

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Alteración de la actividad neuronal de la corteza prefrontal de ratas por un agonista del
receptor de benzodiazepinas, y su efecto en la atención

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

María Marta Yurrita Obiols

Guatemala

2002

Alteración de la actividad neuronal de la corteza prefrontal de ratas por un agonista del receptor de benzodiazepinas, y su efecto en la atención

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Alteración de la actividad neuronal de la corteza prefrontal de ratas por un agonista del receptor de benzodiazepinas, y su efecto en la atención

Trabajo de investigación presentado para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Guatemala

2002

PREFACIO

Los avances científicos de los últimos años han permitido un mejor entendimiento de la organización de los seres vivos. Sin embargo, unos de los misterios que aún quedan por resolver son las bases biológicas de los procesos cognitivos. Entre éstos, uno de los más básicos pero también uno de los más importantes es la atención, ya que de ella dependen los demás procesos cognitivos. En efecto, la atención es el proceso por el cual seleccionamos la información relevante de entre la multitud de estímulos sensoriales con los que somos bombardeados en todo instante. De esta manera podemos tener una visión del mundo ordenada y podemos almacenar en nuestra memoria la información importante.

Este trabajo es un modesto intento de contribuir al entendimiento de los sistemas biológicos que controlan nuestra facultad para poner atención. Lamentablemente, los métodos disponibles para el estudio de los procesos cognitivos tienen aún numerosas limitaciones. La mayor de las limitaciones es la dificultad que implica el trabajar con organismos vivos: los métodos de estudio son relativamente rudimentarios, ya que es prácticamente imposible alterar de manera selectiva un único factor, manteniendo constantes los demás factores en animales de laboratorio. Por lo tanto, los resultados aquí presentados tienen que ser interpretados con cierto grado de precaución.

En la elaboración de este experimento recibí la generosa ayuda de varias personas, a quienes deseo agradecer. En primer lugar, quiero agradecer al Doctor Bennet Givens, por su apoyo y por guiarme en el desarrollo del experimento. También estoy muy agradecida al Doctor Michael Gill, por introducirme en el complejo mundo del estudio de la electrofisiología en seres vivos. Quiero agradecer a Chris Nagy y a Jessica Masty por ayudarme con procedimientos de rutina, así como a David Waxler y Andrew Jonson por ayudarme a resolver problemas técnicos.

Por último, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo y ejemplo.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO	iv
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Organización del sistema colinérgico del diencefalo	1
B. Activación de la corteza cerebral	1
C. Funciones cognitivas del sistema colinérgico	2
D. El sistema colinérgico y la atención	3
E. Circuitos neuronales que controlan la atención	5
F. Objetivos	6
G. Hipótesis	7
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
A. Sujetos de estudio	9
B. Aparatos para el estudio del comportamiento	9
C. Entrenamiento	10
D. Electrodo	12
E. Cirugía	13
F. Registro de la actividad neurofisiológica	14
G. Microinyecciones	15
H. Lesión electrolítica	16
I. Microinyección de colorante	16

	Página
J. Perfusión cardiaca e histología	16
K. Medidas del comportamiento	17
L. Medidas electrofisiológicas	17
M. Análisis estadístico	18
1. Datos del comportamiento	18
2. Datos electrofisiológicos	19
III. RESULTADOS	20
A. Histología	20
B. Análisis del comportamiento	20
1. Efecto de microinyecciones de solución salina	20
2. Efecto de microinyecciones de CDP (clordíacepóxido)	21
C. Análisis electrofisiológico	22
1. Características de las neuronas de CPFm (corteza prefrontal medial) ..	22
2. Las microinyecciones de CDP aumentan la actividad durante el desempeño base	22
3. Cambios en la actividad neuronal asociados a la presentación de una distracción	23
4. Correlación de actividad neuronal de la CPFm con las medidas de comportamiento	24
IV. DISCUSIÓN	26
V. CONCLUSIONES	33
VI. BIBLOGRAFÍA	36
VII. ANEXO: Cuadros y figuras	47
A. Métodos	47
1. Aparatos para el estudio del comportamiento y reglas de respuesta	47

	página
2. Electrodo	48
3. Sujetos de estudio	48
B. Resultados	49
1. Histología	49
2. Análisis del comportamiento	50
3. Análisis electrofisiológico	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Velocidad de descarga promedio (en descargas/s) en cada bloque y durante la sesión completa después de cada uno de los tratamientos.....	55
2. Cambios en la velocidad de descarga de las neuronas de la CPFm durante la presentación de una distracción.....	55
3. Correlación de la actividad neuronal en la CPFm con diferentes aspectos de la tarea de atención visual sostenida.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Dibujo esquemático de la cámara de experimentación adaptada para registrar la actividad electrofisiológica.....	47
2. Parte frontal de la cámara de entrenamiento y reglas de respuesta. La parte superior presenta las reglas de respuesta para los eventos señalizados, mientras que la parte inferior presenta las reglas de respuesta para los eventos no señalizados.....	47
3. Esquema de los electrodos empleados para registrar la actividad electrofisiológica.....	48
4. Sujeto con el mecanismo de registro de la actividad electrofisiológica.....	48
5. Localización de la punta de los electrodos dentro de la CPFm.....	49
6. Localización de las cánulas guía para la microinyección de droga.....	49
7. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el índice de vigilancia para cada una de las duraciones de la señal luminosa.....	50
8. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el desempeño de ratas en una tarea de atención visual sostenida.....	50
9. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en la exactitud en eventos señalizados (parte superior) y en la exactitud en eventos no señalizados (parte inferior) en cada uno de los bloques.....	51
10. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el índice de vigilancia (IV) en cada bloque.....	52
11. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en la preferencia por alguna de las palancas de respuesta.....	52

