



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
ESCOPOLAMINA SOBRE LA  
GENERALIZACIÓN DE ESTÍMULOS  
AUDITIVOS Y LA DISCRIMINACIÓN DE  
SECUENCIAS AUDITIVAS CON DEMORA”**

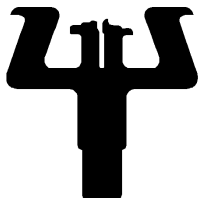
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**  
P R E S E N T A:  
**IVONNE PALMA CABRERA**

**DIRECTOR DE TESIS:** DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO

**REVISOR DE TESIS:** DR. OSCAR ZAMORA AREVALO

**SINODALES:** DR. GUSTAVO BACHÁ MÉNDEZ  
DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO  
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA



® **Facultad  
de Psicología**

MÉXICO, D.F. 2015.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

“We are who we are because of what we learn and what we remember”

Eric Kandel

## DEDICATORIAS

*A mis padres Kitzia y Rene por ser el pilar más importante en mi formación y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. Por los valores que me han enseñado, por ser un gran ejemplo. Por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y así poder cumplir cada uno de mis sueños y objetivos. Este logro es tan suyo como mío.*

*A mi esposo, Benjamín. Por haberme apoyado en todo momento. Por sus consejos, por no permitir que me rindiera en este proceso, pero más que nada, por su amor que es mi motor.*

*A mis hermanos Kitzita, Abraham y Gabriela, que con su cariño me han motivado a salir adelante y ser un buen ejemplo en sus vidas. Gracias por su paciencia, por preocuparse por su hermana mayor, gracias por compartir sus vidas, pero sobre todo, gracias por estar presentes en este momento tan importante en mi vida.*

*A mis amigos, Ale Pingüino, David Hernández, Jaqueline, Martín. Compañeros de estudio y todas esas personas maravillosas con las que he tenido el placer de coincidir en esta ruta. Gracias por cada uno de los momentos que compartimos y ese pedacito de ustedes que dejaron en mí.*

*A mis maestros, César, Oscar y Olga, gracias por sus enseñanzas y conocimientos que tuvieron a bien compartir conmigo. A los miembros del sínodo quienes compartieron conmigo su tiempo para leer esta tesis.*

*A toda mi hermosa familia. A mi abuela Esperanza por su amor y cuidados, a mis tías Ericka, Hilda, Argelia y Guadalupe, a mis tíos Heriberto, Carlos, Fernando, Ruben y Marco a todos mis primos. A mis cuñados quienes me han dado su apoyo y cariño. Gracias a todos por estar en este y cada uno de los momentos importantes de mi vida.*

*Y de forma muy especial a ti, abuelo Pánfilo (QEPD). Desde que era niña me hiciste soñar con este momento. Sé que estás presente en este y cada uno de mis logros.*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ACETILCOLINA.....	8
2.1. Biosíntesis y liberación .....	8
2.2. Receptores colinérgicos .....	9
2.3. Organización anatómica del sistema colinérgico .....	12
2.4. Vías de distribución y proyección colinérgica.....	14
2.5. Acetilcolina, aprendizaje y memoria .....	15
3. ESCOPOLAMINA.....	19
3.1. Propiedades generales de la escopolamina.....	19
3.2. Escopolamina y memoria .....	20
4. APRENDIZAJE TEMPORAL.....	22
5. JUSTIFICACIÓN .....	23
6. OBJETIVOS GENERALES .....	25
6.1. Objetivos específicos.....	25
6.2. Hipótesis generales .....	26
7. MÉTODO .....	27
7.1. Sujetos .....	27
7.2. Instrumentos y materiales .....	27
7.3. Fármacos .....	28
7.4. Procedimiento conductual experimento I.....	28
7.4.1. Manipulaciones iniciales .....	28
7.4.2. Moldeamiento.....	28
7.4.3. Discriminación de tonos de distinta duración.....	29
7.4.4. Generalización .....	30
7.4.5. Pruebas farmacológicas .....	30
7.5. Experimento II: Discriminación de secuencias .....	31

7.5.1. Evaluación con demoras .....	32
7.5.2. Pruebas Farmacológicas.....	32
7.6. Análisis de datos.....	34
8. RESULTADOS .....	36
8.1. Experimento I: bisección temporal.....	36
8.1.1. Adquisición.....	36
8.1.2. Generalización .....	37
8.1.3. Generalización con escopolamina .....	37
8.1.4. Efecto sobre la pendiente.....	39
8.1.5. Efecto sobre el valor mínimo de la curva.....	40
8.1.6. Efecto sobre el valor máximo de la curva .....	41
8.1.7. Tasa de respuestas .....	41
8.2. Experimento II: discriminación de secuencias.....	43
8.2.1. Adquisición.....	43
8.2.2. Discriminación de secuencias con demoras interestímulos.....	44
8.2.3. Escopolamina y discriminación de secuencias con demoras .....	45
8.2.4. Efecto farmacológico sobre el índice de discriminación.....	47
8.2.5. Efecto sobre el valor mínimo de la curva.....	49
8.2.6. Efecto sobre el valor máximo de la curva .....	50
8.2.7. Efecto sobre la pendiente.....	51
8.2.8. Efecto sobre la tasa de respuesta.....	52
9. DISCUSIÓN.....	54
10. CONCLUSIONES.....	62
11. REFERENCIAS .....	63

## RESUMEN

Un gran número de investigaciones han demostrado la participación del sistema colinérgico en procesos de aprendizaje y memoria (Fibiger, 1991; Klinkenberg y Blokland, 2010). No obstante, la experimentación conductual y neurobiológica sobre la participación del sistema colinérgico en tareas de discriminación de las propiedades temporales de estímulos auditivos es poco concluyente (Meck, 1996; Mincses et al., 2013).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la participación del sistema colinérgico muscarínico en la discriminación y generalización de estímulos auditivos de distinta duración, así como en la discriminación de secuencias auditivas con demoras variables. Inicialmente se entrenó a ratas de la cepa Wistar (n=17) a discriminar entre dos tonos de diferente duración (2 y 8 s) a través de una tarea operante de bisección temporal. Una vez que los sujetos alcanzaron el criterio de discriminación, fueron asignados a dos grupos.

En el primer grupo (n= 10) se realizaron pruebas de generalización con duraciones intermedias del estímulo (2.52, 3.27, 4.0 y 6.0 s), posteriormente se evaluó el efecto de la administración (i.p.) del antagonista colinérgico escopolamina (0.0, 0.2, 1.0 y 2.0 mg /Kg). Los resultados obtenidos demostraron un efecto dosis dependiente, con diferencias significativa entre las condiciones control y las diferentes dosis administradas de escopolamina.

En el segundo grupo (n=7), se procedió al entrenamiento en discriminación de secuencias de estímulos conformadas por cuatro combinaciones de dos tonos de diferente duración (2-4, 4-2, 4-8 y 8-4 s). Posteriormente se introdujeron demoras variables (0, 3, 8, 15, 23, y 30 s) entre los dos estímulos componentes de cada secuencia y se evaluó el efecto de las dosis anteriormente descritas de escopolamina sobre las curvas de retención. Los resultados mostraron nuevamente un efecto significativo y dosis dependiente.

El presente estudio sugiere una importante participación de los receptores muscarínicos en la discriminación, generalización y procesos de memoria auditiva.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los organismos se enfrentan cotidianamente a un ambiente dinámicamente complejo, ante lo cual han desarrollado la capacidad de discriminar y recordar las distintas condiciones ambientales bajo las cuales se incrementa la probabilidad de obtener consecuencias positivas, así como conductas que garanticen la supervivencia de la especie en función de estas condiciones ambientales.

Uno de los principios aplicados al comportamiento es que la conducta se encuentra guiada por el control que los estímulos ejercen sobre la misma. Lo cual significa que después de que respuestas conductuales han sido reforzadas en presencia de determinado estímulo, la frecuencia de estas respuestas será alta en presencia de dicho estímulo y baja en su ausencia (Reynolds, 1968). Desde esta perspectiva, la discriminación y generalización de estímulos son dos formas experimentales para abordar el control que ejercen los estímulos sobre la conducta de los organismos (Domjan, 2010).

La discriminación de estímulos ha sido definida como el proceso por el cual un organismo aprende a restringir el rango de características del estímulo ante el cual responder, emitiendo respuestas diferenciales ante la presencia de distintos estímulos denominados como estímulos discriminativos (Domjan, 2010; Reynolds, 1961). La capacidad de discriminar estímulos es fundamental en la supervivencia de un organismo, el cual de acuerdo a su repertorio conductual elige, por ejemplo, responder mediante la huida ante la presencia de un depredador y no ante la presencia de alimento.

La generalización de estímulos se presenta cuando un organismo responde de manera similar a dos o más estímulos que comparten propiedades o características físicas similares (Domjan, 2010; Guttman y Kalish, 1956). Los gradientes de generalización proporcionan información acerca de la sensibilidad de la conducta del organismo ante las variaciones de un aspecto concreto del ambiente.



El tiempo y el espacio son dimensiones fundamentales para nuestra existencia y de hecho se sabe que los organismos son capaces de controlar su conducta dependiendo el paso del tiempo. En este sentido, una conducta eliciteda por el paso del tiempo como estímulo discriminativo define una conducta de discriminación temporal.

Una pregunta importante ha sido, una vez que los organismos han adquirido la tarea de discriminación, ¿cómo pueden recordar y mantener la información durante los intervalos de retención? Desde la perspectiva neurobiológica existen numerosos estudios experimentales que han abordado los procesos de aprendizaje y memoria, dando como resultado la identificación de distintas estructuras neuroanatómicas y sistemas de neurotransmisión que resultan críticos para la correcta ejecución de distintas tareas que involucran la participación de estos sistemas cognitivos.

El sistema colinérgico ha sido ampliamente relacionado con el aprendizaje asociativo y la memoria (Meyers y Domino, 1964; Fibiger, 1991; De Jaeger et al., 2013). En el cerebro de mamíferos la principal fuente de acetilcolina es el sistema de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior o prosencéfalo basal colinérgico, el cual consiste en una serie de núcleos que rostralmente se originan en el núcleo septal medial, continuando a través de la banda diagonal de Broca y finalizando en el núcleo basal magnocelular; el hipocampo, la neocorteza y amígdala son sustratos colinoceptivos y zonas blanco del prosencéfalo basal colinérgico, estas estructuras han sido relacionadas directamente con funciones de memoria (Van der Zee y Luiten, 1999).

Algunos estudios sugieren que la modulación colinérgica es particularmente importante en la representación de detalles temporales de los estímulos, un tema que es raramente atendido en la experimentación conductual (Meck, 1996; Mincses et al., 2013). Por lo cual el presente estudio analizó la participación del sistema colinérgico muscarínico en la generalización de estímulos temporales auditivos previamente aprendidos y en la retención de la discriminación de secuencias auditivas temporales a través de demoras variables en ratas.

## **2. ACETILCOLINA**

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, periférico, autonómico y entérico. Fue identificado por primera vez en 1921 por Otto Loewi y es considerado como el primer neurotransmisor descrito en la historia de las neurociencias.

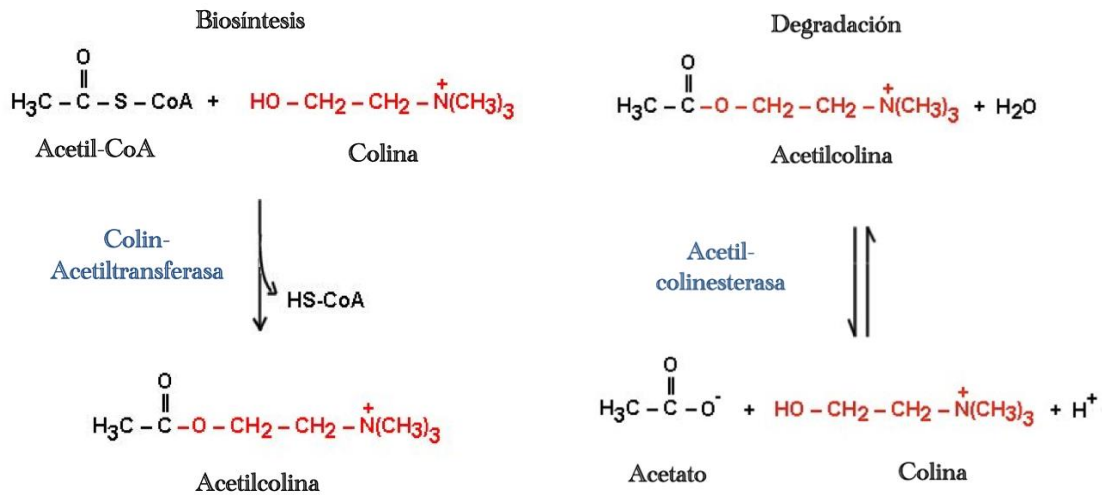
El interés en el funcionamiento del sistema colinérgico en el prosencéfalo basal se incrementó de manera importante, primero a partir de la demostración neuropatológica de que los marcadores colinérgicos en la corteza cerebral estaban reducidos en personas que fallecieron por la enfermedad de Alzheimer y seguido de la demostración de que este decremento correlaciona con la patología cortical y con el grado de deterioro cognitivo (Araujo et al., 1993; McKinney y Jacksonville, 2005). En la literatura correspondiente a la neurobiología y a la psicofarmacología, como se discutirá más adelante, se muestra que la administración de varias drogas anticolinérgicas deterioran la ejecución en tareas de aprendizaje y memoria.

### **2.1. Biosíntesis y liberación**

El proceso de síntesis, almacenamiento y degradación de la acetilcolina (ACh), requiere la expresión de distintos sistemas enzimáticos especializados. Como paso inicial para la síntesis de ACh, la colina es tomada del espacio extracelular por un sistema de captura con una alta afinidad denominado SDHACU (*sodium-dependent high affinity choline uptake*) (Okuda et al., 2000). Posteriormente la colina se conjuga con un acetato proveniente de la Acetil Coenzima A, proceso mediado por la enzima colina-acetiltransferasa (Fig. 1). La ACh se sintetiza principalmente en el soma y es transportada a la terminal sináptica, sin embargo, cierta cantidad de neurotransmisor también se sintetiza en la terminal.

Una vez sintetizada, la ACh es almacenada en la terminal presináptica en las vesículas sinápticas por la actividad de una proteína de 12 dominios transmembranales, el transportador vesicular de la ACh (VACHT), el cual

intercambia una molécula de ACh por dos protones, previamente transportados por una ATPasa-H<sup>+</sup>, a través de un gradiente electroquímico.



**Figura 1.** Biosíntesis y degradación de la acetilcolina.

La ACh contenida en las vesículas sinápticas es liberada en la hendidura sináptica como consecuencia de la estimulación eléctrica (potencial de acción) de la terminal. Una vez liberada, la ACh se difunde a través del espacio sináptico y se une a sus receptores, después, esta molécula se metaboliza en acetato y colina (Fig. 1) por la acción de la enzima acetil-colinesterasa (AChE), la colina resultante de esta reacción es transportada de regreso en la presinapsis por los transportadores de colina y reciclada para la síntesis de ACh (von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006; Bear et al., 2008).

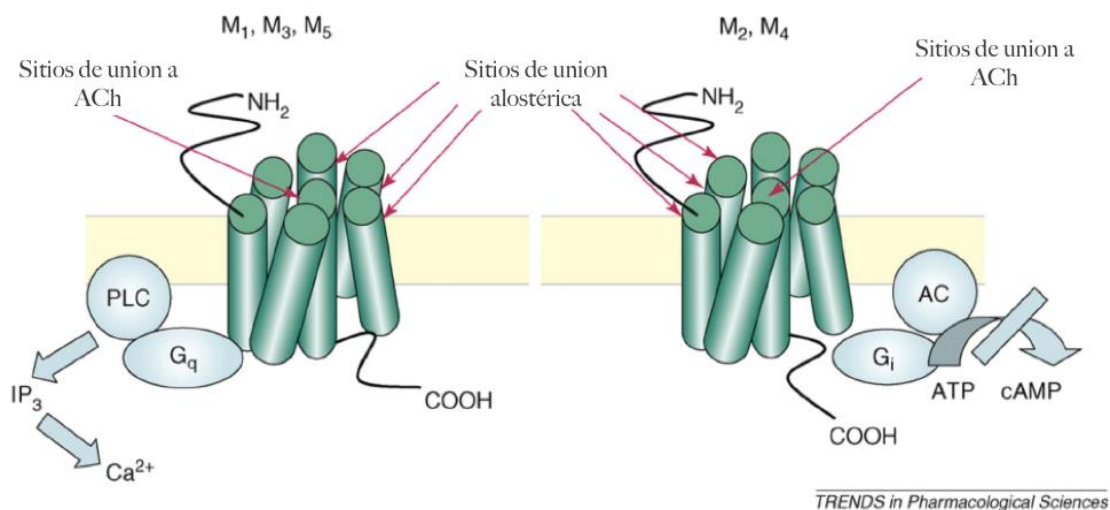
## 2.2. Receptores colinérgicos

La acción sináptica de la ACh está mediada a través de la interacción con dos grandes tipos de receptores colinérgicos: los receptores muscarínicos y los receptores nicotínicos. Estos receptores reciben su nomenclatura a partir de la afinidad que presentan con los alcaloides muscarina y nicotina, respectivamente. La muscarina proveniente del hongo *amanita muscaria* y la nicotina de la planta del tabaco (*nicotiana tabacum*).

El receptor nicotínico es un receptor ionotrópico, se encuentra asociado a un canal iónico activado por ligando y está compuesto por 5 subunidades. La

activación de este receptor genera corrientes transmembranales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Este receptor es el responsable de los efectos de la ACh en gran parte del sistema nervioso autónomo y en la unión neuromuscular. Existen algunos receptores nicotínicos que se expresan también en el sistema nervioso central.

El receptor muscarínico es un receptor metabotrópico, asociado a proteína G, activado por ligando y de 7 segmentos transmembranales. A través de técnicas farmacológicas y de clonación de DNA se han identificado 5 subtipos de receptores muscarínicos (Fig. 2), todos ellos acoplados a una proteína G y con una distribución diferencial en el cerebro de mamíferos (Caulfield, 1993). Esta clasificación fue propuesta después de hallar discrepancias en las características de unión de distintos ligandos como la escopolamina y la pirenzepina. Todos los receptores muscarínicos, como se mencionó, están acoplados a una proteína G, los receptores  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$  están asociados a una proteína  $G_q/11$ , la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), mientras que los receptores  $M_2$  y  $M_4$  están acoplado a una proteína  $G_i/o$  que inhibe a la adenilato ciclasa y pueden afectar la actividad de canales iónicos (Conn et al., 2009; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006). Los receptores  $M_2$  y  $M_4$  se encuentran localizados en la presinapsis (Caulfield, 1993), donde funcionan como autoreceptores para reducir la liberación de neurotransmisor.



**Figura 2.** Receptores muscarínicos, se muestra una representación esquemática de los subtipos del receptor muscarínico y algunos de los mecanismos intracelulares asociados a su activación (Conn et al., 2009).

