen cinco receptores acoplados a proteína G: los M1, M3 y M5 acoplados a Gq, la cual activa la enzima fosfolipasa mientras que los M2 y M4 se encuentran acoplados a Gi/o y puede afectar la ciclase de adenilato o a varios canales iónicos (Conn et al., 2009). Los receptores M2 y M4 están localizados en la membrana presináptica (Caulfield, 1993) donde actúan como autorreceptores que ayudan a reducir la liberación de neurotransmisores (Bymaster et al., 2003).

Otros estudios de biología molecular han revelado que existen, por lo menos, cinco diferentes genes responsables de la expresión de los receptores muscarínicos llamados m1, m2, m3, m4 y m5 (Bonner et al., 1987, 1988 y Siegel, 2003). Cada sub-receptor tiene su propio rol funcional que se encuentra reflejado en las diferencias de su distribución fisiológica, que pudo ser determinada utilizando técnicas de ARNm y anticuerpos específicos de cada subtipo de receptor (ver tabla 3).

Al parecer los receptores M1 y M5 están localizados predominantemente en el cerebro aunque también los M1 han sido observados en el conducto deferente (Caulfield, 1993). Por otra parte, los receptores M2, M3 y M4 parecen estar distribuidos por todo el cuerpo y en el cerebro, pero en menor densidad. Dado a que la escopolamina no tiene preferencia especial por algún subtipo de receptor muscarínico, el bloqueo de estas subunidades afectaría a varias funciones fisiológicas. Sin embargo es probable que por la distribución específica de los receptores muscarínicos, la administración intra-cerebral de escopolamina y sus déficits cognitivos estarían relacionados al bloqueo del receptor M1 (Caulfield, 1993).

Área del cerebro	M1	M2	M3	M4	M5
Distribución central de los subtipos de receptores muscarínicos					
Septúm/ Cerebro anterior basal		XX			
Corteza	XX		X	X	
Hipocampo	XX	X	X	X	X
Amígdala	X				
Corteza Estriada	X	X	X	XX	

X: baja/ moderada expresión de RNAm o inmunoprecipitación. XX: alta / fuerte expresión de RNA, o inmunoprecipitación

Tabla 1. Distribución de los diferentes subtipos de receptores en el cerebro; debe señalarse que no hay una distinción de la técnica utilizada para identificarlos, sea RNAm o técnicas de anticuerpo. (Modificado y adaptado de Caulfield, 1993)

Los resultados de esta tesis, aunque no son conclusivos respecto al debate de las funciones disociables entre el hipocampo y la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento, aportan perspectivas a considerar. Por ejemplo, existe evidencia de que no solamente la corteza perirrinal se involucra en la formación de la memoria de reconocimiento, sino también la corteza insular. Resultados del laboratorio de memoria y aprendizaje del Instituto de Fisiología Celular, muestran que la atenuación a la neofobia, un tipo de memoria de reconocimiento al sabor, se pudo deteriorar tras las administraciones de escopolamina post-adquisición tanto en la corteza perirrinal (Gutierrez et al., 2004) como en la corteza insular (Gutierrez et al., 2003). Estos resultados y el hecho de que el bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular también afecta la formación del reconocimiento a largo plazo (Bermudez-Rattoni et al., 2005), sugieren la posibilidad de que la actividad de los receptores muscarínicos en estas cortezas, sea un requisito para la formación de las memorias de reconocimiento, independientemente de su modalidad sensorial.

En relación con la actividad del hipocampo dorsal en la memoria de reconocimiento a corto plazo, ha sido postulado que los campos CA, el giro dentado y complejo subicular del hipocampo forman parte del sistema de estructuras anatómicas del lóbulo temporal medial, que son importantes para la memoria en los mamíferos (Squire, 1991). Además, el hipocampo es la etapa final de convergencias del lóbulo temporal medial; ésta recibe proyecciones de las cortezas adyacentes como la corteza perirrinal y parahipocámpal-postrinal así como también de la corteza entorrinal (Lavenax & Amaral, 2000). Estas relaciones anatómicas podrían explicar la relación de la actividad hipocámpica en la memoria de reconocimiento. Aunque se ha postulado que esta estructura es importante para las tareas que dependen de la combinación de múltiples fuentes incluyendo aquéllas donde también es requerida la información espacial, hay evidencia de su participación a largo plazo en la memoria de reconocimiento. En esta tesis, la participación del hipocampo en la memoria de reconocimiento solamente se encontró a corto plazo.