Figura	Página
12. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el porcentaje de omisiones en eventos señalizados (parte superior de la figura) y en eventos no señalizados (parte inferior).....	53
13. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el índice de vigilancia (IV) y la exactitud en los eventos señalizados.....	54
14. Ejemplos representativos de las neuronas que presentaron cambios en la velocidad de descarga durante la presentación de la distracción (bloque 2).....	55
15. Ejemplos de correlaciones entre la actividad neuronal de la CPFm y diversos sucesos de la tarea de atención visual sostenida.....	56

RESUMEN

Existe abundante evidencia que indica que el sistema colinérgico de los núcleos basales del diencefalo está involucrado en el control del procesamiento de la atención. Las proyecciones colinérgicas del diencefalo contactan con todas las regiones de la corteza cerebral de manera uniforme. Sin embargo, en los últimos años, el interés se ha centrado en las proyecciones colinérgicas del diencefalo a la corteza prefrontal medial (CPFm), puesto que se sabe que estas proyecciones son necesarias para un desempeño adecuado en tareas de atención. Adicionalmente, existe evidencia que indica que la actividad neuronal de la CPFm es modulada por incrementos en los requerimientos de atención, y que los cambios observados en la actividad de la CPFm dependen de la integridad del sistema colinérgico. No obstante, es necesario realizar más estudios con el objeto de determinar los mecanismos por los cuales el sistema colinérgico de los núcleos basales controlan el procesamiento de la atención.

El presente experimento fue diseñado para estudiar el efecto que las microinyecciones de clordiazepóxido (CDP), un agonista de los receptores de benzodiazepinas, tienen en el desempeño de las ratas en una tarea de atención, así como en la actividad neuronal en la CPFm. Los agonistas de los receptores de benzodiazepinas no activan directamente a los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA), sino que dependen del GABA endógeno. Por lo tanto, se espera que los efectos del CDP sean de relevancia fisiológica.

Se encontró que las microinyecciones de CDP producen una tendencia hacia la disminución de la exactitud en eventos señalizados. Por el contrario, todas las demás medidas del comportamiento no son afectadas por el CDP. El efecto en el comportamiento que tuvieron las microinyecciones de CDP en este experimento, es similar al observado al eliminar el impulso colinérgico. Por lo tanto, estas observaciones concuerdan con la hipótesis de que el CDP produce deficiencias de atención, revelados por deficiencias en el desempeño en la tarea, por medio de su efecto en la liberación de

acetilcolina en la corteza cerebral. Adicionalmente, las microinyecciones de la dosis alta de CDP aumentaron la proporción de las neuronas de la CPFm cuya actividad no presentaba ningún tipo de correlación con ningún aspecto de la tarea. Este efecto se debió principalmente a una reducción en el número de neuronas que presentaban correlaciones inhibitorias con la obtención y el consumo de la recompensa.

Contrariamente a lo predicho inicialmente, se encontró que el CDP aumentó la velocidad de descarga de las neuronas de la CPFm durante el desempeño base. Adicionalmente, se encontró que el CDP no tuvo ningún efecto en la modulación de la actividad neuronal en la CPFm por la introducción de una distracción. Los cambios en actividad dentro de la CPFm que se observaron después de las microinyecciones de CDP, difieren de los cambios esperados según la hipótesis de trabajo. En efecto, se predijo que el CDP tendría como consecuencia la disminución de los niveles de acetilcolina en la corteza cerebral. Ahora bien, la pérdida parcial del impulso colinérgico produce una disminución en la velocidad de descarga de las neuronas en la CPFm. De la misma manera, se sabe que una reducción en los niveles de acetilcolina en la corteza cerebral altera la proporción de neuronas cuya actividad es modulada por la presentación de una distracción.

Los resultados expuestos anteriormente indican que el CDP produce deficiencias de atención, y que estas deficiencias en el comportamiento se deben probablemente a los efectos que el CDP tiene en la liberación de acetilcolina en la corteza cerebral. Además, indican que las microinyecciones de CDP tienen un efecto más complejo en la actividad neuronal de la CPFm, que involucra cambios en la actividad de las neuronas colinérgicas y GABAérgicas dentro de los núcleos basales del diencefalo.