Como se observa en la tabla 1, los receptores M1 y M5 se encuentran predominantemente en el cerebro. Mientras que en el caso de los receptores M2, M3 y M4 parecen estar distribuidos a través de todo el cuerpo, como lo muestra el resumen en la tabla 2.

Área Cerebral	M1	M2	M3	M4	M5
Prosencéfalo Basal y Septum	--	**	--	--	--
Corteza	**	--	*	*	--
Hipocampo	**	*	*	*	*
Amígdala	*	--	--	--	--
Estriado	*	*	*	**	--

**Tabla 1.** Distribución de los diferentes subtipos de receptores en el cerebro de rata a través de la expresión de RNAm. \*\* Alta expresión ó inmunoprecipitación, \* Baja expresión ó inmunoprecipitación (Klinkenber y Bloklan, 2010).

Órgano o Tejido	M1	M2	M3	M4	M5
Corazón	--	**	--	--	--
Pulmón	--	*	*	**	--
Íleon	--	*	**	--	--
Glándulas exocrinas	*	--	--	**	--

**Tabla 2.** Distribución periférica de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos a través de la expresión de RNAm. \*\* Alta expresión ó inmunoprecipitación, \* Baja expresión ó inmunoprecipitación (Klinkenber y Bloklan, 2010).

Estudios de biología molecular han mostrado que existen 5 genes diferentes que son responsables de la expresión de los receptores muscarínicos (Bonner et. al., 1987, 1988; Buckley et al., 1988). Cada subtipo de receptor tiene su

propio papel funcional específico reflejado por las diferencias en la distribución fisiológica (Wess et al., 2003).

### **2.3. Organización anatómica del sistema colinérgico**

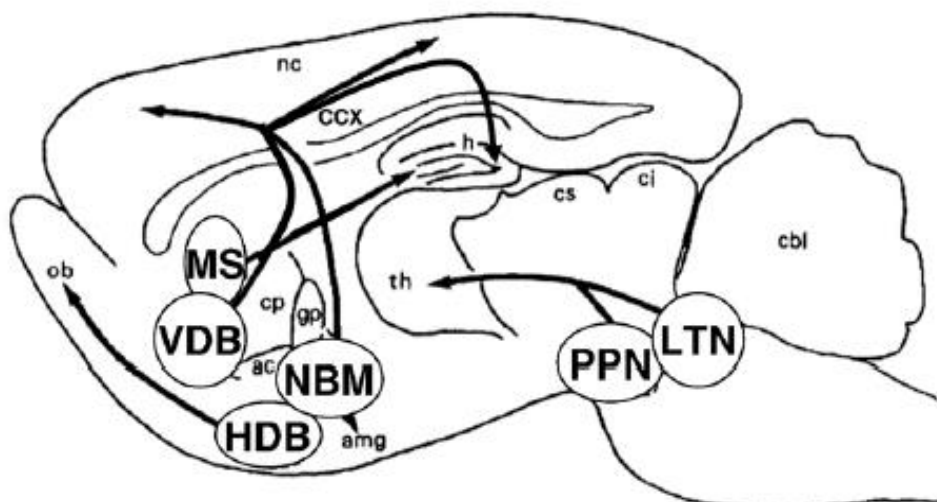
Información sustantiva y datos específicos sobre la organización anatómica del sistema colinérgico en el cerebro ha sido obtenida principalmente por medio de estudios inmunohistoquímicos y más recientemente, a través de técnicas de hibridación *in situ* para la identificación de la enzima de síntesis de la ACh, la colina-acetiltransferasa (ChAT). La ChAT es considerada el marcador más específico para la identificación de neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central y periférico. La organización del sistema colinérgico en el cerebro de algunos mamíferos, incluyendo al humano, ha sido ampliamente revisada (Oda y Nakanishi, 2000; Mufson et al., 2003; McKinney y Jacksonville, 2005).

Las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central conforman una amplia red de cuerpos celulares y grupos de estos cuerpos celulares localizados en áreas específicas. Grandes grupos de estos cuerpos celulares colinérgicos constituyen los núcleos que dan origen a las proyecciones colinérgicas a las distintas regiones del sistema nervioso (Fig. 3). La mayor concentración de cuerpos celulares colinérgicos ha sido identificada en el prosencéfalo basal, el estriado, putamen, núcleo tegmental mesopontino, el núcleo craneal motor y las neuronas espinales motoras (Woolf, 1991; Oda y Nakanishi, 2000).

El prosencéfalo basal es una área determinante en la neuroanatomía del sistema colinérgico, el prosencéfalo basal consiste en un grupo heterogéneo de núcleos unidos a las porciones ventral y medial de los hemisferios cerebrales, que abarca desde los tubérculos olfatorios en la porción rostral hasta la región hipotálamica en la porción caudal y sus delimitaciones precisas no están claramente definidas, un consenso general incluye al área septal, los tubérculos olfatorios, partes de la amígdala y el área bajo la comisura anterior conocida como la sustancia innominada, como parte del prosencéfalo basal. La sustancia innominada contiene un grupo de cuerpos celulares en contacto con

fibras que atraviesan la región, la cual comprende la banda diagonal de Broca, la comisura anterior, el prosencéfalo medial, el asa lenticular, el asa peduncular y el pedúnculo talámico inferior. Sin embargo, el grupo celular más sobresaliente consiste en las neuronas hipercrómicas magnocelulares del núcleo basal magnocelular o núcleo de Meynert (Amenta y Tayebati, 2008).

En mamíferos, el sistema colinérgico del cerebro basal anterior o prosencéfalo basal colinérgico incluye los núcleos neuronales localizados en el complejo formado por el área septal medial, la rama vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal magnocelular o núcleo basal de Meynert (van der Zee y Luiten, 1999). Clasificaciones más recientes han definido las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal como neuronas Ch1-Ch4. Las neuronas colinérgicas del septum medial (Ch1) comprenden el 10% de esta región. La banda diagonal de Broca incluye los subgrupos Ch2 en la rama vertical y Ch3 en la rama horizontal. Las neuronas en Ch2 presentan una morfología fusiforme y aproximadamente el 70% de todos los cuerpos neuronales del grupo Ch2 son colinérgicos, mientras que entre el 1 y 2% de las neuronas del grupo Ch3 son colinérgicas. El mayor grupo de neuronas colinérgicas (90%) constituye las células Ch4 del núcleo basal de Meynert, estas neuronas son fusiformes y multipolares (Mufson et al., 2003).



**Figura 3.** Representación esquemática de las neuronas colinérgicas, localización y proyecciones. MS: área septal medial, VDB: rama vertical de la banda diagonal de Broca, HDB: rama horizontal de la banda diagonal de Broca, NBM: núcleo basal magnocelular, PPN: núcleo pedunculopontino y LTN: núcleo laterodorsal tegmental.

## **2.4. Vías de distribución y proyección colinérgica**

La distribución de las neuronas y fibras colinérgicas ha sido identificada principalmente a través de técnicas de inmunocitoquímica empleando anticuerpos específicos para la enzima ChAT y trazadores neuronales en el cerebro de rata. No obstante, la localización tanto morfológica como topográfica de los somas positivos a ChAT es comparable en el gato (Kimura et al., 1981) primates (Hedreen et al., 1983) y humanos (Nagai et al., 1983).

El sistema colinérgico del prosencéfalo basal, constituido por el septum medial, la rama vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert, proveen las mayores proyecciones colinérgicas a la corteza cerebral y el hipocampo, mientras que el sistema colinérgico pontino actúa principalmente a través del núcleo intralaminar talámico, conecta también con el prosencéfalo basal y provee únicamente una inervación menor a la corteza (McKinney y Jacksonville, 2005).

En particular, las neuronas colinérgicas localizadas en el septum medial proyectan predominantemente al hipocampo a través del fornix, el hipocampo recibe sus proyecciones colinérgicas principalmente de esta zona junto con algunas de la rama vertical de la banda diagonal de Broca (Mesulam et al., 1983). Mientras que las neuronas de la rama vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca proyectan principalmente a la corteza anterior del cíngulo y al bulbo olfatorio, respectivamente (Woolf, 1991). El hipocampo es una estructura crítica para la formación de ciertos tipos de memoria, la evidencia experimental y clínica señala que las lesiones en esta estructura tienen como consecuencia un deterioro en la ejecución de tareas que involucran el almacenamiento a largo plazo y reconocimiento de información (Olton y Papas, 1979; Morris et al., 1982; Squire y Kandel, 2000). La neurotransmisión colinérgica a través de la vía septo-hipocampal ha sido reportada como central en el mantenimiento de tareas de aprendizaje, memoria, atención y sueño (Sarter y Parikh, 2005), así como fundamental en la generación del ritmo electroencefalográfico theta hipocampal, cuya disminución ha sido asociada



con el deterioro cognoscitivo durante la enfermedad de Alzheimer (Lee et al., 1994)

El núcleo basal magnocelular o núcleo basal de Meynert, posee pequeñas proyecciones al bulbo olfatorio y la amígdala, pero la mayoría de las fibras de este núcleo proyectan, como ya se mencionó, a la neocorteza (McKinney y Jacksonville, 2005). De tal forma que las neuronas colinérgicas del núcleo basal magnocelular (NBM) constituyen el mayor input colinérgico a la neocorteza de primates y ratas (Mesulam et al., 1983; Woolf, 1991). La existencia de estas proyecciones fue hipotetizada por primera vez en 1967 por los neurocientíficos Shute y Lewis y fue confirmada por estudios subsecuentes donde se demostró una correlación entre el marcado de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en las neuronas del prosencéfalo basal y trazadores inyectados en la corteza (Martinez-Murrillo et al., 1990).

Específicamente, el núcleo basal magnocelular proporciona la mayor inervación colinérgica a las áreas frontal, prefrontal y parietal de la corteza cerebral y posee pequeñas proyecciones al bulbo olfatorio y la amígdala (Niewiadomska et al., 2009), pero la mayoría de las fibras de este núcleo proyectan a la neocorteza y se tiene la hipótesis de que esta última vía regula de forma importante a procesos atencionales. (Mesulam et al., 1983; Woolf, 1991).

Algunas investigaciones han reportado que el daño en el núcleo basal magnocelular reduce significativamente los niveles de Ach corticales y que el decremento en los niveles colinérgicos está asociado con un deterioro en procesos de aprendizaje y memoria (Baxter et al., 1995). Por lo cual las lesiones en el NBM de animales ha sido empleadas como modelo para entender el deterioro cognoscitivo observado en la enfermedad de Alzheimer (Niewiadomska et al., 2009).

## **2.5. Acetilcolina, aprendizaje y memoria**

El sistema colinérgico del prosencéfalo basal puede regular un amplio rango de funciones cerebrales (Rasmusson, 2000; Semba, 2000). Sus proyecciones

terminan tanto en neuronas excitatorias e inhibitorias ampliamente distribuidas en el sistema nervioso, donde la ACh modula los patrones de disparo de sus células blanco, lo anterior como un mecanismo de control colinérgico sobre otros sistemas neuronales (Rasmusson, 2000). De acuerdo a la distribución anatómica del sistema colinérgico, como se mencionó en la sección anterior, existen vías de modulación directas e indirectas sobre sistemas corticales, la primera a través del sistema prosencéfalo basal a la corteza y el segundo basado en las proyecciones colinérgicas que se originan del tegmento y el puente, estas hacen sinapsis en la región talámica reticular de la cual, proyecciones secundarias son enviadas a la corteza. El sistema colinérgico en el prosencéfalo basal y sus proyecciones a la corteza, formación hipocámpal y núcleo talámico reticular ejerce un control tónico y fásico sobre la actividad cortical y por lo tanto se ha propuesto que influye de forma importante en procesos de aprendizaje, memoria, atención y plasticidad (Sarter y Bruno, 1999; Rasmusson, 2000).

El papel central del sistema colinérgico con respecto al aprendizaje y la memoria, fue inicialmente postulado por Meyers y Domino en 1964 y por Deutsch en 1971, posteriormente corroborado por medio de estudios farmacológicos (Drachman y leavitt, 1974), demostrando que la acción central de los fármacos anticolinérgicos deterioraba la ejecución cognoscitiva en voluntarios jóvenes sanos, en dosis que reducen la actividad colinérgica en un nivel similar al observado en personas con demencia, mientras que los fármacos agonistas colinérgicos de acción central mejoraron la ejecución de pacientes con hipoactividad colinérgica (Drachman, 1977). Esos estudios fueron extendidos y confirmados en roedores (Fibiger et al., 1991), así como en estudios adicionales con humanos (Christensen et al., 1992; Molchan et al., 1992).

De acuerdo a estudios de lesión en el prosencéfalo basal usando excitotoxinas como el ácido iboténico, ácido quisquálico, *N*-metil-D-Aspartato y AMPA, las cuales administradas en núcleos colinérgicos son capaces de reducir los niveles basales de la enzima colina-acetiltransferasa en más del 70%, se ha observado que este tipo de lesiones en núcleos colinérgicos, especialmente en

el NBM, producen deficiencias conductuales en numerosas tareas de aprendizaje y memoria (Page et al., 1991; Gonzalez et al., 2000; Gericke et al., 2003). Lo cual ha conducido a la hipótesis de que las neuronas del prosencéfalo basal colinérgico (septum medial, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal magnocelular), participan de forma importante en el control de distintos procesos, incluyendo el aprendizaje y memoria espacial y contextual, la memoria para respuestas condicionadas, memoria a corto plazo, la atención, etc., ello a través de la interacción directa con sus distintos sitios de proyección. Incluso la disfunción colinérgica en el sistema basal anterior parece estar relacionada con las alteraciones en la proteína beta-amiloide y los procesos inflamatorios durante la enfermedad de Alzheimer (Schliebs, 2005), así como el deterioro cognoscitivo de esta enfermedad (McKinney y Jacksonville, 2005). Estudios pioneros empleando técnicas de lesión por aspiración y lesión electrolítica revelan también que las ablaciones del septum medial, con la consecuente pérdida de las proyecciones colinérgicas a sus sitios blanco, reduce el ritmo theta hipocámpal y produce las alteraciones conductuales en tareas de aprendizaje y memoria (Winson, 1978; Mitchell et al., 1982).

De forma adicional a los estudios de lesión en los núcleos colinérgicos, existe amplia evidencia de que las lesiones en las principales estructuras cerebrales que reciben inervación colinérgica del prosencéfalo basal, también genera alteraciones determinantes en los procesos de aprendizaje y memoria. Una de las estructuras cuya relación con la memoria es clásica en la literatura científica y cuya actividad colinérgica ha sido estrechamente vinculada con este proceso cognoscitivo es el hipocampo. Estudios con lesión en el hipocampo han demostrado alteraciones significativas en la ejecución de tareas clásicas de memoria como el laberinto acuático de Morris (Morris et al., 1982), el laberinto radial de ocho brazos (Olton y Papas, 1979). Ambas tareas son modelos reconocidos de procesamiento espacial, el cual ocurre en el hipocampo, en donde se han identificado células denominadas "*place cells*" que responden diferencialmente ante la ubicación espacial del individuo, situando al hipocampo como una estructura fundamental en la representación espacial del entorno (O'Keefe et al., 1971; 1979), siendo estos datos consistentes con la idea de que el daño en el hipocampo deteriora el aprendizaje espacial y

contextual. Otra tarea clásica sensible a la lesión en el hipocampo es la versión de memoria de trabajo del laberinto radial (Olton y Papas, 1979). Un análogo simple de esta tarea es su contraparte operante no-igualación a la posición demorada DNMP por sus siglas en inglés (Dunnett, 1985; DeCoteau et al., 2004), en la cual, agentes colinérgicos y lesiones en la formación hipocampal causan déficits significativos en la ejecución. En otras versiones de tareas de no-igualación espacial, las ratas con lesión hipocampal muestran también deficiencias. Esos resultados sustentan la importancia del sistema hipocampal para el procesamiento mnémico de la información.

Adicionalmente, a través de los sistemas de proyección del sistema colinérgico, la liberación y actividad colinérgica puede regular la actividad neuronal, inducir patrones electroencefalográficos específicos y modular a diferentes áreas de procesamiento sensorial, así como a los procesos de aprendizaje y la memoria relacionados con el procesamiento de estímulos sensoriales. Por ejemplo, en la corteza somatosensorial de la rata, la liberación de ACh se ha vinculado con la reorganización y tamaño de los campos receptivos corticales (Metherate y Weinberger, 1990), mientras que en la corteza visual, la liberación de ACh facilita la respuesta neuronal a la estimulación visual (Laplante et al., 2005). Se ha señalado que los estímulos condicionados e incondicionados auditivos y visuales incrementan la liberación de acetilcolina en la corteza frontal y el hipocampo, lo cual es consistente con el postulado de que la liberación de ACh se relaciona con el procesamiento de los estímulos conductualmente relevantes y con procesos atentos y de arousal (Acquas et al., 1996). Por otra parte, se ha referido que la liberación de ACh en la corteza auditiva de la rata puede facilitar la transmisión sináptica tálamo- corteza auditiva (Hsieh et al., 2000; Bandrowski et al., 2001) y por lo tanto favorecer los procesos de detección y discriminación de tonos (Metherate y Ashe, 1995). Por lo cual el sistema colinérgico es un candidato ideal para el estudio y la evaluación del procesamiento neuronal de estímulos sensoriales altamente significativos o relevantes, así como de los procesos asociativos y respuestas condicionadas relacionados a dichos estímulos.

### 3. ESCOPOLAMINA

En la antigüedad se creía que los extractos de ciertas plantas poseían la capacidad mágica de influenciar el estado mental de un individuo. Los extractos de algunas hierbas y plantas como la *Atropa belladonna*, *Mandragora*, *Datura* y *Beleño* fueron usados en culturas europeas, hindúes y americanas para hacer "pociones mágicas, venenos o hechizos" mismos que podían inducir estados delirantes de la mente (Brailowsky, 1998). Después de ser ingeridos los extractos de estas hierbas, la mayoría de los individuos podían perder todo el sentido de la realidad y más tarde no podían recordar que había ocurrido durante el tiempo de intoxicación (Klinkenberg y Blokland, 2010). Además, el extracto de la *Belladonna* fue usado en la edad media por mujeres que deseaban aumentar su atractivo por medio de la dilatación pupilar que este extracto produce (Carlson, 2014). Mucho tiempo después se descubrió que esas hierbas y plantas contenían una concentración relativamente alta de alcaloides de tropano, como la atropina, hiosciamina y hioscina, esta última posteriormente referida como escopolamina, los cuales son los ingredientes activos responsables de los efectos de estas plantas (Brailowsky, 1998; Klinkenberg y Blokland, 2010).

#### 3.1. Propiedades generales de la escopolamina

La escopolamina es un alcaloide natural extraído de la *Hyoscyamus niger* (beleño), una planta de la familia de las Solanáceas, también se encuentra presente en la *Scopolia carniolica*, *Mandragora autumnalis*, o en la *Hyoscyamus albus*. La escopolamina es un éster orgánico, formado por un ácido aromático (ácido trópico) y una base nitrogenada terciaria (escopamina), al ser una amina terciaria, la escopolamina puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica, produciendo efectos en el SNC. La escopolamina se encuentra naturalmente como l-hioscina, mientras que la atropina sufre una transformación a d,l-hiosciamina durante su extracción. Los isómeros l de ambos alcaloides son, al menos, 100 veces más potentes que los isómeros d (Mendoza, 2008; Lorenzo et al., 2008).