Estudios con microdialisis *in vivo* en ratas, han demostrado que la exposición a ambientes novedosos, o sabores novedosos, producen una liberación significativa de acetilcolina cortical pero no de glutamato o GABA (Giovannini et al. 2001; Miranda et al. 2000, 2002; Degroot et al., 2005) sin embargo, después de varias presentaciones del mismo ambiente o sabor, la liberación de acetilcolina decrece significativamente hasta que regresa a sus niveles basales, sugiriéndose una relación inversa entre la familiaridad y la liberación de acetilcolina cortical (Bermudez-Rattoni, 2005). También ha sido demostrado que las inyecciones de escopolamina en la región CA3 del hipocampo deteriora tareas de reconocimiento de objetos tanto espaciales como no espaciales cuando la memoria es examinada a corto plazo (3 minutos) (Hunsaker *et al.*, 2007). Meeter *et al.* (2004) proponen un modelo de conexiones estructurales que incluyen a la corteza entorrinal, el giro dentado, CA3, CA1 y el septum medial y en los cuales los niveles altos de Acetilcolina permitirían la adquisición de nueva información mientras que la baja de ACh la evocación de la información. La entrada colinérgica induce una amplia gama de efectos fisiológicos que incluyen la supresión de la transmisión sináptica, tanto excitatoria como inhibitoria, la supresión de la adaptación neuronal, la despolarización de la células piramidales e interneuronas, y también el fortalecimiento en las modificaciones sinápticas (Hasselmo, Wible y Wallenstein, 1996). La supresión de la actividad de las intrínseca conexiones excitatorias son primeramente mediadas por los mecanismos de los receptores muscarínicos, mientras que la activación de los receptores nicotínicos, fortalecen la transmisión en las sinapsis a nivel talamocortical (Gionni et al., 1999). Hasselmo y Bower (1993) proponen que los efectos colinérgicos fomentan la adquisición de nueva información, facilitando los cambios plásticos asociados con la entrada de información y suprimiendo la interferencia de otra información adquirida previamente.

Los hallazgos del presente estudio sugieren que los receptores muscarínicos de la corteza perirrinal y el hipocampo juegan un papel importante en la señalización de la novedad del estímulo en la fase inicial del proceso de reconocimiento. Estos resultados también sugieren que la corteza perirrinal, pero no el hipocampo, comparte mecanismos tanto para el procesamiento a corto plazo como a largo

plazo de la memoria de reconocimiento. También sugieren que los primeros pasos para la formación de la memoria de reconocimiento requieren de la neurotransmisión colinérgica, a través de los receptores muscarínicos, de zonas neo y arquicorticales del lóbulo temporal medial con lo cual la información continuaría disponible durante un periodo corto de tiempo. El sistema muscarínico del hipocampo podría suprimirse, pero el de la perirrinal continuaría como el mecanismo que almacena la información a largo plazo durante fases posteriores. Posiblemente por esto, la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo no afecta la memoria de reconocimiento de objetos si no existen componentes contextuales (Balderas et al., 2008).

Recientemente ha sido demostrado que el hipocampo, la corteza perirrinal y la corteza prefrontal son partes de una red neuronal necesaria para el recuerdo del componente temporal/recencia en la tarea de reconocimiento de objetos que es independiente de la familiaridad o la información espacial (Barker, y Warburton, 2011).

CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis apuntan a que la corteza perirrinal y el hipocampo trabajan en paralelo para retener a corto plazo la información relevante para la memoria de reconocimiento; sin embargo el almacenamiento de esta información a largo plazo requiere solamente de la actividad de la corteza perirrinal mientras que el hipocampo no es requerido, posiblemente a que su actividad declina después de detectar un cambio en la familiaridad del contexto ocasionado por la novedad del estímulo.