I. INTRODUCCIÓN

A. Organización del sistema colinérgico del diencefalo

El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisores más importantes del cerebro (Mesulam, 1995; Perry *et al.*, 1999). Las neuronas que proporcionan los impulsos colinérgicos a la corteza cerebral, y a otras estructuras del diencefalo, provienen principalmente de un grupo heterogéneo de núcleos en el diencefalo (Woolf, 1991). La organización de este grupo de núcleos, llamados el sistema colinérgico del diencefalo, es muy difusa (Záborszky, 1992; Mesulam *et al.*, 1983). Las proyecciones de las neuronas colinérgicas contactan con neuronas de las diferentes regiones de la corteza cerebral de manera uniforme, y alcanzan todas las capas corticales (Lamour *et al.*, 1984; Woolf, 1991; Záborszky, 1992). Estudios anatómicos han revelado que a pesar de que los axones colinérgicos tienen muchas ramificaciones, éstas están restringidas a regiones pequeñas, de tal manera que distintas neuronas contactan con diferentes partes de la corteza (Aston-Jones *et al.*, 1985; Záborszky y Duque, 2000).

Dentro del diencefalo, las neuronas colinérgicas que envían proyecciones a diferentes regiones de la corteza están distribuidas en varios núcleos (Bigl *et al.*, 1982; Woolf *et al.*, 1984). Sin embargo, distintas neuronas del mismo núcleo pueden enviar proyecciones a diferentes regiones cerebrales (*ibid*). Adicionalmente, estas células se encuentran mezcladas con numerosas neuronas no colinérgicas (Záborszky *et al.*, 1986), y están muy próximas a varios sistemas de fibras ascendentes y descendentes (Záborszky, 1989). La compleja organización anatómica y sináptica de este sistema ha limitado mucho el desarrollo de hipótesis sobre su función (Sarter y Bruno, 1997).

B. Activación de la corteza cerebral

Inicialmente se propuso que la función del sistema colinérgico del diencefalo consistía en la activación general del cerebro, función que es consistente con su organización difusa (Záborszky, 1992; Mesulam *et al.*, 1983). La evidencia a favor de esta hipótesis proviene de electroencefalogramas (EEG) tomados durante la realización de distintas tareas. Estos EEG han revelado que la activación de la corteza depende de forma crítica de las proyecciones provenientes del diencefalo (Buszáki *et al.*, 1988;

Détári *et al.*, 1999; Jiménez-Capdeville *et al.*, 1997). No obstante, en esos experimentos existen inconsistencias en cuanto a la definición operativa del término “activación”. Adicionalmente, el desarrollo de nuevos y más refinados métodos para analizar el comportamiento ha provocado la necesidad de una revisión profunda de las hipótesis sobre la función de la acetilcolina (ACh) en la corteza cerebral (Robbins y Everitt, 1995; Sarter y Bruno, 1997).

C. Funciones cognitivas del sistema colinérgico

Los primeros indicios que sugieren que el sistema colinérgico del diencefalo está involucrado en funciones cognitivas provienen de estudios de pacientes seniles o con la enfermedad de Alzheimer. Se demostró que las deficiencias cognitivas observadas en estos pacientes están correlacionadas con la reducción en el número y el tamaño de las neuronas colinérgicas (para revisiones de la literatura ver Bartus *et al.*, 1982; y Coyle *et al.*, 1983). Debido a la naturaleza de estas deficiencias se propuso que la función del sistema colinérgico del diencefalo podría ser la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria (Dekker *et al.*, 1991; Kesner, 1988; Olton *et al.*, 1991).

Varios estudios con animales proporcionan evidencia a favor de esta hipótesis. Por ejemplo, se ha encontrado que las lesiones del diencefalo por medio de toxicidad por excitación producen deficiencias en el desempeño en varios tipos de tareas de memoria (Dekker *et al.*, 1991; Kesner, 1988; Olton y Wenk, 1987). Adicionalmente, varios estudios electrofisiológicos indican que las neuronas del diencefalo responden selectivamente a estímulos de refuerzo en tareas de aprendizaje y memoria (Richardson y DeLong, 1990; Wilson y Rolls, 1990).

No obstante, es difícil interpretar los resultados de los primeros estudios que emplearon lesiones por medio de toxicidad por excitación, ya que dichas lesiones destruían tanto neuronas colinérgicas como no colinérgicas (Dekker *et al.*, 1991; Dunnett *et al.*, 1991). Además, el grado de destrucción de las células colinérgicas no parecía estar correlacionado con el nivel de deficiencia en el desempeño de los animales en las tareas de memoria (Dunnett *et al.*, 1987; Robbins *et al.*, 1989). Estos resultados sugieren que los trastornos en el comportamiento son el resultado del daño de estructuras cerebrales y no de la pérdida del impulso colinérgico (*ibid*).