En términos farmacológicos, la escopolamina ha sido clasificada como un antagonista muscarínico no selectivo (Bolden et al., 1992), debido a que presenta una alta selectividad por los diferentes subtipos de receptores muscarínicos (Hulme et al., 1978). La afinidad de la escopolamina para unirse a los receptores muscarínicos en el cerebro de rata es de aproximadamente 1.0 nM (Lee y el-Fakahany, 1985), pero en dosis mucho más altas, la escopolamina también puede bloquear los receptores nicotínicos (Schmeller et al., 1995; Weiner, 1980).

Al interactuar con los receptores muscarínicos, la escopolamina puede generar diferentes cambios en respuestas reguladas por las sinápsis colinérgicas en el sistema nervioso. Algunos de los efectos periféricos de la escopolamina son la dilatación pupilar y el deterioro en la acomodación de los lentes oculares, este efecto parece estar mediado por los receptores muscarínicos de tipo M3 (Shiraishi y Takayanagi, 1993). Se ha demostrado también que la administración de escopolamina reduce la salivación debido a un bloqueo de los receptores de tipo M3, M1 y M5 (Shannon et al., 1994; Tobin et al., 2002). En los sistemas respiratorio, vascular y gastrointestinal, los receptores M2 y M3 parecen mediar la contracción de la musculatura lisa (Eglen et al., 1996). En el sistema nervioso central la administración de escopolamina presenta varios efectos, entre ellos y a dosis terapéuticas, puede producir sedación, somnolencia, euforia y amnesia (Mendoza, 2008).

### **3.2. Escopolamina y memoria**

En el campo de la farmacología conductual, es un referente estándar que la escopolamina es una droga capaz de inducir deficiencias cognoscitivas y en particular alteraciones en la memoria tanto en humanos como en otras especies, el efecto amnésico de la escopolamina se ha identificado a partir de una amplia serie de resultados clínicos y experimentales.

Los primeros experimentos que investigaron los efectos centrales de la escopolamina en procesos conductuales en animales fueron reportados en la década de los años 50s (Boren y Navarro, 1959; Hearst, 1959). Por su parte, la

observación clínica de que el uso de escopolamina como premedicación en la anestesia causaba con frecuencia amnesia en los pacientes, estimuló la investigación de los efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre la memoria en humanos (Hardy y Wakely, 1962; Kopelman, 1986). Los primeros estudios experimentales que evaluaron directamente los efectos de la administración de escopolamina en las funciones cognitivas en el humano fueron publicados a principio de los años setentas. Por ejemplo, en 1974, Drachman y Leavitt demostraron que cuando se administraba escopolamina en voluntarios sanos, esta mimetizaba algunos de los síntomas de deterioro cognoscitivo observados en la demencia durante el envejecimiento. La escopolamina fue empleada más adelante como una herramienta de comparación durante la validación de modelos de funcionamiento cognoscitivo (Ennaceur y Meliani, 1992), así como en el análisis de interacciones con otros fármacos durante estos mismos procesos (Levin, 1988). El uso de la escopolamina como un modelo farmacológico de amnesia se hizo aún más popular por la propuesta de una hipótesis colinérgica de la disfunción geriátrica de la memoria (Bartus et al., 1982). Esta hipótesis asume que el declive cognoscitivo relacionado con el envejecimiento está principalmente relacionado con un decremento en la neurotransmisión colinérgica. Los resultados de este conjunto de antecedentes experimentales y clínicos permitieron sustentar la afirmación de que la escopolamina era capaz de inducir un deterioro en la ejecución de diversas tareas cognitivas y conductuales vinculadas con la memoria, dicha relación ha sido verificada de forma consistente en una amplia diversidad de estudios posteriores (p. ej.: Nomura et al., 1994; Spinelli et al., 2006; Sambeth et al., 2007; Hodges et al., 2009). Incluso, algunas revisiones en la literatura neurocientífica han abordado la relación entre la escopolamina y las alteraciones de memoria vinculadas con este fármaco (Flood y Cherkin, 1986; Ebert y Kirch, 1998; Klinkenberg y Blokland, 2010).

Particularmente, se han reportado estudios que refieren un efecto de la escopolamina sobre procesos cognoscitivos que involucran el procesamiento de estímulos sensoriales y la discriminación de estos estímulos. Por ejemplo, la escopolamina ha sido efectiva en causar deterioro en tareas de discriminación de estímulos visuales (Colpaert et al., 2001), en pruebas de discriminación

visual en el laberinto acuático (Robinson et al., 2004), en la detección de brechas (*gaps*) auditivas asociados a la agudeza y resolución temporal auditiva (Ison y Bowen, 2000), así como en discriminación condicionada con demoras de combinaciones de colores y figuras geométricas en monos (Savage et al., 1996). Adicionalmente, se ha reportado que el efecto amnésico de la escopolamina es dissociable de procesos atentos, especialmente en estudios donde se introducen demoras temporales en la evaluación conductual (Chudasama et al., 2004).

#### **4. APRENDIZAJE TEMPORAL.**

Tiempo y espacio son dimensiones fundamentales durante nuestra existencia. La estimación temporal y la percepción temporal son críticas para la supervivencia de humanos y de otras especies (Church, 2002). Un punto de partida para el análisis del tiempo como atributo del estímulo durante tareas de aprendizaje, es determinar si un organismo es capaz de discriminar entre estímulos que difieren solo en la duración. Un procedimiento de generalización temporal puede ser empleado para este fin, el cual es equivalente a un procedimiento de generalización para la intensidad de un estímulo auditivo o de su frecuencia. Este tipo de procedimientos han sido ampliamente descritos en la literatura científica, tanto en el campo de la psicología experimental como desde la perspectiva neurobiológica. La única diferencia respecto a estos procedimientos clásicos es que la dimensión manipulada es la duración del estímulo (Church, 2002). Al respecto se sabe que una gran cantidad de organismos a lo largo de la escala filogenética son capaces de discriminar entre intervalos de tiempo con diferentes duraciones (Buhusi y Meck, 2000; Boisvert y Sherry, 2006).

Los procedimientos de estimación temporal se basan en la discriminación de la duración de los estímulos. Killen y Fetterman (1988), realizaron una clasificación de los procedimientos o paradigmas experimentales empleados en el estudio de la estimación temporal basados en las respuestas proporcionadas por los sujetos. Esta clasificación comprende 3 categorías:



- Estimación temporal inmediata: El sujeto responde a la duración de un intervalo mientras este se encuentra vigente. En esta categoría se utiliza de forma general el procedimiento de pico (PP) basado en los programas de intervalo fijo (IF).
- Estimación temporal prospectiva: En esta categoría de procedimientos experimentales, se entrena al sujeto para emitir una respuesta en función de intervalos futuros, determinados generalmente por demoras entre la respuesta y la entrega del reforzador.
- Estimación temporal retrospectiva: En estas tareas, el sujeto es entrenado a emitir respuestas diferenciales basadas en la duración de un intervalo que ya sucedió. El procedimiento de bisección temporal es un excelente ejemplo de esta categoría experimental.

La percepción y discriminación de estímulos con componente temporal, se ve afectada de manera importante por los procesos de atención y memoria (Lustig y Meck, 2011). A nivel experimental, se han empleado tareas basadas en los estudios pioneros de Roberts en 1972 y su procedimiento de igualación a la muestra demorada, dando lugar al procedimiento de igualación simbólica a la muestra demorada, la cual emplea características de los estímulos que corresponden a dimensiones diferentes, como la asociación de la presentación de un estímulo visual durante un intervalo de tiempo con la respuesta en un operando (Honing y Wasserman, 1981). Adicionalmente, existe evidencia experimental sobre la participación de sistemas de memoria de trabajo, memoria de referencia, así como la participación de sistemas hipocampales y la modulación por la administración de drogas, sobre los componentes esenciales para la ejecución y mantenimiento de tareas de estimación temporal (Church, 1984).

## **5. JUSTIFICACIÓN**

La capacidad para detectar, identificar y distinguir estímulos auditivos (o de cualquier otra naturaleza sensorial) se constituye como una habilidad

fundamental en la adaptación de los organismos al medio ambiente. Aún más, la capacidad para asociar respuestas conductuales específicas ante estímulos auditivos con características diferentes o ante secuencias con componentes sensoriales diferentes, representa una función neurobiológica esencial, la cual implica el uso de sistemas de memoria durante la codificación, almacenamiento y recuperación de estas asociaciones.

Una amplia diversidad de estudios experimentales, empleando diversas técnicas neuroquímicas, neurofisiológicas, farmacológicas y conductuales, han demostrado que el sistema colinérgico es un componente esencial en el proceso de memoria, particularmente en el almacenamiento y la recuperación de información espacial, en la memoria episódica, de trabajo y más recientemente en el mantenimiento de la ejecución en tareas de igualación a la muestra con y sin demora. En este sentido, la administración del antagonista colinérgico muscarínico competitivo no selectivo, la escopolamina, ha sido ampliamente utilizada como una herramienta farmacológica para analizar la participación del sistema colinérgico en procesos cognoscitivos y especialmente en memoria, debido al efecto amnésico clásico que este fármaco produce en diversas especies y en distintas tareas.

No obstante a que algunos estudios sugieren la participación del sistema colinérgico en tareas de discriminación de las propiedades temporales de estímulos auditivos, en realidad el tema ha sido poco explorado y la información al respecto en la experimentación conductual y neurobiológica es escasa (Meck, 1996; Plakke et al., 2008; Mincses et al., 2013). Por lo cual el presente estudio analizó la participación del sistema colinérgico muscarínico durante la generalización de estímulos temporales auditivos previamente aprendidos y durante la retención de la discriminación de secuencias de estímulos auditivos de distinta duración en ratas, empleando un paradigma con demoras variables.

## **6. OBJETIVOS GENERALES**

Evaluar la participación del sistema colinérgico muscarínico en la discriminación y generalización de estímulos temporales auditivos previamente aprendidos en ratas.

Analizar la participación del sistema colinérgico muscarínico en la retención de la discriminación de secuencias de estímulos auditivos de distinta duración a través de un paradigma operante con demoras variables en ratas.

### **6.1. Objetivos específicos**

- Establecer en un grupo de ratas (n=17) la adquisición de la discriminación de dos estímulos auditivos de diferente duración (2.0 y 8.0 s) a través de un procedimiento operante de bisección temporal con dos palancas.
- Evaluar en un grupo de ratas (n=10) el gradiente de generalización para discriminación de dos estímulos auditivos de diferente duración, a través de la obtención de la curva de generalización con duraciones intermedias (2.0, 2.52, 3.17, 4.0, 5.04, 6.35 y 8.0 s) de los estímulos auditivos.
- Analizar la participación de los receptores colinérgicos muscarínicos durante la generalización de estímulos auditivos de diferente duración, a través de la administración (i.p.) de diferentes dosis (0.0, 0.2, 1.0 y 2.0 mg/Kg) de escopolamina.
- Establecer en un grupo de ratas (n=7) la adquisición de la discriminación de secuencias de estímulos auditivos, cada secuencia conformadas por dos tonos de diferente duración (2-4, 4-2, 4-8 y 8-4 s) a través de una tarea operante con dos palancas.

- Cuantificar a través de un paradigma operante con la introducción de demoras variables (0.0, 3.0, 8.0, 15.0, 23.0, y 30.0 s) interestímulo, la retención de información durante la discriminación de las secuencias previamente aprendidas.
- Analizar a través de la administración (i.p.) de diferentes dosis (0.0, 0.2, 1.0 y 2.0 mg/Kg) de escopolamina, la participación de los receptores colinérgicos muscarínicos en la retención de información durante la discriminación de secuencias auditivas empleando el paradigma operante con demoras variables.

## **6.2. Hipótesis generales**

H1: La neurotransmisión colinérgica muscarínica participa significativamente en el mantenimiento de la discriminación y generalización de estímulos auditivos de distinta duración previamente aprendida.

H2: La neurotransmisión colinérgica muscarínica participa significativamente en la retención de información durante la discriminación de secuencias de estímulos auditivos de distinta duración.

## **7. MÉTODO**

### **7.1. Sujetos**

Se emplearon 17 ratas macho de la cepa Wistar, experimentalmente ingenuas, obtenidas del bioterio de la Facultad de Psicología de la UNAM y con un peso inicial entre 300 y 350 gramos. Todos los sujetos fueron mantenidos de manera individual en cajas de policarbonato transparente con medidas de 20x29x15 cm, ubicadas en un cuarto con humedad al 70%, temperatura constante ( $21 \pm 1$  °C) y con un ciclo luz-oscuridad de 12-12 h. Las luces se encendían a las 7:00 hrs. y se apagaban a las 19:00 hrs. Al inicio del experimento los animales tuvieron acceso libre de agua y alimento, posteriormente el acceso al alimento fue restringido de acuerdo a los procedimientos experimentales que más adelante se describen.

A lo largo del presente estudio se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales empleados, así como de cualquier tipo de sufrimiento para ellos. Todos los procedimientos realizados con los sujetos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. El cuidado de los animales y los procedimientos empleados en el presente trabajo fueron aprobados por un subcomité académico-científico (comité de tesis).

### **7.2. Instrumentos y materiales**

Se utilizaron 7 cajas de condicionamiento operante (Med Associates INC, Vermont, USA) de 28x21.5x19 cm. cada una, las cuales estaban equipadas con un sistema para atenuar ruido, luz ambiental, dos palancas fijas que requerían una presión de aproximadamente 11-12 gramos para su activación; ubicadas cada una de ellas a 2.0 cm arriba del suelo el cual estaba conformado por barrotes de acero inoxidable, un comedero central equidistante a las palancas, el cual contaba con un dispensador de pellets electromagnético, mismo que liberaba 1 pellet de purina (Dustless de 45 mg formula A/I purina).

empleado como reforzador. Finalmente, en cada caja se ubicaron dos focos-estímulo (2W; 100 mA a la izquierda y 20 mA a la derecha) cada uno a 6.0 cm arriba de la palanca respectiva.

La activación de las luces, la entrega del reforzador y el registro de las respuestas, fueron controladas por una interfaz MED (Med Associates INC, Vermont, USA) y una computadora con el software MED *for Windows* (Med Associates INC, Vermont, USA).

### **7.3. Fármacos**

Se administró el antagonista competitivo muscarínico escopolamina (Sigma-Aldrich, EUA), en dosis de 0.2, 1.0 y 2.0 mg/Kg. El fármaco fue disuelto en solución salina isotónica al 0.9% como vehículo y fue administrado vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1.0 ml/kg.

### **7.4. Procedimiento conductual experimento I**

#### **7.4.1. Manipulaciones iniciales**

Al inicio del experimento se registró el peso corporal de los sujetos durante cinco días consecutivos con el fin de obtener la línea base. En esta fase los sujetos tuvieron acceso libre a agua y al alimento. Una vez calculada la línea base, se restringió el acceso al alimento para cada sujeto a 5.0 g de alimento por cada 100 g de peso corporal, hasta que todos los sujetos redujeron su peso corporal al 85-90 % del peso basal. La restricción al alimento se mantuvo a lo largo de las fases experimentales cuidando que el peso corporal de los sujetos no disminuyera por debajo del 85% del peso corporal de acuerdo al crecimiento. Esta manipulación tuvo la finalidad de asegurar la motivación de los sujetos al reforzador durante la ejecución de las tareas conductuales.

#### **7.4.2. Moldeamiento**

Los sujetos recibieron dos sesiones de moldeamiento por aproximaciones

sucesivas para lograr la respuesta operante de presión a la palanca. La disponibilidad del reforzador estuvo bajo un programa concurrente razón fija 1 (RF1). Una vez adquirida la respuesta, los sujetos recibieron entrenamiento de automoldeamiento por una semana en un programa operante RF1 alternando la disponibilidad del reforzador en ambas palancas, esto con la finalidad de obtener estabilidad conductual en la respuesta operante a ambas palancas. Una vez adquirida la conducta, todos los sujetos fueron entrenados bajo un programa RF con incrementos progresivos por sesión, hasta llegar a una RF3 independiente en ambas palancas. Cada sesión terminó a los 60 min., o cuando el sujeto obtuvo 60 reforzadores.

#### **7.4.3. Discriminación de tonos de distinta duración**

Durante esta fase experimental los 17 sujetos fueron entrenados a emitir respuestas diferenciales de acuerdo a la duración (2.0 y 8.0 segundos) de dos estímulos auditivos, constituidos por tonos de 4.0 KHz y 65.0 dB. Las sesiones de entrenamiento se constituyeron por una serie de ensayos discretos (no más de 60), en cada uno de ellos se presentó uno de ambos tonos de acuerdo a una secuencia aleatoria. Para obtener el reforzador, cada tono fue asociado a la respuesta de presión (RF1) en una de las dos palancas. La palanca correspondiente a cada tono (izquierda o derecha) fue contrabalanceada para evitar sesgos por lateralización. Al ejecutar una respuesta correcta, el reforzador era entregado y se iniciaba un intervalo interensayos con una duración de 20.0 s, durante el cual las luces generales eran apagadas. Una vez terminado este intervalo se presentaba un nuevo estímulo. Las respuestas incorrectas conducían directamente al intervalo interensayo. El entrenamiento en la tarea discriminación o bisección temporal, se mantuvo hasta que todos los sujetos alcanzaron un índice de discriminación del 75% de respuestas correctas durante cinco sesiones consecutivas. Una vez alcanzado este criterio se redujo la tasa de reforzamiento al 75% a fin de evitar extinción en fases de evaluación posteriores. Bajo esta condición, el entrenamiento continuó hasta que los sujetos alcanzaran nuevamente el criterio de adquisición. Durante esta fase cada sesión terminó una vez transcurridos 60 minutos o cuando el sujeto hubiera obtenido 100 reforzadores. En todos los casos las sesiones se

condujeron diariamente a la misma hora, 6 días a la semana.

#### **7.4.4. Generalización**

Una vez alcanzado el criterio de adquisición en la tarea de discriminación temporal, se seleccionaron aleatoriamente a 10 de los sujetos experimentales a los cuales se les realizaron 10 sesiones prueba de generalización. En las sesiones de generalización se intercalaron de forma azarosa 25 ensayos, los cuales ocurrieron durante la sesión de acuerdo a una probabilidad de 0.3 con respecto al total de ensayos transcurridos. En estos ensayos el estímulo auditivo presentó duraciones intermedias (2.52, 3.17, 4.0, 5.04 y 6.35 segundos) con respecto a los estímulos de entrenamiento en discriminación. La duración de los estímulos de duración intermedia fue escalada de acuerdo a una distribución semilogarítmica y la presentación de cada una de las distintas duraciones de los estímulos se realizó de forma aleatoria a lo largo de la sesión. Tras la presentación de cada uno de los estímulos de duración intermedia la entrega de reforzador fue omitida, lo anterior para evitar un reaprendizaje. Las sesiones de generalización concluyeron cuando cada sujeto obtuviera 100 reforzadores o cuando hubieran transcurrido 60 minutos, lo que ocurriera primero. A partir del índice de discriminación en los ensayos con duraciones intermedias se obtuvieron las curvas de generalización.