REFERENCIAS

- Bailey C., Bartsch D., Kandel E. (1996) "Toward a molecular definition of long term memory storage" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (24) 13445-13452.
- Balderas, I., Rodriguez C., Salgado P., Chavez J., McGaugh J., Bermudez F. (2008) "The consolidation of object and context recognition memory involves different regions of the temporal lobe" *Learning & Memory* (15): 618-624.
- Barker, G. R. & Warburton, E. C. (2011) "When is the hippocampus involved in recognition memory?" *Journal of Neuroscience*, 31, 10721-10731.
- Bermúdez F. y Prado Alcalá (2001) "Memoria: dónde reside y cómo se forma". México: Trillas.
- Bermudez, F., Okuda S., Roozendaal B. y McGaugh J. (2005) "Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory" *Learning & Memory* 12. 447-449.
- Bermúdez F. y Yamamoto T. (1998) "Conditioned taste aversión: Memory of a special kind". *Oxford University Press*.
- Bolden, C., Cusack, B., Richelson, E. (1992). "Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells". *The Journal of Pharmacology* 260: 576-580.
- Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C., Brann, M.R., (1987) "Identification of a family of muscarinic receptor genes". *Science* 237 (4818), 527-532.
- Bonner, T.I., Young, A.C., Bran, M.R., Buckley, N.J. (1988) "Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes" *Neuron* 1(5): 403-410.
- Buffalo, E.A., Ramus, S.J., Clark, R.E., Teng, E., Squire, L.R., Zola, S.M., (1999) "Dissociation between the effects of damage to perirhinal cortex and area TE". *Learning & Memory*. 6, 572-599.

Burwell, R.D., Amaral, D.G., (1998) "Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex". *Journal of Comparative Neurology* 391, 293–321.

Caulfield, M.P., (1993) "Muscarinic receptors—characterization, coupling and function". *Pharmacy & Therapy* 58, 319–379.

Conn, P.J., Jones, C.K., Lindsley, C.W., (2009). "Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders". *Cell* 30 (3): 148–155.

Corkin P., Amaral D., González G. (1997) " H.M.'s Medial Temporal Lobe Lesion: Findings from Magnetics Resonance Imaging" *The Journal of Neuroscience* 17(10):3964-3979.

Day, M., Langston, R. & Morris, R. G. (2003) "Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning". *Nature*, 424, 205-209.

Degroot A., Wolff M. y Nomikos G. (2005) "Acute exposure to a novel object during consolidation enhances cognition". *Neuroreport* 16 (1). 63-67.

Dickerson B., Eichenbaum H. (20120) "The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders" *Neuropsychopharmacology* 35: 86-104

Ebert, U., Kirch, W. (1998) "Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance". *European Journal of Clinical Investigation* 28, 944–949.

Ennaceur, A., Delacour, J., (1988) "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data" Behavioral. *Brain Research* 31, 47–59.

Flood, J.F., Cherkin, A., (1986) "Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia?" *Behavioral and Neural Biology* 45, 169–184.

Gioanni Y., Rougeot C., Clarke P., Lepouse C., Thierry A., Vida C. (1999) "Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission" *European Journal of Neuroscience* 11: 18-30.

Giovannini, M.G., Rakovska, A., Benton, R.S., Pazzagli, M., Bianchi, L., y Pepeu, G. (2001) "Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats". *Neuroscience* 106: 43-53.

Greene, A., Gross W., Elsinger C., Rao S. (2006) "An fMRI analysis of the human hippocampus inferences, context and Task Awareness". *Journal of Cognitive Neuroscience* 18 (7) 1156-1173.

Gutierrez, R., Tellez, L. A. & Bermudez-Rattoni, F. (2003) Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1556-1562.

Gutierrez, R., De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C.J., Bermudez-Rattoni, F. (2004) "Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation". *Learning & Memory* 11 (1), 95-101.

Hasselmo M. (1994) "Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior" *Behavioural Brain Research* 67: 1-27

Hasselmo M., Wyble B., Wallenteis G. (1996) "Encoding and Retrieval of Episodic memories: Role of Cholinergic and GABAergic MOdulation in the Hippocampus". *Hippocampus* 6: 693-708

Hasselmo, M., 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

Hasselmo, M., Bower J. (1993) "Acetylcholine and memory" *Trends Neuroscience* 16: 218- 222.

Henke, K. (2010) "A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness" *Nature Reviews Neuroscience*, 11 : 523-532.

Hunsaker, M. R., Rogers, J. L. & Kesner, R. P. (2007) Behavioral characterization of a transection of dorsal CA3 subcortical efferents: comparison with scopolamine and physostigmine infusions into dorsal CA3. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88, 127-136.