D. El sistema colinérgico y la atención

Por otra parte, los resultados de estudios en los que los animales fueron entrenados para detectar estímulos sensoriales breves e impredecibles (Robbins *et al.*, 1989), o para discriminar entre diferentes estímulos en un período de tiempo prolongado (Olton *et al.*, 1988), sugieren que el sistema colinérgico del diencefalo está involucrado en el control de algunos tipos de atención (Muir *et al.*, 1993). En otros experimentos se encontró que monos con lesiones tóxicas por excitación tenían dificultades para desviar su atención visual y espacial, pero conservaban la habilidad para realizar tareas de aprendizaje y memoria (Voytko *et al.*, 1994). Estas inconsistencias en los estudios con lesiones por toxicidad han conducido a la revisión de la función propuesta para el sistema colinérgico del diencefalo (Fibiger, 1991; Voytko *et al.*, 1994).

El desarrollo de la inmunotoxina 192 IgG-saporina ha hecho posible la realización de lesiones selectivas y controladas de las neuronas colinérgicas de los núcleos basales del diencefalo. Esta proteína está compuesta por un anticuerpo, una IgG, que está dirigido contra el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (NGF). El anticuerpo lleva asociada una toxina, la saporina, que al entrar en la célula impide el ensamblaje de los ribosomas y produce de esta forma la muerte celular. Esta inmunotoxina es de mucha utilidad, puesto que existe un alto grado de correspondencia entre el fenotipo colinérgico y la expresión del receptor del NGF dentro de los núcleos basales (Wenk, 1997; Wiley *et al.*, 1991).

Los estudios en los que se realizaron lesiones con 192 IgG-saporina han demostrado que la realización de diversas tareas de memoria no dependen de la integridad del sistema colinérgico del diencefalo (Baxter *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1994; Wenk *et al.*, 1994). De la misma manera, el uso de un inhibidor selectivo de la enzima colina acetiltransferasa, que produce una pérdida casi total de la actividad de la enzima en todo el cerebro, no afecta la resolución de una prueba en un laberinto de brazos radiales (Wenk *et al.*, 1986).

Por el contrario, se ha demostrado que las lesiones del diencefalo con 192 IgG-saporina producen deficiencias en tareas que miden distintos tipos de atención, tales como la atención visual y espacial, la atención sostenida, y la atención dividida (Chiba *et al.*, 1999; McGaughy *et al.*, 1996; Turchi y Sarter, 1997). Adicionalmente, Muir y

colaboradores (1992) demostraron que el desempeño de ratas con lesiones no selectivas del diencefalo en una tarea de atención visual, mejora con injertos de neuronas colinérgicas en la corteza cerebral.

Evidencia adicional a favor de la hipótesis de que la acetilcolina controla los procesos de atención, proviene de estudios en los que el sistema es manipulado con fármacos. Por ejemplo, se ha encontrado que en ratas en las cuales el sistema colinérgico del diencefalo ha sido lesionado, las deficiencias en el desempeño en tareas de atención son eliminadas mediante tratamientos con nicotina y fisostigmina (Muir *et al.*, 1995). Al mismo tiempo, la administración de antagonistas del receptor de nicotina (Turchi *et al.*, 1995) y de hemicolinio, un bloqueador del sistema de transporte de la colina (Muir *et al.*, 1992), a ratas no lesionadas, produce deficiencias en el desempeño en tareas de atención visual. También se ha demostrado que en pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer, la nicotina mejora los resultados en tareas de atención sostenida (Sahakian *et al.*, 1989). Por el contrario, la administración oral de escopolamina, un bloqueador del receptor colinérgico, provoca deficiencias en atención (Dunne y Hartley, 1986).

Adicionalmente, estudios de microdiálisis han revelado que la liberación de acetilcolina en la corteza aumenta con la activación cerebral y con los procesos de atención (Himmelheber *et al.*, 2000; Inglis *et al.*, 1994). Es interesante que la liberación de acetilcolina en la corteza frontoparietal aumenta aún más al incrementar los niveles de atención requeridos para completar una tarea de atención (Himmelheber *et al.*, 2000).

Los niveles de acetilcolina en la corteza cerebral pueden ser modulados negativamente por la administración, tanto sistémica como de forma localizada dentro de los núcleos basales, de agonistas del receptor de benzodiazepinas tales como el clordiazepóxido (CDP) (Moore *et al.*, 1993, 1995). Estos tratamientos también producen deficiencias en el desempeño de las ratas en tareas de atención (Holley *et al.*, 1995). Por otra parte, las microinyecciones de agonistas de GABA directamente dentro del núcleo basal de Meynert (NBM), una región del diencefalo, producen deficiencias en otro tipo de tarea de atención (Pang *et al.*, 1993). Los efectos de los agonistas de GABA y de receptores de benzodiazepinas en ratas son consistentes con informes previos que indicaban que los agonistas de receptores de benzodiazepinas producen deficiencias de atención en los seres humanos (Preston *et al.*, 1988). Los resultados de los artículos expuestos

anteriormente sugieren, en su conjunto, que la acetilcolina en la corteza cerebral está involucrada en el control de la atención.