#### **7.4.5. Pruebas farmacológicas**

Al terminar las sesiones de generalización se realizaron las pruebas farmacológicas con escopolamina. En esta fase se repitió el procedimiento de generalización empleando los estímulos con duraciones intermedias de la forma anteriormente descrita. Adicionalmente, 20 minutos previo al inicio de cada sesión se administró (i.p.) una de las diferentes dosis (0.2, 1.0 y 2.0 mg/Kg) de escopolamina o el vehículo (solución salina al 0.9 %; 1.0 ml/Kg). La administración de fármaco o vehículo se determinó de acuerdo con una secuencia aleatoria. Se realizaron 3 sesiones prueba, una por cada dosis del fármaco y una sesión con la administración del vehículo. Las sesiones concluyeron de igual forma que en la fase anterior y se obtuvieron las curvas



de generalización a partir del índice de discriminación bajo estas condiciones farmacológicas.

### **7.5. Experimento II: Discriminación de secuencias**

Para la realización de este segundo experimento se empleó un grupo independiente de ratas, conformado por los 7 sujetos restantes del entrenamiento inicial en discriminación. Al comienzo de este segundo experimento, como se refirió previamente, los sujetos recibieron las manipulaciones iniciales, los procedimientos de moldeamiento conductual y el entrenamiento en la tarea de discriminación (o bisección temporal) de 2 estímulos de distinta duración (2.0 y 8.0 segundos) en la forma descrita en los procedimientos del experimento anterior (secciones 7.4.1., 7.4.2. y 7.4.3.). Una vez que los sujetos alcanzaron el criterio de adquisición, es decir un índice de discriminación del 75% de respuestas correctas durante cinco sesiones consecutivas, se prosiguió al entrenamiento para discriminar dos tipos de secuencias de estímulos (4 en total), cada una de estas secuencias estuvo compuesta de dos tonos de diferente duración (2.0-4.0, 4.0-2.0, 4.0-8.0 y 8.0-4.0 segundos).

De acuerdo a la suma de la duración de los dos estímulos que conformaron las secuencias, estas se clasificaron como secuencias de corta o larga duración. Las secuencias de corta duración se conformaron por un primer estímulo de 2.0 segundos y un segundo estímulo de 4.0 segundos o viceversa (4.0-2.0 segundos), de tal forma que la suma de la duración de ambos estímulos fue de 6.0 segundos. Las secuencias largas se conformaron por un primer estímulo de 4.0 segundos, seguido de un segundo estímulo de 8.0 segundos o viceversa (8.0-4.0 segundos), en este segundo caso la suma en la duración de ambos estímulos fue de 12.0 segundos. Adicionalmente, los estímulos que constituyeron cada secuencia se presentaron con tonos diferenciales, uno de los componentes de la secuencia (primero o segundo) fue un tono grave (1.6 KHz, 65.0 dB), mientras que el otro componente fue un tono agudo (15.0 KHz, 65.0 dB), lo anterior con el fin de que el tono no fuera parte importante de la discriminación sino la suma de sus duraciones. La respuesta (RF1) a una de

las dos palancas (izquierda o derecha) fue asociada con la entrega de reforzador ante la presencia de una secuencia de duración corta. Mientras que la respuesta a la palanca opuesta se asoció con la entrega del reforzador en presencia de una secuencia larga. La respuesta a la palanca (izquierda o derecha) ante una secuencia corta o larga fue contrabalanceada, lo anterior con el fin de evitar sesgos por lateralización de los sujetos.

El entrenamiento en discriminación de secuencias se mantuvo hasta que todos los sujetos (n=7) alcanzaron el criterio de adquisición, conformado por un índice de discriminación del 75% de respuestas correctas durante cinco sesiones consecutivas. De igual forma, Las sesiones concluyeron cuando el sujeto alcanzó 100 reforzadores o cuando hubieran transcurrido 60 minutos.

#### **7.5.1. Evaluación con demoras**

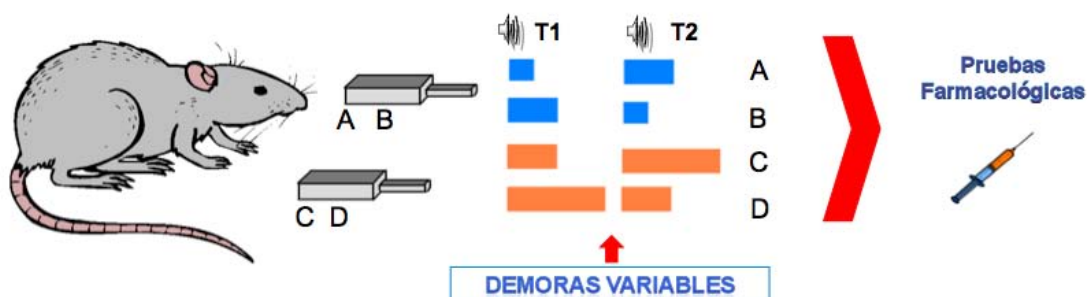
Una vez que los sujetos alcanzaron el criterio de adquisición se inició con la fase de evaluación con demoras variables. Para ello se realizaron 10 sesiones consecutivas de discriminación de secuencias de forma similar a la fase anterior. Adicionalmente, en cada una de estas 10 sesiones, se intercalaron 25 ensayos, los cuales ocurrieron durante la sesión con base en una probabilidad de 0.3 con respecto al total de ensayos transcurridos. En estos ensayos se introdujo una demora variable (0.0, 3.0, 8.0, 15.0, 23.0 y 30.0 segundos) entre los dos estímulos componentes de la secuencia. Las distintas demoras interestímulos fueron presentadas de forma aleatoria a lo largo de la sesión. De igual forma se registró el índice de discriminación y se obtuvieron las curvas de discriminación en función de los valores de las demoras (curvas de retención). La duración y finalización de las sesiones fue idéntica a las fases anteriores (100 reforzadores o 60 minutos).

#### **7.5.2. Pruebas Farmacológicas**

Al terminar las sesiones de evaluación con las demoras variables, se realizaron las pruebas farmacológicas con escopolamina. En esta fase del experimento, se sometió nuevamente a los sujetos a una serie de sesiones consecutivas de

discriminación de las secuencias, incluyendo la inserción de los ensayos con las demoras variables interestímulos, pero 20 minutos previos al inicio de cada sesión se administró (i.p.) de forma aleatoria una de tres dosis de escopolamina (0.2, 1.0 y 2.0 mg/Kg) o el vehículo (1.0 ml/kg). Se realizaron 3 sesiones de prueba, correspondientes a cada una de las dosis del fármaco y una sesión para el vehículo. Nuevamente se registró el índice de discriminación y se obtuvieron las gráficas de discriminación en relación a los diferentes valores en las demoras interestímulos para cada una de las dosis de escopolamina. Las sesiones concluyeron de forma habitual.

La figura 4 muestra de forma esquemática el diseño experimental para la fase de discriminación de secuencias con demoras variables, seguida de las pruebas farmacológicas. En la figura se muestra que la presentación de una secuencia corta (A o B) fue asociada a la respuesta en un operando (p. ej., palanca izquierda), mientras que las respuestas en el operando contrario (p. ej., palanca derecha) fueron reforzadas al presentarse una secuencia con duración larga (C o D). Las demoras variables interestímulos fueron introducidas aleatoriamente entre ambos componentes de la secuencia. El procedimiento se llevó a cabo para cada una de las dosis (0.2, 1.0 y 2.0 mg/kg.) de escopolamina y para el vehículo.



**Figura 4.** Diseño experimental. Entrenamiento en discriminación de secuencias con demoras variables, seguidas de las pruebas farmacológicas con escopolamina. A y B secuencias cortas (duración total: 6 segundos), C y D secuencias largas (duración total: 12 segundos). T1 y T2 son los tonos componentes de cada secuencia.

## 7.6. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron el número de respuestas para cada palanca, la duración total de la sesión, la tasa de respuesta (R/s: número de respuestas por segundo), el número de ensayos por sesión, el número de reforzadores totales obtenidos y el índice de discriminación. El índice de discriminación (ID), o probabilidad relativa de la respuesta, se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$ID = RL / RL + RC \dots\dots\dots [1]$$

Donde RL es el número de respuestas a la palanca (operando) asociada con el estímulo de larga duración y RC es el número de respuestas a la palanca asociada al estímulo de corta duración, durante cada ensayo de la sesión.

El valor del ID o probabilidad de respuesta para la palanca asociada al estímulo de larga duración, se empleó para elaborar las curvas de generalización para los diferentes valores de duración del estímulo, así como para elaborar las curvas de retención de acuerdo a las diferentes demoras variables interestímulos.

A las curvas de generalización se les realizó un ajuste sigmoideo de tres parámetros con la siguiente función logística:

$$f = a / (1 + \exp(-(x-x_0)/b)) \dots\dots\dots [2]$$

Donde  $a$  es el valor máximo de la respuesta,  $x$  es el valor de duración del tono,  $x_0$  es el valor de duración del tono que produce el 50% del valor máximo en el índice de discriminación y  $b$  es el valor relativo a la pendiente.

Para el segundo experimento, se empleó el índice de discriminación para elaborar las curvas de retención en función de las diferentes demoras interestímulos que fueron empleadas y para las diferentes condiciones farmacológicas. A cada una de las curvas de retención se les realizó un ajuste

no lineal a través de una función de decaimiento exponencial a partir de la proporción de respuestas a la secuencia (estímulo) de duración larga. La ecuación empleada se muestra a continuación:

$$f = y_0 \cdot \exp(-b \cdot x) \dots \dots \dots [3]$$

Donde  $y_0$  es el valor máximo de la respuesta (ID),  $x$  es el valor de duración de la demora interestímulo y  $b$  es la constante de decaimiento de los datos, el cual es un valor relacionado a la pendiente de la curva.

Para el análisis estadístico de las curvas de generalización y de retención se obtuvieron parámetros cuantitativos de las curvas, particularmente se consideraron el valor máximo, el valor mínimo, el valor medio ( $x_0 = 50\%$  del valor máximo) y la pendiente de las curvas. El valor de la pendiente ( $b$ ) de las curvas tanto de generalización como de retención, se obtuvo a partir del ajuste logístico y el ajuste de decaimiento exponencial con las ecuaciones arriba descritas [2 y 3, respectivamente]. Adicionalmente se registró el valor de la tasa de respuestas (R/s) para cada condición. Los parámetros anteriores se obtuvieron en cada condición experimental.

Para el análisis estadístico de los datos, se realizaron comparaciones entre los distintos grupos y las diferentes condiciones experimentales. Para ello se emplearon análisis de varianza (ANOVA) para grupos dependientes. En los casos en los que el análisis de varianza resultó significativo se procedió a realizar las comparaciones múltiples para los casos particulares a través de la prueba *post hoc* de Tukey; considerándose un nivel de significancia de 0.05.

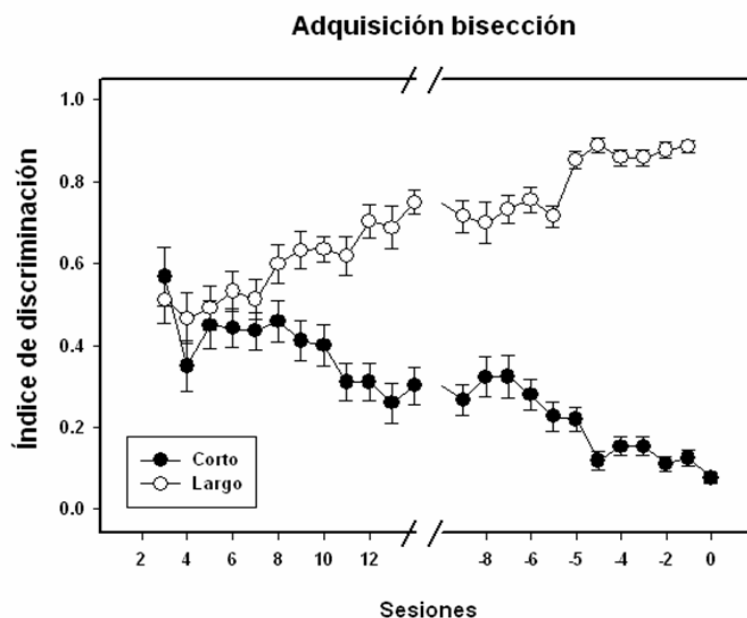
Finalmente, se empleó el programa Sigma Plot 10, tanto para el ajuste de las funciones como para graficar los datos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico de Prisma 5 for Mac OS X. En el presente trabajo los resultados se expresan en medias y error estándar de la media (E.E.M).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Experimento I: bisección temporal

#### 8.1.1. Adquisición

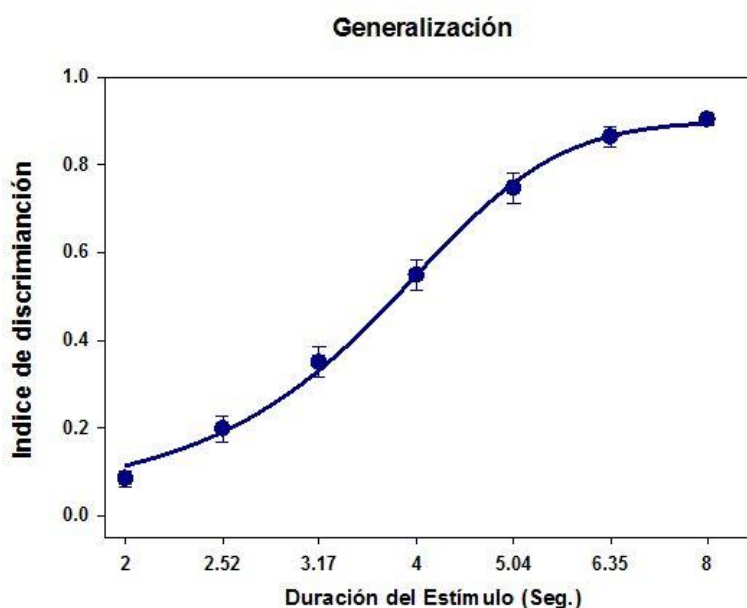
El primer objetivo del entrenamiento conductual de los sujetos fue la adquisición de la tarea de discriminación de 2 tonos de diferente duración (corto: 2.0 s vs largo: 8.0 s). En promedio, los sujetos requirieron de  $23.0 \pm 2.1$ , sesiones de entrenamiento para alcanzar el criterio de adquisición. En la gráfica 1 se muestra el índice de discriminación promedio del total de los sujetos ( $n=17$ ) durante las 12 primeras sesiones de entrenamiento, seguido de las últimas 10 sesiones de entrenamiento previas a que cada sujeto alcanzará el criterio de adquisición en la tarea. En la gráfica se aprecia claramente que al inicio del entrenamiento los sujetos respondieron de forma azarosa en cualquiera de ambas palancas. Mientras que al final del entrenamiento la respuesta de los sujetos es diferencial de acuerdo a la duración (corto o largo) del tono presentado.



**Gráfica 1.** Curvas de adquisición. Se muestra el índice de discriminación promedio ( $n= 17$ ), para el estímulo corto (2.0 s) y largo (8.0 s), durante las primeras 12 sesiones de entrenamiento y las 10 sesiones previas al criterio de adquisición. Medias  $\pm$  E.E.M.

### 8.1.2. Generalización

Una vez que los sujetos alcanzaron el criterio de adquisición en la tarea de discriminación temporal se realizaron las pruebas de generalización en 10 de los 17 sujetos. Los resultados de las pruebas de generalización se presentan en la gráfica 2, en la cual se muestra el índice de discriminación (probabilidad relativa de respuesta para la palanca asociada al tono largo) en función de las distintas duraciones intermedias del estímulo. La gráfica demuestra un gradiente de generalización normal y un claro control de la conducta por la dimensión temporal del estímulo. De acuerdo al análisis de la curva, el valor mínimo promedio fue de  $0.09 \pm 0.01$ , el valor máximo promedio fue de  $0.90 \pm 0.01$ , mientras que el valor medio de la curva (50 % del valor máximo) fue de  $3.59 \pm 0.09$  y el valor promedio de la pendiente de la curva fue de  $0.143 \pm 0.005$ . Estos datos se consideran como línea base (LB) para comparaciones posteriores.



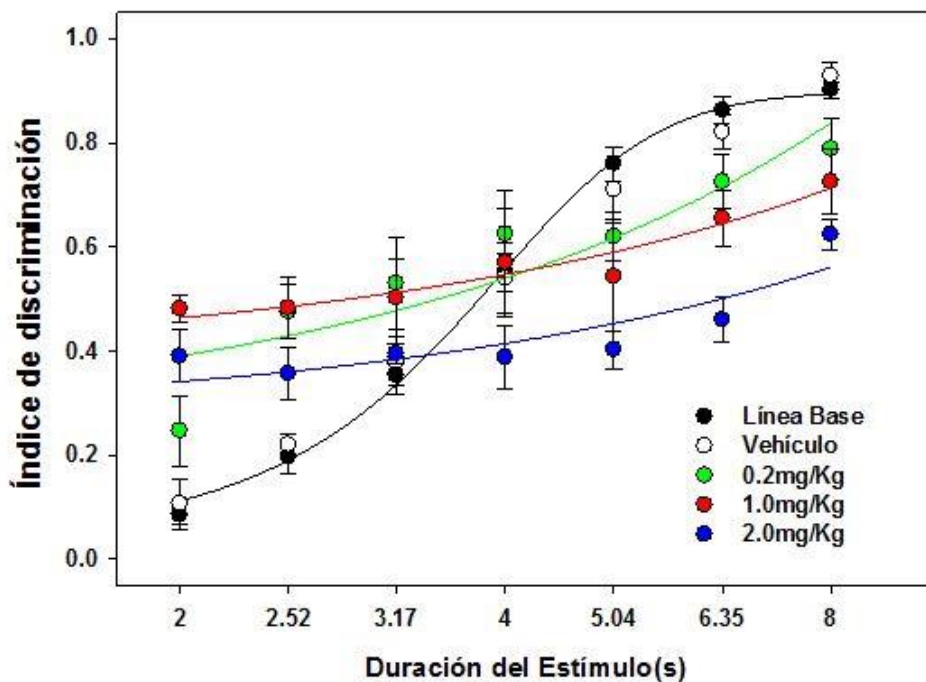
**Gráfica. 2.** Gradiente de generalización control. Se muestra el índice de discriminación de los sujetos ( $n=10$ ) para la palanca asociada al tono largo en función de las distintas duraciones intermedias del estímulo. Medias  $\pm$  E.E.M.