Klinkenberg I., Blokland A. (2010) "The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34: 1307-1350.

Lavenex P., Amaral D. (2000) "Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity". *Hippocampus* 10 (4): 420-430

McGaugh, J. (2000) "Memory- a century of consolidation". *Science*, 287. 248-251

Meeter, M., Murre, J.M. y Talamini, L.M., (2004) "Mode shifting between storage and recall based on novelty detection in oscillating hippocampal circuits". *Hippocampus* 14, 722-741.

Miranda, M.I., Ramirez-Lugo, L., y Bermudez-Rattoni, F. (2000). "Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus". *Brain Research* 882: 230-235.

Miranda, M.I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L., y Bermudez-Rattoni, F. (2002) "Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 11417- 11422.

Mishkin, M., Delacour, J., (1975) "An analysis of short-term visual memory in the monkey". *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 1, 326-334.

Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E. & Lehmann, H. (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learning & Memory*, 49-57.

Murray, E.A., Mishkin, M., (1998) "Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus". *Journal of Neuroscience*. 18, 6568–6582.

Okuda, S., Roozendaal, B. & McGaugh, J. L. (2004) Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. " *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 853-858.

Paxinos, G. & Watson C. (1986) "The rat brain in stereotaxic coordinates" (3rd ed.) San Diego: Academic Press.

Roozendaal, B., Okuda, S., Van der Zee, E. A. & McGaugh, J. L. (2006) Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. " *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 6741-6746.

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I. & Cammarota, M. (2007) "On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory". *Learning & Memory*, 14: 36-46.

Schacter, D. & Tulving E (1994). *Memory systems 1994* (2 ed). Massachusetts: MIT Press.

Scoville, W.B., Milner, B., (1957) "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions". *Journal of Neurology Neurosurgeon Psychiatry* 20: 11–21.

Siegel G. (2003) "Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects". 7ma edición. Canadá: Academic Press.

Squire, L.R., Zola-Morgan, S., (1991) "The medial temporal lobe memory system". *Science* 253, 1380–1386.

Sugar J., Witter M., van Strien N., Cappaert L.(2011) "The retrosplenial cortex: intrinsic connectivity and connections with the (para)hippocampal region in the rat. An interactive connectome" *Frontiers in Neuroinformatics* 5:7

Tinsley, C. J., Fontaine-Palmer, N. S., Vincent, M., Endean, E. P., Aggleton, J. P., Brown, M. W. & Warburton, E. C. (2011)"Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex". *Learning & Memory* 18: 484-492.

Tulving, E., and Schacter, D.L. (1990) "Priming and human memory systems". *Science* 247: 301–306.

Wan, H., Aggleton, J. P. & Brown, M. W. (1999) "Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory". *Journal of Neuroscience* 19: 1142-1148.

Warburton, E.C., Koder, T., Cho, K., Massey, P.V., Duguid, G., Barker, G.R., Aggleton, J.P., Bashir, Z.I. y Brown, M.W., (2003). "Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory". *Neuron* 38: 987–996.

Winters, B., Forwood, S., Cowell R., Saksida L y Bussey, T. (2004) "Double Dissociation between the Effects of Peri-Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe". *Journal of Neuroscience* 30: 5901-5908

Winters, B.D., Saksida, L.M. y Bussey, T.J., (2006) "Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: implications for cholinergic system function". *Journal of Neuroscience* 26: 9520–9529.

Winters B., Saksida L. y Bussey T. (2008) "Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32: 1055-1070

Yasuda, R.P., Ciesla, W., Flores, L.R., Wall, S.J., Li, M., Satkus, S.A., Weisstein, J.S., Spagnola, B.V., Wolfe, B.B., (1992) "Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain". *Molecular Pharmacology* 43 (2): 149–157.

Zola-Morgan, S., Squire, L.R. y Amaral, D.G., (1989) "Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair memory or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation". *Journal of Neuroscience* 9: 1922–1936.

Zola-Morgan, S. y Squire L. R. (1985) "Medial temporal lesions in monkeys impair memory in a variety of tasks sensitive to human amnesia". *Behavioral Neuroscience* 99: 22-34.

Zola-Morgan S. y Squire L. R. (1993) "Neuroanatomy of memory" *Annual Review of Neuroscience*. 1993. 16:547-43.