E. Circuitos neuronales que controlan la atención

En numerosos artículos se delinear circuitos neuronales específicos que están asociados con distintas formas de atención en seres humanos (Mesulam, 1981; Corbetta *et al.*, 1991; Pardo *et al.*, 1991). La realización de tomografías de emisión de positrones (PET) ha revelado que, en humanos, diferentes regiones de la corteza son activadas al realizar tareas que miden diferentes tipos de atención, tales como la atención selectiva, dividida o visual y espacial (Corbetta *et al.*, 1991; Mesulam, 1983; Posner *et al.*, 1984). De forma similar, la microinyección simultánea de 192 IgG-saporina en múltiples áreas de la corteza cerebral en ratas produce deficiencias en la realización de una tarea de atención sostenida (McGaughy y Sarter, 1998). Una región en particular, la corteza prefrontal medial (CPFm) ha sido considerada uno de los componentes principales de los circuitos neuronales que procesan varias formas de atención en humanos (para revisiones de la literatura sobre el tema ver Knight *et al.*, 1995; Pardo *et al.*, 1991), y en primates no humanos (Fuster, 1995).

La corteza prefrontal medial ha sido implicada en el control de varias funciones de memoria de trabajo (Brito y Brito, 1990; Poucet y Herrmann, 1990), de ejecución, de procesamiento espacial (Kolb, 1984), y en particular, con la toma de decisiones, la preparación de una respuesta motora y la asignación de importancia a los estímulos sensoriales (Balleine y Dickinson, 1998; Fuster, 1991). Sin embargo, los efectos nocivos de lesiones de la CPFm en tareas de memoria de trabajo son más marcados en tareas complejas, que requieren un esfuerzo de procesamiento mayor, indicando que esta región cerebral está involucrada en funciones más complejas (Granon *et al.*, 1994). Por otra parte, las infusiones de escopolamina en la CPFm producen deficiencias que dependen de la duración de la espera en una tarea de discriminación continua (Herremans *et al.*, 1997). Los resultados de este último experimento indican que la CPFm está involucrada en procesos de atención selectiva y no en el control de la memoria de trabajo (Herremans *et al.*, 1997).

Otros experimentos han proporcionado resultados similares. Por ejemplo, se ha observado que ratas con lesiones de la CPFm tienen dificultades para resolver tareas que requieren atención dividida o sostenida (Brown *et al.*, 1991; Olton *et al.*, 1988). Un experimento particularmente importante es el realizado por Muir y colaboradores en 1996. En dicho experimento se demostró que lesiones por toxicidad de la CPFm producen deficiencias en el desempeño de una tarea de atención, mientras que lesiones de otras regiones de la corteza cerebral no producen ningún trastorno en la realización de dicha tarea.

Por último, existe evidencia proveniente de estudios electrofisiológicos que indican que la CPFm y el sistema colinérgico del diencefalo están involucrados en el control de atención. Un estudio publicado recientemente por nuestro laboratorio reveló la existencia de correlaciones entre la actividad neuronal de la CPFm y la realización de una tarea de atención (Gill *et al.*, 2000). Este estudio demostró que el suceso de la tarea que tiene mayor efecto en la actividad de la CPFm es el incremento en la dificultad de la tarea que resulta de la presentación de una distracción. Algunas de las neuronas registradas respondieron a la presentación de la distracción aumentando o disminuyendo su velocidad de descarga. La pérdida local y unilateral del impulso colinérgico en la región de registro redujo el número de neuronas cuya actividad era modulada por la distracción, aunque no tuvo ningún efecto en la realización de la tarea (Gill *et al.*, 2000). Adicionalmente, las neuronas de la CPFm exhibieron cambios en actividad que estaban correlacionados con sucesos específicos de la tarea, principalmente con la preparación y ejecución de una respuesta, y con la anticipación y el consumo de la recompensa. También se encontró que la proporción de neuronas que presentaban correlación con algún suceso de la tarea se redujo después de la pérdida del impulso colinérgico (Gill *et al.*, 2000).

F. Objetivos

Por lo tanto, existe evidencia sólida que relaciona el sistema colinérgico del diencefalo, y en particular sus proyecciones a la CPFm, con el control de la atención en diversas especies animales. Sin embargo, se necesita mayor información para comprender los mecanismos por los cuales la acetilcolina modula la atención y la

actividad de la CPFm. En particular, es importante determinar en qué manera la manipulación del sistema colinérgico del diencéfalo afecta la actividad neuronal de la CPFm, y cómo estos cambios, si existen, están asociados con cambios en el comportamiento.