### 8.1.3. Generalización con escopolamina

Con el fin de evaluar la participación del sistema colinérgico muscarínico en la tarea de discriminación temporal, se realizaron pruebas de generalización bajo

la administración de 3 diferentes dosis (0.2, 1.0 y 2.0 mg/kg, i.p.) del antagonista muscarínico no selectivo escopolamina y del vehículo (1.0 ml/kg). Las curvas de generalización para las distintas condiciones farmacológicas se observan en la gráfica 3. Nuevamente se grafica el índice de discriminación (probabilidad relativa de respuesta) a la palanca asociada al tono de duración larga en función de las diferentes duraciones intermedias del estímulo. Como se observa en la gráfica, la administración de escopolamina produjo un decremento dosis dependiente en el gradiente de generalización, mientras que la curva con la administración del vehículo conserva un gradiente de generalización normal y similar a la línea base.

### Generalización Escopolamina



**Gráfica. 3.** Gradientes de generalización para la condición de Línea Base (LB), vehículo y bajo las distintas dosis de escopolamina. Se grafica el índice promedio (n=10) de discriminación (probabilidad relativa) para la palanca asociada al tono largo en función de las distintas duraciones intermedias del estímulo. Medias  $\pm$  E.E.M.

Con el fin de obtener una evaluación mayormente detallada del efecto de la administración de las distintas dosis de escopolamina sobre la conducta de los sujetos, se obtuvieron los valores promedio de la pendiente, el valor mínimo y el valor máximo de las curvas de generalización en las distintas condiciones y se realizaron las comparaciones estadísticas (ANOVA's). Adicionalmente, se

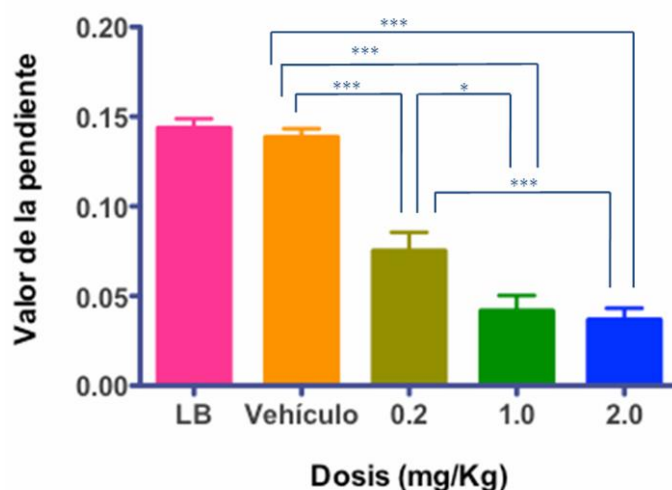


analizó la tasa de respuestas como control motor y motivacional de la conducta de los sujetos en las distintas condiciones experimentales. Los resultados del análisis estadístico y las gráficas correspondientes se muestran a continuación.

#### 8.1.4. Efecto sobre la pendiente

En la gráfica 4, se observan los valores promedio obtenidos para la pendiente de las curvas en la condición línea base ( $0.143 \pm 0.005$ ), vehículo ( $0.138 \pm 0.004$ ) y para las dosis de escopolamina de 0.2 ( $0.075 \pm 0.01$ ), 1.0 ( $0.041 \pm 0.008$ ) y 2.0 ( $0.036 \pm 0.006$ ) mg/kg. Se observan cambios dosis dependientes, los cuales de acuerdo al análisis presentaron diferencias estadísticas significativas [ANOVA:  $F_{(4, 0.031)} = 54.68$ ,  $p < 0.0001$ ]. Específicamente, las comparaciones múltiples (Tukey) mostraron diferencias significativas entre las dosis de 0.2 ( $p = 0.001$ ), 1.0 ( $p = 0.001$ ) y 2.0 ( $p = 0.001$ ) mg/kg., con respecto a la condición vehículo y la línea base. Adicionalmente la dosis de 0.2 mg/kg presentó diferencias significativas ( $p = 0.05$  y  $0.01$ ) con respecto a las dosis de 1.0 y 2.0 mg/kg, respectivamente. Por su parte, la comparación entre la Línea base y el vehículo no mostró diferencias estadísticamente significativas.

**Efecto de la administración de escopolamina sobre la pendiente de las curvas de generalización**

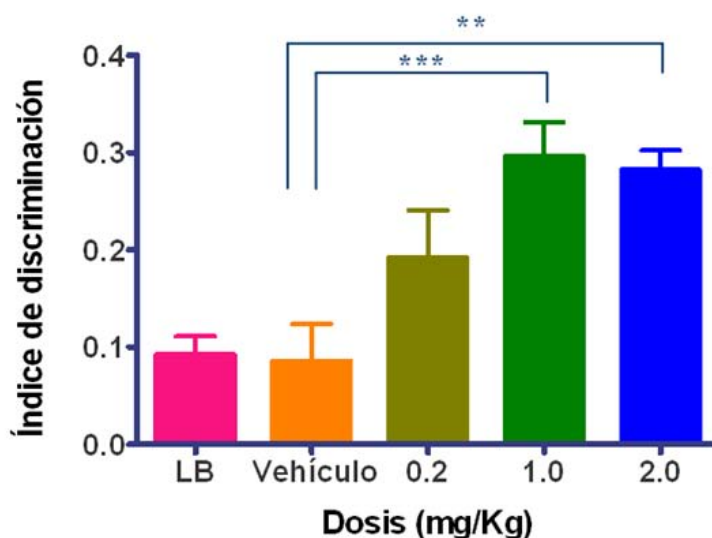


**Gráfica 4.** Efecto de la administración de escopolamina sobre la pendiente del gradiente de generalización. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  y \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 8.1.5. Efecto sobre el valor mínimo de la curva

Para efectos de su comparación, se presentan en la gráfica 5 los valores mínimos promedio obtenidos de las curvas de generalización para la condición de LB ( $0.091 \pm 0.01$ ), vehículo ( $0.085 \pm 0.038$ ) y para las dosis de escopolamina de 0.2 ( $0.192 \pm 0.048$ ), 1.0 ( $0.296 \pm 0.035$ ) y 2.0 ( $0.282 \pm 0.02$ ) mg/kg. Se puede observar que la administración de escopolamina causó un incremento dosis dependiente en el valor mínimo del índice de discriminación. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre grupos [ANOVA:  $F_{(4, 0.122)} = 11.02$ ,  $p < 0.0001$ ]. Por su parte, las comparaciones múltiples (Tukey) señalan diferencias significativas entre las dosis de 1.0 ( $p = 0.001$ ) y 2.0 ( $p = 0.01$ ) mg/kg., con respecto al vehículo y de igual forma con la línea base ( $p = 0.001$  ambos casos, no se muestran en la gráfica). En el caso del valor mínimo de la curva, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA) entre la condición control (LB) y la administración del vehículo.

**Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor mínimo de la curva**

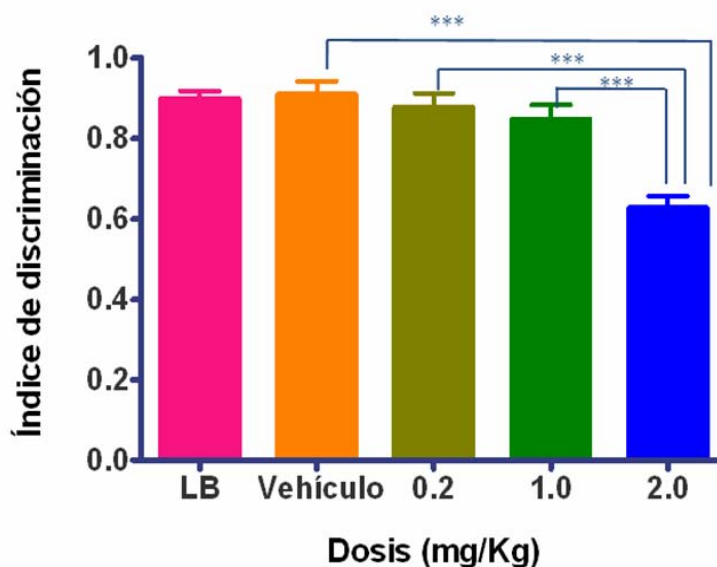


**Gráfica 5.** Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor mínimo de la curva de generalización. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M. \*\* =  $p < 0.01$  y \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 8.1.6. Efecto sobre el valor máximo de la curva.

El efecto de la administración de las distintas dosis de escopolamina sobre el valor máximo de la curva de generalización se presenta en la gráfica 6. Se muestra el valor promedio para la condición LB ( $0.90 \pm 0.01$ ), el vehículo ( $0.90 \pm 0.03$ ) y para las dosis 0.2 ( $0.87 \pm 0.35$ ), 1.0 ( $0.84 \pm 0.03$ ) y 2.0 ( $0.62 \pm 0.02$ ) mg/kg de escopolamina. El análisis estadístico demostró diferencias entre grupos [ANOVA:  $F_{(4, 0.146)} = 16.32$ ,  $p < 0.0001$ ], las cuales se encontraron (Tukey) entre las dosis 2.0 mg/kg con respecto al vehículo ( $p = 0.001$ ) y la LB ( $p = 0.001$ , no se muestra en la gráfica), así como entre las dosis de 0.2 y 1.0 mg/kg con respecto a la dosis de 2.0 mg/kg ( $p = 0.001$ ). Nuevamente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la LB y la administración del vehículo.

**Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor máximo de la curva**

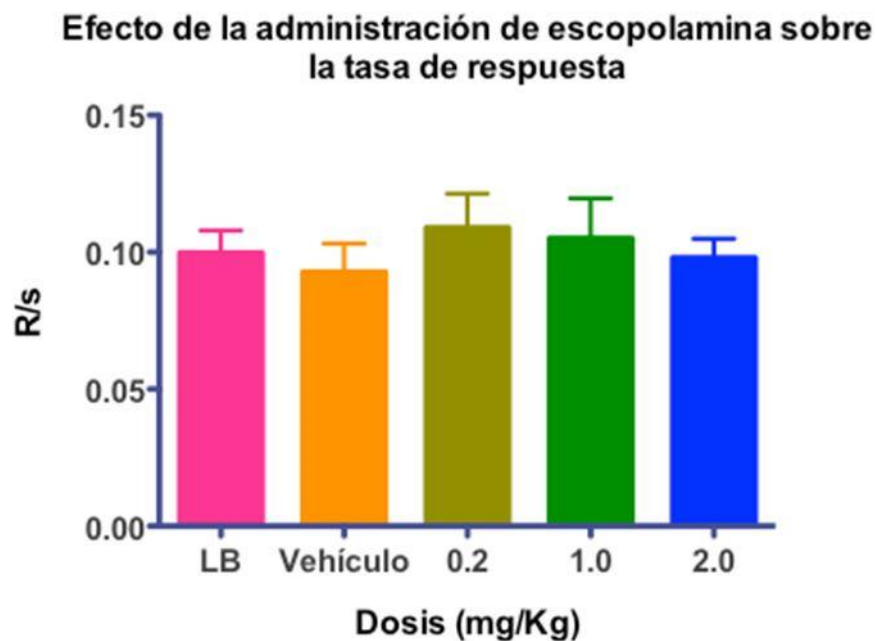


**Gráfica 6.** Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor máximo de la curva de generalización. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M. \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 8.1.7. Tasa de respuestas

Con la finalidad de analizar si los cambios registrados en el proceso de generalización bajo la administración de escopolamina responden a

variaciones en la conducta motora o en el estado motivacional de los sujetos, se analizó la tasa de respuestas en las diferentes condiciones. En la gráfica 7 se observan los valores promedio de la tasa de respuestas de los sujetos para la línea base, la administración del vehículo y las distintas dosis del fármaco durante las pruebas de generalización. El análisis estadístico (ANOVA) de estos datos no demostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos [ $F_{(4, 0.0003)} = 0.3134$ ]. Por lo que se puede concluir que los posibles efectos motores o motivacionales del fármaco no interfirieron con el desempeño de los sujetos durante la tarea de discriminación y generalización de estímulos auditivos de diferente duración.



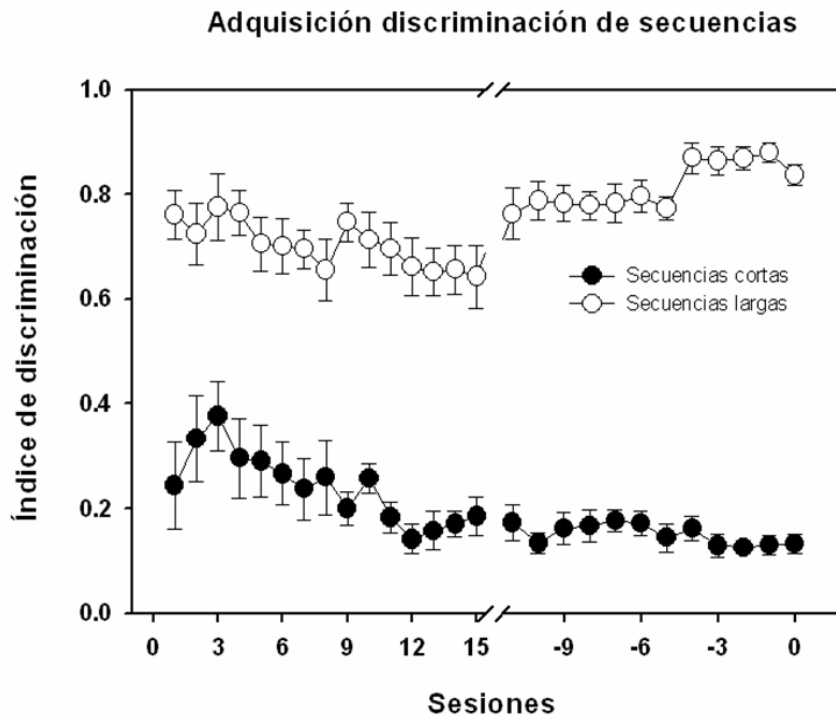
**Gráfica 7.** Tasa promedio de respuestas (R/s) durante las pruebas de generalización para la Línea Base (LB), vehículo y las diferentes dosis de escopolamina. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. R/s= respuestas sobre segundo. Medias  $\pm$  E.E.M.

## **8.2. Experimento II: discriminación de secuencias**

### **8.2.1. Adquisición**

El objetivo de este segundo experimento fue establecer el proceso de discriminación de secuencias de estímulos auditivos de distinta duración y posteriormente analizar la participación del sistema colinérgico muscarínico en la capacidad de mantenimiento en memoria de la información de la tarea, lo cual se llevó a cabo nuevamente a través del empleo de demoras variables interestímulos. Para tal fin se empleó un grupo de ratas conformado por 7 sujetos. Dicho grupo, como se describió previamente, fue inicialmente entrenado en el procedimiento de discriminación de 2 tonos de diferente duración o bisección temporal. En esta primera fase los 7 sujetos requirieron en promedio de  $21 \pm 2.1$  sesiones para alcanzar el criterio de discriminación entre los 2 tonos, valor que no presentó diferencias significativas con respecto al resto de los sujetos que conformaron el grupo del primer experimento. Posteriormente, los sujetos fueron entrenados en el procedimiento de discriminación de secuencias en la cual se entrenó a cada sujeto a discriminar entre una secuencia corta de una larga, lo anterior de entre cuatro tipos de secuencia (ver método, sección 7.5.).

A continuación, en la gráfica 8, se muestra el índice promedio de discriminación (probabilidad relativa de respuesta) para la palanca asociada a la secuencia larga (suma de componentes igual a 12 s). Se presentan las primeras 15 sesiones del entrenamiento, seguidas de las 12 sesiones previas a que cada sujeto alcanzará el criterio de adquisición (75% de respuestas correctas durante cinco sesiones consecutivas). Para este segundo experimento se aprecia una ejecución inicial con cierto nivel de diferenciación entre las secuencias cortas y largas, mediada por el entrenamiento previo en la tarea de bisección temporal. De igual forma, se aprecia que conforme el entrenamiento avanzó, los sujetos fueron capaces de discriminar cada vez mejor entre una secuencia corta y una larga. En promedio los sujetos requirieron de  $70 \pm 5.0$  sesiones para alcanzar el criterio de adquisición de esta fase.

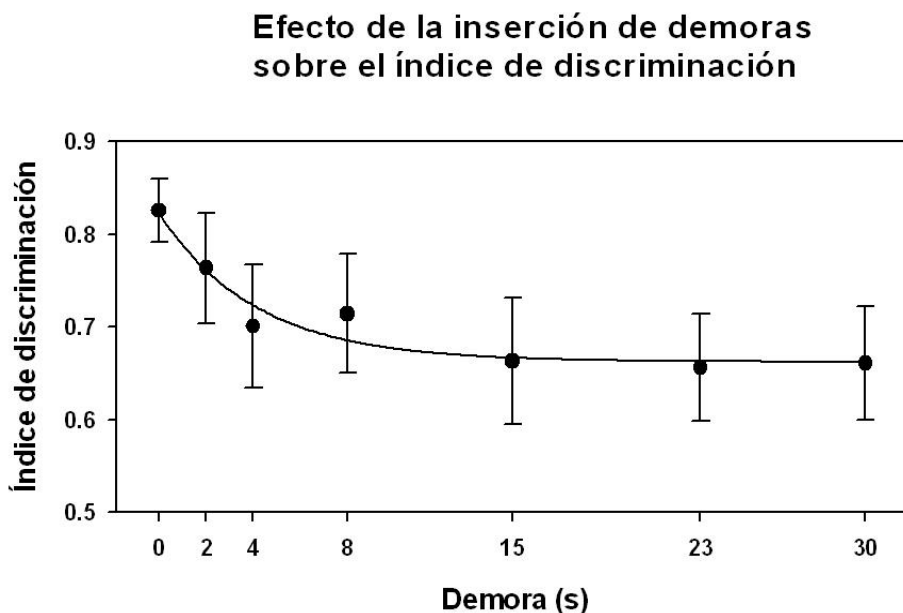


**Gráfica 8.** Curva de adquisición de la discriminación de secuencias. Se muestra el índice de discriminación promedio ( $n=7$ ) durante las primeras 15 sesiones de entrenamiento y las 12 sesiones previas al criterio de adquisición. Medias  $\pm$  E.E.M.

### 8.2.2. Discriminación de secuencias con demoras interestímulo

Una vez alcanzado el criterio de adquisición en la discriminación de secuencias y con el fin de evaluar la capacidad de retención de la información en la memoria de los sujetos, se realizaron las pruebas de discriminación de secuencias con la inserción de demoras variables entre los 2 componentes de cada secuencia (ver método, sección 7.5.1.). Los diferentes valores de las demoras (0.0, 3.0, 8.0, 15.0, 23.0 y 30.0 segundos) se presentaron de forma aleatoria a lo largo de cada sesión prueba de esta fase. En la gráfica 9 se observa el efecto de la diferente duración de cada demora sobre el índice de discriminación de los sujetos. Al inicio de la curva de retención, se puede apreciar que conforme incrementa el valor de la demora la eficacia de ejecución de los sujetos disminuye progresivamente, mientras que al final de la curva, en las demoras de mayor duración, la ejecución de los sujetos se estabiliza. Esta curva de retención se consideró en lo sucesivo como la línea

base de ejecución para fines de su comparación con las manipulaciones farmacológicas con el antagonista muscarínico.