Estudios previos han demostrado que el tratamiento con agonistas del receptor de benzodiazepinas reduce la liberación de acetilcolina en la corteza (Moore *et al.*, 1993, 1995). Además, este tratamiento reduce el porcentaje de aciertos en una tarea de atención visual sostenida (Holley *et al.*, 1995). No obstante, no se ha determinado cuál es el efecto de estas manipulaciones en la actividad de la CPFm tanto espontánea como asociada a la realización de la tarea. Por lo tanto, se diseñó este experimento para estudiar los efectos de microinyecciones dentro de los núcleos basales de CDP en la actividad neuronal de la CPFm de ratas que realizan una tarea de atención visual sostenida. Adicionalmente, se diseñó este experimento con el objeto de determinar los cambios en la actividad neuronal de la CPFm que están asociados a deficiencias en el desempeño bajo condiciones de mayor dificultad (durante la presentación de una distracción). Puesto que los agonistas de los receptores de benzodiazepinas no aumentan directamente la actividad de GABA, sino que dependen de sus niveles normales, este experimento proporcionará información sobre los mecanismos por los cuales GABA modula el procesamiento de atención *in vivo*.

G. Hipótesis

Se sabe que las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales reducen el porcentaje de aciertos en la tarea de atención visual empleada en este experimento (Holley *et al.*, 1995). Por consiguiente, se esperaba observar un efecto similar en la exactitud en los eventos señalizados después de los tratamientos con CDP. Así mismo, se esperaba que el CDP no tendría efecto en la exactitud en eventos no señalizados, ni en el porcentaje de omisiones, ni en la preferencia por una de las dos palancas de respuesta. En este experimento, las medidas fueron tomadas en una versión diferente de la tarea, que incluye un período de mayor dificultad. Debido a los resultados de los estudios expuestos anteriormente, se esperaba que las deficiencias en el desempeño debidas al incremento de la dificultad de la tarea serían mayores después de las microinyecciones de CDP.

Debido a la complejidad del sistema colinérgico de los núcleos basales, y de los receptores de GABA, era muy difícil predecir los efectos que tendrían los tratamientos con CDP en la actividad espontánea de las neuronas de la CPFm. Sin embargo, se sabe que el CDP reduce la liberación de acetilcolina en la corteza (Moore *et al.*, 1993, 1995), y que la pérdida del impulso colinérgico en la zona de registro reduce la velocidad de descarga de las neuronas de la CPFm (Gill *et al.*, 2000). Por consiguiente, se esperaba que las microinyecciones de CDP dentro del diencefalo tendrían un efecto similar en la actividad neuronal de la CPFm.

Adicionalmente, se esperaba que las microinyecciones de CDP afectarían la modulación de la actividad neuronal de la CPFm por la distracción. Así mismo, se postuló que este tratamiento alteraría el patrón de correlación entre la actividad neuronal de la CPFm y los diferentes sucesos importantes de la tarea. En concreto, se proponía que el CDP reduciría la proporción de neuronas cuya actividad es modulada positivamente por la distracción. En efecto, se sabe que la pérdida local del impulso colinérgico reduce la proporción de neuronas que presentan un incremento en actividad asociado a la presentación de la distracción (Gill *et al.*, 2000). Además, se cree que las deficiencias en el desempeño producidas por el CDP se deben a la inhibición del sistema colinérgico del diencefalo (Sarter *et al.*, 1992). Del mismo modo, se predijo que las microinyecciones de CDP reducirían el número de neuronas que presentan cada tipo de correlación entre su actividad y los diferentes sucesos del comportamiento.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Sujetos de estudio

Los sujetos empleados en este experimento fueron ratas adultas machos de la especie Long-Evans ($n=9$, Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN). Las ratas pesaban entre 250 y 300 gramos al inicio del estudio. Fueron alojadas en parejas en un animalario en el cual se mantenían a niveles constantes la temperatura (25 °C) y la humedad (45%). El animalario tenía un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (las luces se encendían a las 6:30 a.m.). Las ratas tuvieron acceso libre a comida y agua hasta el inicio del experimento. A partir de ese momento, las ratas fueron alojadas individualmente y el acceso a agua fue restringido. Los animales recibían agua durante las sesiones diarias de entrenamiento, y en su jaula durante un tiempo de menos de veinte minutos después de cada sesión. Esto último se hacía con el objeto de que las ratas mantuvieran por lo menos el 85% de su peso en condiciones sin restricciones. Todos los animales fueron manipulados extensamente desde su llegada al animalario. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de la Universidad del Estado de Ohio.

B. Aparatos para el estudio del comportamiento

Las ratas fueron entrenadas inicialmente en cámaras de experimentación de 28 cm de largo por 21 cm de ancho por 27 cm de alto. Estas cámaras estaban colocadas dentro de cajas para atenuar el sonido y la luz (medidas: 64cm x 41cm x 41 cm, Med Associates, East Fairfield, VT). La parte frontal de la cámara de experimentación tenía tres luces de estimulación (2.8W) que estaban centradas seis centímetros por encima de tres palancas de respuesta. Además, en la parte frontal se encontraba una luz principal (2.8W) que estaba situada cinco centímetros por encima de la luz de estimulación situada en el centro. Las palancas de respuesta estaban situadas siete centímetros por encima de un suelo de rejilla. En la parte posterior de la cámara de experimentación se localizaban un altavoz y un dispensador de agua. El dispensador de agua entregaba una gota de agua (60 μ l) como recompensa, dentro de un recipiente que estaba imbuido en la pared (5 cm de ancho x 3 cm de fondo x 5 cm de alto). Cuando las ratas alcanzaban un rendimiento

estable a un nivel aceptable de exactitud, eran transferidas a una cámara de experimentación adaptada para registrar la actividad electrofisiológica. La figura 1 presenta un esquema de esta cámara de experimentación.

Esta cámara era idéntica a la cámara de entrenamiento, pero poseía paredes más altas (42 cm) y un recipiente para el agua más grande (6.5 cm x 6 cm x 13 cm). Este recipiente tenía incorporado un diodo emisor y un detector en la entrada. Esta cámara también estaba colocada dentro de una caja más grande para atenuar el sonido y la luz (59 cm x 39 cm x 54 cm). En la parte superior de esta caja había instalada una cámara de video conectada a una televisión y un grabador de videocasetes. Ambos tipos de cámara de experimentación estaban controladas por computadoras personales con programas informáticos desarrollados por Med Associates Inc (Georgia, VT).

C. Entrenamiento

Las ratas fueron entrenadas en una tarea en la que tenían que presionar una de dos posibles palancas para obtener agua como recompensa. Con el objeto de evitar que desarrollaran preferencia por alguna de las palancas de respuesta, las ratas no eran recompensadas por más de cinco respuestas consecutivas en la misma palanca. Cuando las ratas llegaron a emitir por lo menos cincuenta respuestas en cada una de las palancas, durante una sesión de una hora y por tres días consecutivos, se inició el entrenamiento en una tarea de atención visual sostenida.

En esta tarea se entrenó a las ratas para que aprendieran a diferenciar entre la presentación al azar de dos tipos de eventos: eventos no señalizados y eventos señalizados. En estos últimos, se presentaba una señal luminosa breve y de duración variable, consistente en la iluminación de la luz de estimulación central. Ambos tipos de eventos eran seguidos, un segundo más tarde, por un tono de 200 milisegundos de duración que abría una ventana de respuesta de cuatro segundos. Al terminar esta ventana, o cuando la rata efectuaba una respuesta, se iniciaba un intervalo de separación de pruebas (ISP) cuya duración variaba entre siete y trece segundos. La figura 2 ilustra la parte frontal de la cámara de experimentación y las reglas de respuesta de la tarea.

En los eventos señalizados, las ratas debían presionar la palanca situada a la izquierda para efectuar una respuesta correcta, denominada un “Acierto” (A). En este tipo de eventos cuando la rata presionaba la palanca situada a la derecha emitía una respuesta incorrecta, llamada “Fallo” (F). Por el contrario, en los eventos no señalizados, presionar la palanca derecha era considerado una respuesta correcta, denominada “Rechazo Correcto” (RC), mientras que presionar la palanca izquierda era una respuesta incorrecta y era llamada una “Falsa Alarma” (FA). Con cada respuesta correcta las ratas recibían una recompensa que consistía en una gota de agua. Con las respuestas incorrectas, los animales no recibían agua. El presionar la palanca central no tenía consecuencias. Durante una sesión se presentaba un total de aproximadamente 150 pruebas, de las cuales la mitad eran eventos señalizados. Los dos tipos de eventos eran presentados de manera aleatoria. Cada sesión duraba 46 minutos e incluía un período de tarea de 36 minutos, dividido en tres bloques de doce minutos cada uno. El período de tarea era precedido y seguido por dos períodos de cinco minutos en los que las ratas no tenían que responder.

El entrenamiento en la tarea de atención visual sostenida se efectuó en tres etapas. En la primera etapa las ratas debían reconocer eventos señalizados en los que se presentaba una señal de 500 milisegundos de duración. Además, en esta etapa, una respuesta incorrecta tenía como consecuencia la presentación de pruebas de corrección. En estas pruebas, el mismo tipo de evento era presentado por un máximo de cinco veces o hasta que la rata efectuara una respuesta correcta. En la segunda etapa de entrenamiento se omitió la presentación de pruebas de corrección. Para pasar de una etapa de entrenamiento a la siguiente, las ratas debían alcanzar un mínimo de 70% de respuestas correctas en ambos tipos de eventos, y un máximo de 30% de omisiones (O) durante tres días consecutivos. En la última etapa de entrenamiento fueron introducidas señales luminosas de dos nuevas duraciones (25 y 50 milisegundos).