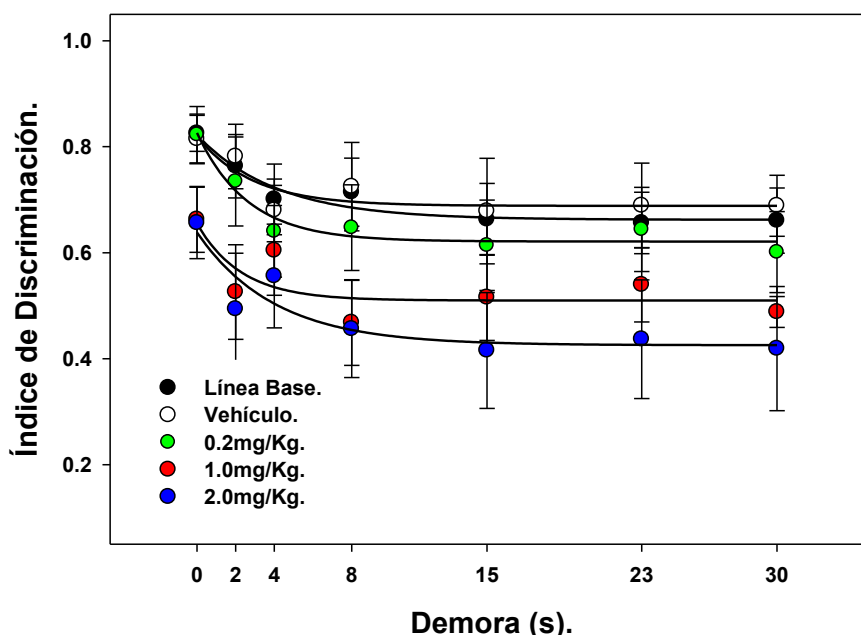


**Gráfica 9.** Discriminación de secuencias auditivas con demoras variables interestímulos. Se muestra el índice de discriminación promedio (n=7) con respecto a la duración de la demora. Medias ± E.E.M.

### 8.2.3. Escopolamina y discriminación de secuencias con demoras

Con el fin de evaluar la participación de los receptores muscarínicos en el mantenimiento o retención de la información de la tarea en la memoria de los sujetos, se analizó el efecto de la administración de 3 dosis de escopolamina (0.2, 1.0 y 2.0 mg/kg, i.p.) sobre la ejecución de la tarea de discriminación de secuencias con las demoras variables y se comparó con la administración del vehículo (1.0 ml/Kg) y con la línea base. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 10. Se puede observar que la administración de escopolamina reduce de forma dosis dependiente el valor del índice promedio de discriminación de los sujetos en las distintas demoras. Mientras que en lo que respecta a la ejecución entre la línea base y el vehículo, no se observaron diferencias significativas [ $F_{(12, 0.743)} = 0.3344$ ].

**Efecto de la administración de escopolamina sobre la discriminación de secuencias con demora**



**Gráfica 10.** Curvas de retención. Se presenta el índice de discriminación promedio de las secuencias en función del valor de las demoras interestímulos para cada una de las condiciones farmacológicas. Medias  $\pm$  E.E.M.

Inicialmente un análisis de varianza de dos factores mostró que las diferencias en la variación de la ejecución de los sujetos en esta fase experimental se explica mayormente por la administración de escopolamina [ANOVA:  $F_{(4, 0.076)} = 67.12$ ,  $p < 0.0001$ ] en comparación con la presentación propiamente de las diferentes demoras [ANOVA:  $F_{(6, 0.020)} = 18.31$ ,  $p < 0.0001$ ], siendo ambas variables significativas estadísticamente. En la siguiente tabla (tabla 12), se observa que un 63% del efecto de la variación total de los índices de discriminación está explicado por la administración del fármaco y un 27.31% por la presentación de las demoras.

Fuente de variación	% de la variación total	Significancia. Valor de P
Dosis	66.73	< 0.0001 ***
Demora	27.31	< 0.0001 ***

**Tabla 12.** Se muestra el porcentaje de variación total para los factores demoras y dosis de escopolamina durante la discriminación de secuencias.



El análisis anterior refleja que el efecto farmacológico es mayor sobre el desempeño de los sujetos en la tarea en comparación con el efecto de las demoras propiamente. A partir de ello y con el propósito de analizar con mayor detalle el efecto de la escopolamina, y la participación de los receptores muscarínicos, sobre las curvas de retención de los sujetos durante la tarea de discriminación de las secuencias, nuevamente se realizaron comparaciones de los diferentes parámetros de las curvas en las distintas condiciones farmacológicas, los cuales se presentan a continuación.

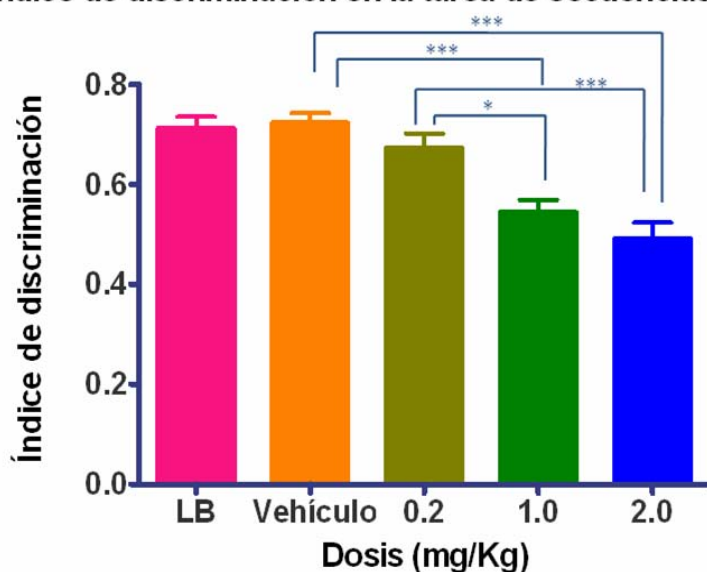
#### **8.2.4. Efecto farmacológico sobre el índice de discriminación**

El efecto dosis dependiente de la administración de escopolamina se aprecia mucho mejor cuando se comparan los valores del índice de discriminación del promedio total de las demoras para cada una de las diferentes dosis del fármaco.

En la siguiente gráfica (gráfica 11) se presenta el promedio total de ejecución de todas las demoras en cada una de las dosis farmacológicas, así como para la administración del vehículo y la línea base. El análisis estadístico mostró diferencias significativas [ANOVA:  $F_{(4, 0.076)} = 15.04$   $p < 0.0001$ ] entre las dosis administradas de escopolamina, el vehículo y la línea base. Particularmente, las diferencias se observaron (Tukey) entre las dosis 1.0 y 2.0 mg/kg con respecto al vehículo ( $p = 0.001$  y  $0.0001$ , respectivamente), asimismo se observaron diferencias entre las dosis de 1.0 y 2.0 mg/kg con respecto a la dosis de 0.2 mg/kg ( $p = 0.05$  y  $0.0001$ , respectivamente).

En lo que respecta a la comparación entre los valores de la línea base y del vehículo, nuevamente no se observaron diferencias estadísticas entre ambos grupos.

**Efecto de la administración de escopolamina sobre el índice de discriminación en la tarea de secuencias con demora**

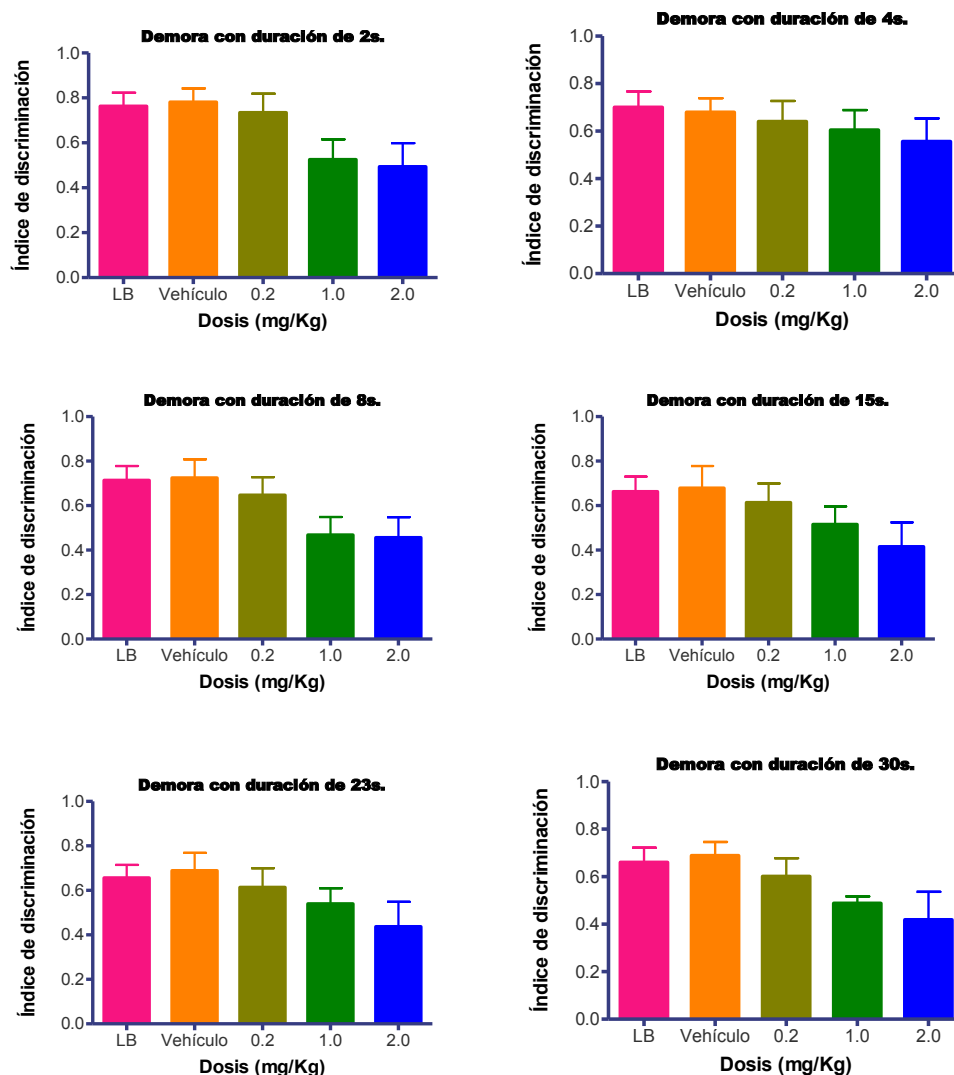


**Gráfica 11.** Promedios globales del índice de discriminación de secuencias del total de las demoras de acuerdo a las distintas dosis de escopolamina. Medias  $\pm$  E.E.M. Tukey: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

De igual forma el efecto dosis dependiente del bloqueo de los receptores muscarínicos sobre el índice de discriminación de las secuencias, se observa cuando se comparan los valores promedio pero en cada una de las demoras de forma independiente. En la siguiente gráfica (gráfica 12), se presentan los índices de discriminación en cada una de las condiciones farmacológicas de manera independiente para cada una de las demoras evaluadas. En este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las demoras con duración de 2.0 [ANOVA:  $F_{(4, 0.1098)} = 2.69$ ,  $p < 0.05$ ] y en la demora con duración de 8.0 segundos [ $F_{(4, 0.2412)} = 2.647$ ,  $p < 0.05$ ].

En general, en cuanto al índice de discriminación, tanto los valores promedio del total de las demoras como los promedios independientes para cada una de ellas, se aprecia un efecto negativo de la administración del fármaco sobre la ejecución de los sujetos y este efecto es mayor para las demoras más largas.

## Efecto de la escopolamina sobre la discriminación de secuencias auditivas para cada demora



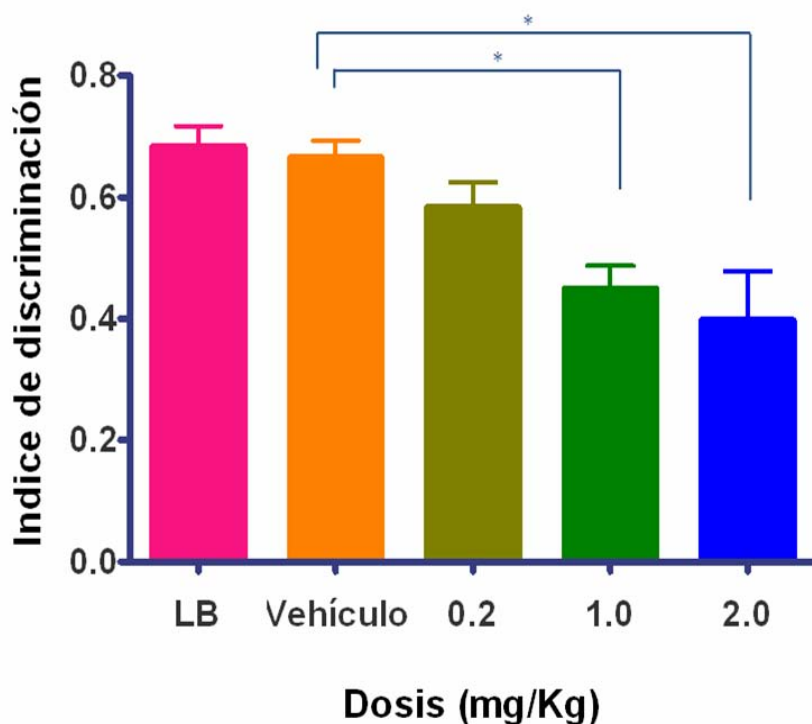
**Gráfica 12.** Efecto de la administración de escopolamina sobre la discriminación de secuencias auditivas en cada una de las demoras interestímulo evaluadas. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M.

### 8.2.5. Efecto sobre el valor mínimo de la curva

En la gráfica 13, se comparan los valores mínimos promedio obtenidos de las curvas de discriminación de secuencias con demoras, tanto para la condición de LB ( $0.577 \pm 0.054$ ), el vehículo ( $0.551 \pm 0.070$ ) y para las dosis de escopolamina de 0.2 ( $0.456 \pm 0.088$ ), 1.0 ( $0.325 \pm 0.063$ ) y 2.0 ( $0.267 \pm 0.095$ )

mg/kg. Se puede observar que la administración de escopolamina causó un decremento en el valor mínimo del índice de discriminación. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre grupos [ANOVA:  $F_{(4, 0.259)} = 3.21$ ,  $p < 0.05$ ]. Las comparaciones *post hoc* (Tukey) señalaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dosis de 1.0 y 2.0 mg/kg., con respecto a la administración del vehículo.

**Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor mínimo de la curva**



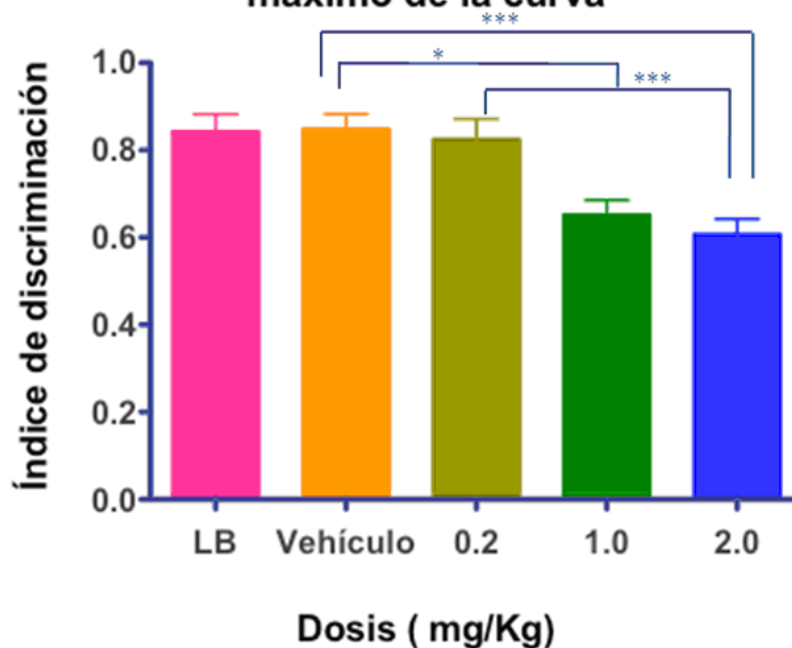
**Gráfica 13.** Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor mínimo de las curvas de discriminación de secuencias con demoras. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M. \* =  $p < 0.05$ .

#### 8.2.6. Efecto sobre el valor máximo de la curva

El efecto de la administración de escopolamina sobre el valor máximo de las curvas de discriminación de secuencias con demoras se presenta en la gráfica 14. Se grafica el valor promedio para la condición LB ( $0.843 \pm 0.038$ ), el vehículo ( $0.849 \pm 0.033$ ) y para las dosis de 0.2 ( $0.825 \pm 0.045$ ), 1.0 ( $0.824 \pm 0.051$ ) y 2.0 ( $0.732 \pm 0.064$ ) mg/kg de escopolamina. Nuevamente el análisis

de varianza mostró diferencias estadísticas. Particularmente las comparaciones *post hoc* (Tukey) señalan diferencias significativas entre las dosis de 1.0 y 2.0 mg/kg., con respecto a la administración del vehículo ( $p= 0.01$  y  $p= 0.001$  respectivamente) y para la dosis de 0.2 mg/ kg., con respecto a la dosis de 2.0 mg/ kg ( $p= 0.001$ ).

### Efecto de la administración de Escopolamina sobre el valor máximo de la curva



**Gráfica 14.** Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor máximo de la curva de discriminación de secuencias con demoras. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M. \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

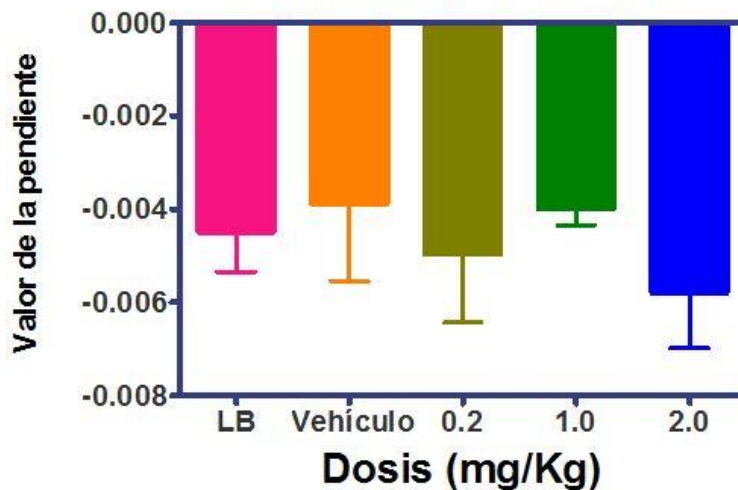
#### 8.2.7. Efecto sobre la pendiente

El análisis de los valores mínimo, máximo y promedios del índice de discriminación de las curvas de discriminación de secuencias con demoras, demuestra un efecto negativo dosis dependiente de la escopolamina sobre el desempeño de los sujetos, lo que señala la participación de los receptores muscarínicos en el proceso de discriminación de secuencias auditivas. Para evaluar con mayor precisión la participación de estos receptores en la capacidad de retención de la información sobre la tarea en la memoria de los sujetos, se analizó si el valor de la pendiente de las curvas presentó alguna

variación en alguna de las dosis de escopolamina administradas con respecto al vehículo o línea base.

En la gráfica 15, se observa la cuantificación de los valores promedio obtenidos para la pendiente de las curvas en la condición control ( $-0.0044 \pm 0.0008$ ), vehículo ( $-0.0038 \pm 0.0016$ ) y para las dosis de escopolamina de 0.2 ( $-0.0049 \pm 0.0014$ ), 1.0 ( $-0.0039 \pm 0.0003$ ) y 2.0 ( $-0.0057 \pm 0.0011$ ) mg/kg. El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticas significativas entre ninguna de las condiciones.

**Efecto de la administración de escopolamina sobre el valor de la pendiente de la curva**

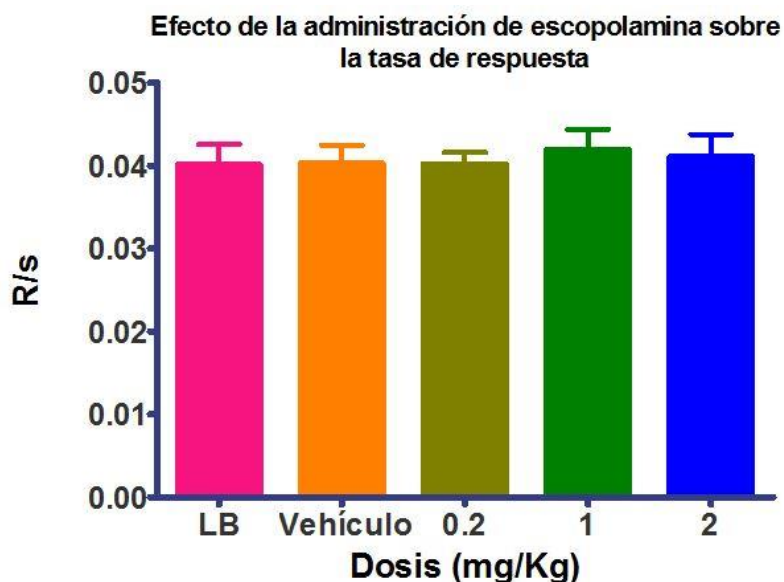


**Gráfica 15.** Efecto de la administración de escopolamina sobre la pendiente de las curvas de retención. LB= Línea base. Medias  $\pm$  E.E.M.

### 8.2.8. Efecto sobre la tasa de respuesta

Finalmente, con el objetivo de analizar si las variaciones en el desempeño de los sujetos durante las pruebas de discriminación de secuencias con demoras se debieron a cambios motores o motivacionales inducidos por la escopolamina, se comparó la tasa de respuestas promedio para cada una de las condiciones de esta fase. En la gráfica 16 se presentan los valores promedio de la tasa de respuestas de los sujetos bajo las distintas condiciones experimentales (dosis de escopolamina, vehículo y línea base). Nuevamente,

no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre las diferentes dosis de escopolamina administradas o con respecto a los controles [ANOVA:  $F_{(4, 4.092)} = 0.012$ ].



**Gráfica 16.** Tasa de respuestas (respuestas/segundo) para las diferentes dosis. No existen diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

A partir de los análisis anteriores, los resultados sugieren que los receptores colinérgicos muscarínicos tienen una participación directa en la discriminación de estímulos auditivos de diferente duración, no solo en estímulos simples como sino también en configuraciones en secuencia. Los resultados también sugieren que la participación de dichos receptores es fundamental en relación a la sensibilidad de los sujetos ante las propiedades temporales del estímulo discriminativo, ya que el bloqueo de estos receptores deteriora significativamente el proceso de generalización. Adicionalmente y de acuerdo a las dosis evaluadas, estos receptores juegan un papel importante en la capacidad de los sujetos para conservar y emplear la información de la tarea en la memoria a corto plazo durante intervalos breves de retención.

## 9. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la participación del sistema colinérgico muscarínico en la discriminación y generalización de estímulos temporales auditivos previamente aprendidos, así como analizar la participación de este sistema en la retención en memoria de información sobre la discriminación de secuencias de este tipo de estímulos, esto último a través del empleo de demoras interestímulos variables. La importancia del estudio radica en que la participación del sistema colinérgico, como ya se mencionó, ha sido poco explorada en este tipo de tareas, por lo que los resultados del presente trabajo se consideran una referencia importante sobre el tema.

A partir de los resultados del primer experimento se observa inicialmente que los sujetos fueron capaces de discriminar entre dos tonos que difieren solamente en la duración del estímulo. Adicionalmente, los sujetos presentaron un apropiado gradiente de generalización ante estímulos de duración similar (Domjan, 2010), en el cual las respuestas se ajustaron adecuadamente a una curva de generalización sigmoidea. En dicha curva, el valor promedio de duración del tono que produjo el 50% del índice de discriminación o punto de bisección, fue de  $3.59 \pm 0.09$  s., valor muy cercano al punto medio entre los 2 estímulos a discriminar. Mientras que la pendiente de la curva refleja una adecuada sensibilidad ante los cambios en el valor del estímulo.

Al llevar a cabo las pruebas con la administración de escopolamina en las tres dosis evaluadas, se observa una disminución dosis dependiente en la capacidad de discriminación de los sujetos, junto con un aplanamiento progresivo de la curva en función del incremento de la dosis. El efecto dosis dependiente provocado por la administración de escopolamina, indica que mientras mayor sea el bloqueo de los receptores muscarínicos, menor es la eficiencia en la ejecución de los sujetos durante la tarea. Estos resultados indican que el sistema colinérgico muscarínico tiene un papel importante en el mantenimiento de la discriminación de estímulos auditivos de diferente duración. Particularmente en las dosis mayores del fármaco, los cambios en el valor promedio de los índices de discriminación muestran que los sujetos



respondieron de forma azarosa, con índices de discriminación concentrados en valores alrededor del 50%. Es decir, en niveles comparables a aquellos presentados de forma previa a la adquisición de la tarea.

El hecho de que no se hayan observado cambios en la tasa de respuesta durante la administración de las diferentes dosis de escopolamina con respecto a las condiciones control o entre las distintas dosis, sugiere la ausencia de posibles efectos motores y/o motivacionales de la escopolamina sobre la conducta de los sujetos durante las sesiones prueba. Adicionalmente, el que no existan cambios en la tasa de respuestas también sugiere de forma moderada que no hubo cambios significativos en los niveles atentos de los sujetos, lo que se ve reforzado con referencias previas, en las cuales el efecto negativo de la administración de escopolamina es dissociado de procesos atentos, especialmente en estudios donde se introducen demoras temporales en la evaluación conductual (Chudasama et al., 2004). Por otra parte, no se observó un desplazamiento paralelo de las curvas de generalización bajo la presencia de ninguna de las dosis administradas de escopolamina. Un desplazamiento paralelo de las curvas de generalización bajo estas condiciones hubiera sugerido una sub o sobreestimación de la duración de los estímulos discriminativos. El hecho de que este efecto no se presentara, sugiere que el bloqueo de los receptores muscarínicos no interfiere primordialmente con la percepción de la temporalidad de los estímulos.

El efecto negativo del bloqueo de los receptores muscarínicos observado en el presente estudio es consistente con una amplia diversidad de estudios que refieren que la interrupción del sistema colinérgico afecta de manera directa con el desempeño de diversos tipos de tareas vinculadas con el aprendizaje y la memoria (Fibiger et al., 1991; Molchan et al., 1992; Nomura et al., 1994; Robinson et al., 2004; Sambeth et al., 2007; Klinkenberg y Blokland, 2010). Pero específicamente, los resultados del presente estudio son consistentes con reportes sobre la participación del sistema colinérgico muscarínico en tareas de discriminación de estímulos relativos al sistema sensorial visual y auditivo. Por ejemplo en la discriminación de estímulos visuales (Colpaert et al., 2001; Robinson et al., 2004), en la discriminación condicionada de combinaciones de

formas y figuras (Savage et al., 1996), así como en la detección de brechas (*gaps*) auditivas asociadas con la agudeza y resolución temporal auditiva (Ison y Bowen, 2000). Adicionalmente, los datos también son congruentes con un estudio preliminar (Meck, 1996), en el que se refiere que como parte del procesamiento temporal, el almacenamiento de información en memoria temporal parece estar vinculado con la actividad colinérgica en la corteza frontal, mientras que el mecanismo neural empleado como temporizador de duraciones de segundos a minutos parece estar relacionado a la función dopaminérgica en los ganglios basales.

El hipocampo y la neocorteza son estructuras con sustantiva actividad colinérgica (van der Zee y Luiten, 1999) y presentan una gran población de receptores muscarínicos, especialmente del tipo M1 (Klinkenber y Blokjan, 2010). Por lo cual es probable que estas estructuras puedan estar involucradas en el efecto de la escopolamina sobre las curvas de generalización en el presente trabajo. Por otra parte, el efecto de aplanamiento de las curvas de generalización, la ausencia de cambios en el punto de indiferencia conductual o punto de bisección, así como la ausencia de cualquier desplazamiento paralelo de las curvas de generalización bajo la administración del fármaco, sugieren que la participación del sistema colinérgico en este experimento podría asociarse mayormente a mecanismos de conservación de la información involucrando a las estructuras antes referidas. Convendría en este caso realizar experimentos posteriores en los que se analice la participación del sistema colinérgico en la discriminación y generalización de estímulos auditivos temporales, a través de la administración intracraneal de antagonistas muscarínicos, particularmente en estructuras como el propio hipocampo, la corteza frontal o incluso el estriado.

Por otro lado, el procedimiento de discriminación temporal puede realizarse a través de una variación de las tareas de igualación a la muestra simbólica y discriminación condicionada. En este tipo de tareas (ver: Roberts, 1998), cada ensayo inicia con la presentación de un estímulo muestra que está constituido por un intervalo determinado, por ejemplo una luz general que se enciende por un intervalo de 2 o 10 s., posteriormente dicha luz es apagada y dos estímulos

de comparación son presentados a continuación, por ejemplo una luz roja ubicada a la derecha y una luz verde ubicada a la izquierda. En el caso anterior, las respuestas a la luz roja podrán ser reforzadas si la luz general fue encendida por el intervalo de 2 s., mientras que las respuestas a la luz verde podrán ser reforzadas si la luz general fue encendida por 10 s. El procedimiento descrito es similar al empleado en el primer experimento del presente trabajo. Adicionalmente, el procedimiento permite la inserción de demoras entre el estímulo muestra y el estímulo de comparación, o entre los elementos constitutivos del estímulo muestra (Zamora-Arevalo et al., 2013), como en el caso del segundo experimento del presente estudio, en el cual se realizó la inserción de demoras variables interestímulos con el fin de obtener mayor información sobre la capacidad de retención de información en sistemas de memoria. Bajo esta condición el procedimiento es habitualmente referido como igualación a la muestra simbólica demorada (Roberts, 1998) y ha sido típicamente empleado para evaluar memoria de trabajo en modelos animales (Rayburn-Reeves y Zentall, 2009).

Con respecto a los resultados en el segundo experimento del presente estudio, los datos obtenidos muestran inicialmente que los sujetos fueron capaces de adquirir y mantener la discriminación de secuencias de estímulos auditivos de diferente duración. En este caso entre secuencias compuestas por 2 tonos de distinta duración. Dicho resultado es común en la literatura, sin embargo es pertinente mencionar que habitualmente los organismos en sus ámbitos naturales deben discriminar entre secuencias o series de eventos, lo cual aproxima al modelo experimental a las exigencias habituales del medio ambiente, además de que este procedimiento permite, como ya se mencionó, la inserción de demoras variables. Como dato adicional, durante la fase de adquisición de este paradigma experimental, se observó que a los sujetos les tomó un mayor número de sesiones adquirir la discriminación de la secuencia de mayor duración (larga) en comparación con la secuencia de menor duración (corta). Dicho fenómeno también fue notorio durante la fase de evaluación con las demoras. Este fenómeno es consistente con datos reportados en la literatura correspondientes a estudios con palomas y roedores y es conocido como efecto de elección al corto (Zentall, 2007). Bajo esta condición la

preferencia por la respuesta asociada al evento corto también ha sido previamente reportada (Kraemer et al, 1985). Se estima que este efecto no influyó en el análisis de los resultados a partir de que las fases de evaluación prueba iniciaron hasta que cada sujeto alcanzó los criterios de adquisición y a que los controles experimentales (LB y vehículo) estuvieron expuestos a las mismas condiciones.

Al llevar a cabo la evaluación con la inserción de las demoras variables entre los componentes de las secuencias, se observó un decremento en los índices de discriminación promedio; dicho decremento fue proporcional al incremento en los intervalos de retención o demoras. Es decir, mientras mayor fue la duración del intervalo de demora, menor fue el índice de discriminación promedio emitido por los sujetos. Esta condición es particularmente notoria en las demoras de menor valor, mientras que en las demoras de mayor valor el índice promedio de discriminación se estabiliza en valores por debajo de las condiciones control. El decremento en el desempeño de los sujetos como consecuencia de la inserción de las demoras es consistente con otros estudios, en los cuales también se aprecia una disminución en la retención de información como resultado de la inserción de demoras en distintas tareas de memoria con roedores (Otto y Eichenbaum, 1992; Clark et al., 2001). Adicionalmente y de manera interesante, dichos estudios destacan la participación directa del hipocampo en el desempeño de las tareas con este tipo de demoras.

En relación al análisis del efecto de la administración de las diferentes dosis de escopolamina sobre las curvas de retención durante la discriminación de secuencias, nuevamente se observó un decremento dosis dependiente en los índices de discriminación, tanto en los índices promedio generales como en los índices promedio para cada una de las demoras, así como en los valores mínimo y máximo de las curvas. De forma particular, el efecto de las dosis farmacológicas fue incluso mayor que el de las demoras propiamente. No se observaron cambios significativos en la pendiente de las curvas de retención, lo que sugiere que el efecto farmacológico fue homogéneo entre las diferentes demoras. En este caso resultaría interesante analizar también el decremento

neto de las curvas en función de las distintas dosis, es decir comparar entre las distintas condiciones, la diferencia total entre el valor correspondiente a la menor demora con respecto al valor de la mayor demora, con el fin de corroborar que el cambio sea también dosis dependiente. También es recomendable evaluar el efecto farmacológico contemplando demoras adicionales y de mayor duración.

Es importante señalar que en este segundo experimento tampoco se observaron diferencias significativas en la tasa de respuestas entre las condiciones control (LB y vehículo) y las 3 dosis evaluadas, o incluso entre las dosis. Lo cual refiere que en este segundo caso, los posibles efectos de la escopolamina sobre la motricidad o el estado motivacional de los sujetos experimentales, también pueden ser disociados de los cambios en la ejecución de la tarea.

Los resultados arrojados en este segundo experimento sugieren que el sistema colinérgico muscarínico juega un papel importante en la ejecución de la tarea de discriminación de secuencias y en la capacidad de retención de información de los sujetos evaluada a través de las demoras. Algunos estudios han referido resultados similares empleando procedimientos con demoras, por ejemplo Savage et al. (1996), en un procedimiento de discriminación condicionada en monos, evaluaron la retención de la información a través del uso de demoras de 60 minutos o 24 horas. En este estudio se reportó que la administración de escopolamina produjo un deterioro dosis dependiente en la retención de información 60 minutos después de su administración, mientras que no afectó el proceso de almacenamiento en memoria a largo plazo (consolidación) evaluado a través de la demora de 24 horas, lo que sugiere un efecto de la droga sobre el almacenamiento en memoria a corto plazo. En otro estudio realizado en monos, también se ha señalado que la administración de escopolamina altera de forma dosis dependiente el desempeño durante una tarea auditiva de igualación a la muestra con demoras variables. En este caso se empleó una tarea en la cual dos estímulos acústicos fueron separados por un intervalo de demora variable, en la cual la escopolamina deterioró la precisión en la ejecución sin afectar la respuesta motora, motivacional o de

recompensa de los sujetos (Plakke et al., 2008). Mientras que empleando una tarea de no igualdad a la posición demorada, se ha señalado que el incremento de la actividad colinérgica en neocorteza e hipocampo modifica de forma positiva el desempeño de ratas de 24 meses de edad (Dunnett et al., 1988).

Por otro lado, estudios farmacológicos en humanos han demostrado que el bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina altera la codificación de nueva información en memoria pero no la recuperación de memorias previamente almacenadas (Hasselmo y McGaughy, 2004). El hipocampo y la neocorteza son sustratos colinoceptivos y zonas blanco del prosencéfalo basal colinérgico, tienen una importante concentración de receptores muscarínicos M1 (Klinkenber y Blokian, 2010) y, además, estas estructuras han sido ampliamente relacionadas con la memoria (van der Zee y Luiten, 1999). Particularmente, en el marco de la hipótesis colinérgica de la memoria, se ha sugerido que la acetilcolina juega un papel importante en la forma en la que el hipocampo alterna entre la codificación/adquisición y la recuperación de la información (Hasselmo, 1999, 2006; Hasselmo y McGaughy, 2004; Meeter et al., 2004). A partir de un modelo de redes neuronales que involucra la participación de estructuras como la corteza entorrinal, el giro dentado, CA3 CA1 y el septum medial, se ha señalado que un incremento en los niveles de acetilcolina facilitan la codificación/adquisición de nueva información (Hasselmo, 2004; Meeter et al., 2004). Mientras que este mismo proceso puede verse deteriorado a partir de un decremento en los niveles de acetilcolina (Young et al., 1995; Winters et al., 2006, 2008).

En este sentido, los resultados del presente trabajo sugieren que el mecanismo mediante el cual la información es mantenida y empleada para la ejecución de una respuesta después de los intervalos de retención (demoras) parece estar sostenido en gran medida por la neurotransmisión colinérgica. Como hipótesis al respecto se sugiere la participación de sistemas hipocampales, ya que adicionalmente se ha señalado que el hipocampo contribuye a la memoria de reconocimiento a través de la comparación entre información actual y representaciones de estímulos previamente almacenados en regiones

parahipocampales y estructuras neocorticales (Otto y Eichenbaum, 1992), lo cual podría explicar los resultados del presente estudio.

Como sugerencias finales derivadas del presente estudio se sugiere la evaluación del efecto de la administración de escopolamina sobre las curvas de retención, pero introduciendo las demoras posteriormente a la presentación íntegra de la secuencia, es decir entre el estímulo muestra y el estímulo de comparación, esto con la finalidad de evaluar el efecto del fármaco sobre los procesos de mantenimiento o recuperación de la información, sin afectar la estructura de la secuencia. De igual forma también se sugiere realizar el experimento con demoras considerando la administración intracraneal de antagonistas muscarínicos directamente en estructuras cerebrales de interés, como el propio hipocampo. Otra alternativa podría considerar la administración intracerebral de inmunotoxinas, las cuales acoplan un anticuerpo para una proteína específica de un sistema celular y una citotoxina, de esta forma se puede inactivar un sistema, por ejemplo el colinérgico, y evaluar su participación con mayor especificidad. Un ejemplo de lo anterior es el uso de la IgG-192-saporina, que administrada en las inmediaciones del núcleo septal produce una marcada reducción de la actividad colinérgica en el hipocampo, lo cual se ha propuesto incluso como un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Walsh et al., 1996).

## 10. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio los sujetos experimentales adquirieron rápidamente la capacidad de discriminar entre dos estímulos auditivos de distinta duración y presentaron una alta sensibilidad a los cambios en las propiedades temporales del estímulo auditivo.
2. La administración del antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, escopolamina, produjo un decremento dosis dependiente en la capacidad de los sujetos para discriminar y generalizar su respuesta ante estímulos auditivos de diferente duración previamente aprendidos.
3. Los sujetos adquirieron la capacidad para discriminar secuencias conformadas por pares de estímulos auditivos de diferente duración, mientras que la introducción de intervalos de demora interestímulos disminuye proporcionalmente el desempeño en la tarea.
4. El bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos produjo una disminución significativa en la capacidad de los sujetos para conservar información durante intervalos de retención en una tarea de discriminación de secuencias de estímulos auditivos de diferente duración.
5. Los experimentos realizados en el presente estudio muestran la relevancia del sistema colinérgico muscarínico en la discriminación, generalización y memoria a corto plazo de estímulos auditivos simples y complejos con componentes temporales.



## 11. REFERENCIAS

- Acquas E, Wilson C, Fibiger HC. (1996). Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci.* 16(9): 3089-3096.
- Amenta F, Tayebati SK. (2008). Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr Med Chem.* 15(5): 488-498.
- Araujo DM, Lapchak PA, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R. (1993). Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 50(6): 1914-1923.
- Bandrowski AE, Moore SL, Ashe JH. (2001). Cholinergic synaptic potentials in the supragranular layers of auditory cortex. *Synapse.* 41(2): 118-130.
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217(4558): 408-414.
- Baxter MG, Bucci DJ, Gorman LK, Wiley RG, Gallagher M. (1995). Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behav Neurosci.* 109(4): 714-722.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. (2008). *Neurociencia. La exploración del cerebro.* 3a edición. Barcelona: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins.
- Boisvert MJ, Sherry DF. (2006). Interval timing by invertebrate, the bumble bee *bombus impatiens*. *Current Biology.* 16(16): 1636-1640.
- 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. *J Pharmacol Exp Ther.* 260(2): 576-580.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* 237(4814): 527-532.
- Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley N J. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1(5): 403-410.
- Boren JJ, Navarro AP. (1959). The action of atropine, benactyzine, and scopolamine upon fixed-interval and fixed-ratio behavior. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior.* 2(2): 107-115.
- Brailowsky S. (1998). *Las sustancias de los sueños. Neuropsicofarmacología.* 2da Ed. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR. (1988). Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci.* 8(12): 4646-4652.
- Buhusi CV, Meck WH. (2002). Differential effects of metamphetamine and haloperidol on the control of an internal clock. *Behavioral Neuroscience.*

116(2): 291-297.

- Carlson NR. (2014). *Fisiología de la Conducta*. 11a Edición. Madrid, España: Pearson Education, S.A.
- Caulfield MP. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 58(3): 319-379.
- Christensen H, Maltby N, Jorm AF, Creasey H, Broe GA. (1992). Cholinergic 'blockade' as a model of the cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Brain.* 115( Pt 6): 1681-1699.
- Chudasama Y, Dalley JW, Nathwani F, Bouger P, Robbins TW. (2004). Cholinergic modulation of visual attention and working memory: dissociable effects of basal forebrain 192-IgG-saporin lesions and intraprefrontal infusions of scopolamine. *Learn Mem.* 11(1): 78-86.
- Church RM. (1978). The internal clock. En: Hulse S, Fowler H, Hoing WK (Eds). *Cognitive process in animal behavior*. Hillsdale, NJ: Erlbaum Associates.
- Church RM. (1984). Properties of the internal clock. *Ann N Y Acad Sci.* 423: 566-582.
- Church RM. (2002). Temporal learning. En: Gallistel CR. (Ed.). *Steven's Handbook of Experimental Psychology*. Vol. 3. New York: Wiley. pp. 365-394 (Learning, Motivation and Emotion).
- Clark RE, West AN, Zola SM, Squire LR. (2001). Rats with lesions of the hippocampus are impaired on the delayed nonmatching-to-sample task. *Hippocampus.* 11(2): 176-186.
- Colpaert FC. (1999). Drug discrimination in neurobiology. *Pharmacol Biochem Behav.* 64 (2): 337-345.
- Colpaert FC, Koek W, Bruins Slot LA. (2001). Evidence that mnemonic states govern normal and disordered memory. *Behav Pharmacol.* 12(8): 575-589.
- Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW. (2009). Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 30(3): 148-155.
- DeCoteau WE, Hoang L, Huff L, Stone A, Kesner RP. (2004). Effects of hippocampus and medial caudate nucleus lesions on memory for direction information in rats. *Behav Neurosci.* 118(3): 540-545.
- De Jaeger X, Cammarota M, Prado MA, Izquierdo I, Prado VF, Pereira GS. (2013). Decreased acetylcholine release delays the consolidation of object recognition memory. *Behav Brain Res.* 238(1Feb): 62-68.
- Deutsch JA. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science.* 174(4011): 788-794.
- Drachman DA. (1977). Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role?. *Neurology.* 27(8): 783-790.
- Drachman DA, Leavitt J. (1974). Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?. *Arch Neurol.* 30(2): 113-121.
- Domjan M. (2010) *Principios de aprendizaje y conducta*. Sexta edición. México:

## Wadsworth Change Learning.

- Dunnett SB. (1985). Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 87(3): 357-363.
- Dunnett SB, Badman F, Rogers DC, Evenden JL, Iversen SD. (1988) Cholinergic grafts in the neocortex or hippocampus of aged rats: reduction of delay-dependent deficits in the delayed non-matching to position task. *Exp Neurol*. 102(1): 57-64.
- Ebert U, Kirch W. (1998). Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest*. 28(11): 944-949.
- Eglen RM, Hedge SS, Watson N. (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacological Reviews*. 48 (4): 531-565.
- Ennaceur A, Meliani K. (1992). Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. *Psychopharmacology (Berl)*. 109(3): 321-330.
- Fibiger HC. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends in Neurosci*. 14(6): 220-223.
- Flood JF, Cherkin A. (1986). Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? *Behav Neural Biol*. 45(2): 169-184.
- Gericke CA, Lang UE, Steckler T, Schulze G, Bajbouj M, Hellweg R. (2003). Nerve growth factor response to excitotoxic lesion of the cholinergic basal forebrain is slightly impaired in aged rats. *J Neural Transm*. 110(6): 627-639.
- Gonzalez CL, Miranda MI, Gutierrez H, Ormsby C, Bermudez-Rattoni F. (2000). Differential participation of the NBM in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion and Morris water maze. *Behav Brain Res*. 116(1): 89-98.
- Guttman N, Kalish HI. (1956). Discriminability and stimulus generalization. *Journal of experimental psychology*. 51: 79-88.
- Hardy TK, Wakely D. (1962). The amnesic properties of hyoscine and atropine in pre-anaesthetic medication. *Anaesthesia*. 17: 331-336.
- Hasselmo M. (1999). Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cog Sci*. 3(9): 351-359.
- Hasselmo M. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 16(6): 710-715.
- Hasselmo M, McGaughy J. (2004). High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res*. 145: 207-231.
- Hearst E. (1959) Effects of scopolamine on discriminated responding in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 126(4): 349-358.
- Hedreen JC, Bacon SJ, Cork LC, Kitt CA, Crawford GD, Salvaterra PM, et al. (1983). Immunocytochemical identification of cholinergic neurons in the

- monkey central nervous system using monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. *Neurosci Lett.* 43(2-3): 173-177.
- Hodges DB Jr, Lindner MD, Hogan JB, Jones KM, Markus EJ. (2009). Scopolamine induced deficits in a battery of rat cognitive tests: comparisons of sensitivity and specificity. *Behav Pharmacol.* 20(3): 237-251.
- Honing WK, Wasserman EA. (1981). Performance of pigeons on delayed simple and conditional discrimination under equivalent training procedures. *Learning and Motivation.* 12: 149-170.
- Hsieh CY, Cruikshank SJ, Metherate R. (2000). Differential modulation of auditory thalamocortical and intracortical synaptic transmission by cholinergic agonist. *Brain Res.* 880(1-2): 51-64.
- Hulme EC, Birdsall NJ, Burgen AS, Mehta P. (1978). The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* 14(5): 737-750.
- Ison JR, Bowen GP. (2000). Scopolamine reduces sensitivity to auditory gaps in the rat, suggesting a cholinergic contribution to temporal acuity. *Hear Res.* 145(1-2): 169-176.
- Killeen PR, Fetterman JG. (1988). A behavioral theory of timing. *Psychological Review.* 95(2): 274-295.
- Kimura H, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG. (1981). The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J Comp Neurol.* 200(2): 151-201.
- Klinkenberg I, Blokland A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 34(8): 1307-1350.
- Kopelman MD. (1986). The cholinergic neurotransmitter system in human learning and memory: a review. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology.* 38A: 535-573.
- Kraemer PJ, Mazmanian D, Roberts WA. (1985). The choose-short effect in pigeon memory for stimulus duration: Subjective shortening versus coding models. *Animal Learning & Behavior.* 13: 349-354.
- Laplante F, Morin Y, Quirion R, Vaucher E. (2005). Acetylcholine release is elicited in the visual cortex, but not in the prefrontal cortex, by patterned visual stimulation: a dual in vivo microdialysis study with functional correlates in the rat brain. *Neuroscience.* 132(2): 501-510.
- Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsaki G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience.* 62(4): 1033-1047.
- Lee JH, el-Fakahany EE. (1985) [3H]N-Methylscopolamine binding to muscarinic receptors in intact adult rat brain cell aggregates. *Biochem Pharmacol.* 34(24): 4299-4303.
- Levin ED. (1988) Scopolamine interactions with D1 and D2 antagonists on radial-arm maze performance in rats. *Behav Neural Biol.* 50(2): 240-245.
- Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portoles A. (2008).

- Velázquez. *Farmacología Básica y clínica*. 18° edición. España: Editorial Médica Panamericana.
- Lusting C, Meck WH. (2011). Modality differences in timing and temporal memory throughout the lifespan. *Brain and cognition*. 77(2): 298-303.
- Martinez-Murillo R, Villalba RM, Rodrigo J. (1990). Immunocytochemical localization of cholinergic terminals in the region of the nucleus basalis magnocellularis of the rat: A correlated light and electron microscopic study. *Neuroscience*. 36(2): 361–376.
- McKinney M, Jacksonville M C. (2005). Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochem Pharmacol*. 70(8): 1115-1124.
- Meck WH. (1996). Neuropharmacology of timing and time perception. *Brain Res - Cogn Brain Res*. 3(3-4): 227-242.
- Meeter M, Murre JM, Talamini LM. (2004). Mode shifting between storage and recall based on novelty detection in oscillating hippocampal circuits. *Hippocampus*. 14(6): 722-741.
- Mendoza N. (2008). *Farmacología médica*. México: Ed. Médica Panamericana.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 214(2): 170-197.
- Metherate R, Ashe JH. (1995). Synaptic interactions involving acetylcholine, glutamate and GABA in rat auditory cortex. *Exp Brain Res*. 107(1): 59-72.
- Metherate R, Ashe, J. H., & Weinberger, N. M. (1990). Acetylcholine modifies neuronal acoustic rate-level functions in guinea pig auditory cortex by an action at muscarinic receptors. *Synapse*, 6(4), 364-368.
- Metherate R, Weinberger NM. (1990). Cholinergic modulation of responses to single tones produces tone-specific receptive field alterations in cat auditory cortex. *Synapse*, 6(2), 133-145.
- Meyers B, Domino EF. (1964). The effect of cholinergic blocking drugs on spontaneous alternation in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 150: 525-529.
- Minces VH, Alexander AS, Datlow M, Alfonso SI, Chiba AA. (2013). The role of visual cortex acetylcholine in learning to discriminate temporally modulated visual stimuli. *Front. Behav. Neurosci*. 7:16. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00016. Epub 2013 Mar 20.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F. (2003). Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiol Learn Mem*. 80(3): 211-222.
- Mitchell SJ, Rawlins JN, Steward O, Olton DS. (1982). Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *J Neurosci*. 2(3): 292-302.
- Molchan SE, Martinez RA, Hill JL, Weingartner HJ, Thompson K, Vitiello B, et

- al. (1992). Increased cognitive sensitivity to scopolamine with age and a perspective on the scopolamine model. *Brain Res Rev.* 17(3): 215-226.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 297(5868): 681-683.
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonomic MD, DeKosky ST. (2003). Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat.* 26(4): 233-242.
- Nagai T, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG, Dolman CE. (1983). Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. *Neurosci Lett.* 36(2): 195-199.
- Nagy, P. M., & Aubert, I. Overexpression of the vesicular acetylcholine transporter increased acetylcholine release in the hippocampus. *Neuroscience*, 218, 1-11.
- Niewiadomska G, Baksalerska-Pazera M, Riedel G. (2009). The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(5): 791-805.
- NOM-062-Z00-1999: NORMA Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación* 22 de agosto de 2001.
- Nomura Y, Nishiyama N, Saito H, Matsuki N. (1994). Role of cholinergic neurotransmission in the amygdala on performances of passive avoidance learning in mice. *Biol Pharm Bull.* 17(4): 490-494.
- Oda Y, Nakanishi I. (2000). The distribution of cholinergic neurons in the human central nervous system. *Histol Histopathol.* 15(3): 825-834.
- O'Keefe J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research.* 34(1): 171-175.
- O'Keefe J. (1979). A review of the hippocampal place cells. *Progress in neurobiology.* 13(4): 419-439.
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. (2000). Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosc.* 3(2): 120-125.
- Olton DS, Papas BC. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia.* 17(6): 669-682.
- Otto T, Eichenbaum H. (1992). Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: evidence for hippocampal processing in recognition memory. *Hippocampus.* 2(3): 323-334.
- Page KJ, Everitt BJ, Robbins TW, Marston HM, Wilkinson LS. (1991). Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA- and ibotenic acid-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss. *Neuroscience.* 43(2-3): 457-472.
- Plakke B, Ng CW, Poremba A. (2008). Scopolamine impairs auditory delayed

- matching-to-sample performance in monkeys. *Neurosci Lett.* 438(1): 126-130.
- Rasmusson DD. (2000). The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav Brain Res.* 115(2): 205-218.
- Rayburn-Reeves R, Zentall TR. (2009). Animal memory: the contribution of generalization decrement to delayed conditional discrimination retention functions. *Learn Behav.* 37(4): 299-304.
- Reynolds GS. (1961). Attention in the pigeon. *Journal of the experimental analysis of behavior.* 4(3): 203-208.
- Reynolds GS. (1968). *A Primer in Operant Conditioning.* Illinois: Scott, Foresman.
- Roberts WA. (1998). *Principles of animal cognition.* Boston: McGraw Hill.
- Robinson L, Harbaran D, Riedel G. (2004). Visual acuity in the water maze: sensitivity to muscarinic receptor blockade in rats and mice. *Behavioural Brain Research.* 151(1-2): 277-286.
- Sambeth A, Riedel WJ, Smits LT, Blokland A. (2007). Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG?. *Eur J Pharmacol.* 572(2-3): 151-159.
- Sarter M, Bruno JP, Turchi J. (1999). Basal forebrain afferent projections modulating cortical acetylcholine, attention and implications for neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 877: 368-382.
- Sarter M, Parikh V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 6(1): 48-56.
- Savage UC, Faust WB, Lambert P, Moerschbaeher JM. (1996). Effects of scopolamine on learning and memory in monkeys. *Psychopharmacology (Berl).* 123(1): 9-14.
- Schmeller T, Sporer F, Sauerwein M, Wink M. (1995) Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie.* 50(7): 493-495.
- Schliebs R. (2005). Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease--interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res.* 30(6-7): 895-908.
- Semba K. (2000). Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav Brain Res.* 115(2): 117-141.
- Shannon HE, Bymaster FP, Calligaro DO, Greenwood B, Mitch CH, et al. (1994). Xanomeline: a novel muscarinic receptor agonist with functional selectivity for M1 receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 269 (1): 271-281.
- Shiraishi K, Takayanagi I. (1993). Subtype of muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rat iris dilator smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* 24(1): 139-142
- Shute CCD, Lewis PR. (1967). The ascending cholinergic reticular system:

- neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain*. 90: 497-520.
- Spinelli S, Ballard T, Feldon J, Higgins GA, Pryce CR. (2006) Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. *Neuropharmacology*. 51(2): 238-250.
- Squire LR, Kandel ER. (2000). *Memory: from mind to molecules*. USA: Scientific American Library.
- Tobin G, Giglio D, Götrick B. (2002). Studies of muscarinic receptor subtypes in salivary gland function in anaesthetized rats. *Autonomic Neuroscience*. 100(1-2): 1-9.
- Toshimichi H, Hiroshige O. (2004). Medial Prefrontal cortex and precision of temporal discrimination: a lesion, microinjection, and microdialysis study. *Neuroscience Research*. 49(1): 81-89.
- Van der Zee EA, Luiten PG. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. 58(5): 409-471.
- von Bohlen und Halbach O, Dermietzel R. (2006) *Neurotransmitters and Neuromodulators. Handbook of receptors and biological effects*. Second edition. Weinheim Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Walsh TJ, Herzog CD, Gandhi C, Stackman RW, Wiley RG. (1996). Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Res*. 726(1-2): 69-79.
- Winson J. (1978). Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science*. 201(4351): 160-163.
- Weiner N. (1980). Atropine, scopolamine, and related muscarinic drugs. En: Goodman LS, Gilman A. (Eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Macmillan.
- Wess, J., Duttaroy, A., Zhang, W., Gomeza, J., Cui, Y., Miyakawa, T., et al. (2003). M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors Channels*, 9(4), 279-290.
- Wess J, Eglen RM, Gautam D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 6(9): 721-733.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. (2006). Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: implications for cholinergic system function. *J Neurosci*. 26(37): 9520-9529.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev*. 32(5): 1055-1070.
- Wolf NJ. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord.



Prog Neurobiol. 37(6): 475-524.

Young SL, Bohenek DL, Fanselow MS. (1995). Scopolamine impairs acquisition and facilitates consolidation of fear conditioning: differential effects for tone vs context conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* 63(2): 174-180.

Zamora-Arevalo O, Vanegas-Chavarría M, Bouzas-Riaño A. (2013). Efectos diferenciales de los intervalos de retención en una tarea de discriminación de secuencias temporales. *Conductual.* 1(2): 22-39.

Zentall TR. (2007). Temporal discrimination learning by pigeons. *Behav Processes.* 74(2): 286-292.