Cuando las ratas respondieron correctamente un mínimo del 75% de las veces en ambos tipos de eventos, con menos del 25% de omisiones durante tres días seguidos, se les presentó una versión modificada de la tarea. Esta versión, denominada “sesión con distracción” aumentaba el nivel de atención que debían poner para responder correctamente. Esta sesión era idéntica a la última etapa de entrenamiento, con la excepción de que durante el segundo bloque del período de tarea se introducía una

distracción. Ésta consistía en la luz principal que parpadeaba a una frecuencia de 0.5Hz. Cada rata recibió cinco o seis sesiones con distracción, separadas entre sí por un mínimo de tres sesiones normales. Después de la quinta sesión con distracción, las ratas fueron transferidas a una cámara de experimentación equipada con un sistema para registrar la actividad electrofisiológica. Las ratas fueron sometidas a cirugía después de la tercera sesión con distracción en esta nueva cámara.

D. Electrodo

La actividad electrofisiológica fue registrada empleando electrodos dobles, descritos originalmente por McNaughton y colaboradores en 1983. Los electrodos dobles fueron preparados sumergiendo en un pegamento epoxídico un par de alambres de tungsteno (20µm de diámetro, California Fine Wire, Grofer Beach, CA) y cocinándolos a 200 °C durante una hora. Dos pares de electrodos dobles fueron insertados en una cánula guía, de calibre 30 y de 18 mm de largo, de tal manera que sobresalían entre 2.1 y 2.3 mm por la parte inferior. La figura 3 representa un esquema del sistema de electrodos.

La cánula guía con los electrodos fue pegada a un mecanismo de transmisión. Este mecanismo consistía en un portador que tenía en cada extremo una varilla con surcos y que permitía, al girar las varillas, introducir los electrodos a mayor profundidad en el cerebro después de su implantación por medio de cirugía. En la parte de atrás del portador se encontraban cuatro alambres de plomo. Los dos alambres finos de cada electrodo doble fueron separados el uno del otro en la parte superior de la cánula guía. El recubrimiento empleado como aislante fue removido, y cada alambre fue enrollado alrededor de un alambre de plomo separado. Para lograr buena conductividad eléctrica, esta conexión fue cubierta con pintura de níquel. Una vez seco, las partes delicadas fueron cubiertas con pegamento como medio de aislamiento y protección.

La impedancia de los alambres finos estaba comprendida entre 140 y 320 kΩ. El mecanismo de transmisión estaba también equipado con una cánula guía para microinyecciones, de 20 mm de largo. La cánula guía para microinyecciones estaba localizada paralelamente a la cánula guía que contenía los electrodos, a una distancia de menos de un milímetro. Un protector de calibre 32 y de 20 mm de largo fue colocado

dentro de la segunda cánula guía para prevenir su obstrucción y el desarrollo de infecciones.

E. Cirugía

Todas las ratas recibieron un antibiótico (30 mg/kg de Cefadroxil; Bristol-Myers, Barceloneta, PR) por vía oral dos veces diarias durante los dos días precedentes a la cirugía. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano. Durante la cirugía, la temperatura corporal fue controlada y estabilizada a 37 ± 0.5 °C. Para ello se empleó una sonda que se insertaba en el recto y estaba conectada a una sábana térmica (Harvard Apparatus, Edenbridge, KY). Una vez anestesiada, se afeitó la cabeza de la rata y se colocó al animal en un aparato para cirugías de animales pequeños, que permite mantener la cabeza fija (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se limpió el cuero cabelludo con Betadine® y se procedió a hacer una pequeña incisión por el medio. La piel y las membranas subyacentes fueron retiradas suavemente para exponer el cráneo. Una vez expuesto, se abrieron pequeños agujeros que atravesaban el hueso. Para ello se empleó un barreño pequeño sujetado por el aparato para cirugías.

Un mecanismo con los electrodos fue montado en cada hemisferio, de tal manera que los electrodos quedaron dentro de la corteza prefrontal medial. Para ello se emplearon las siguientes coordenadas: + 2.8 mm en la dirección anterior-posterior; ± 1.5 mm en la dirección medio-lateral; - 2.5 mm desde la superficie de duramadre en la dirección dorsal-ventral, a un ángulo de 10° hacia el centro. Estas coordenadas fueron determinadas de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson (1998). Además, se implantó en la corteza sensorimotora un electrodo de acero inoxidable cubierto con teflón (250µm de diámetro, A-M Systems, Everitt, WA), a manera de una tierra de referencia. Otro electrodo similar fue enrollado alrededor de un tornillo colocado en la superficie del cráneo. Este último electrodo sirvió para llevar a tierra al animal. Los dos electrodos de tierra y el mecanismo de transmisión fueron conectados a un conector de plástico colocado en la parte de atrás de la cabeza de la rata.

Además se implantaron en ambos hemisferios cerebrales cánulas guía para la microinyección de drogas (calibre 26; Plastics One, Roanoke, VA). Estas últimas fueron colocadas en los núcleos basales usando las siguientes coordenadas: - 3.0 mm en la

dirección antero-posterior, y ± 2.8 mm en la dirección medio-lateral a un ángulo de 15° en dirección a la nariz. Se emplearon dos diferentes coordenadas en la dirección dorso-ventral: -6.4 mm desde la superficie de duramadre para los cinco animales con los cuales se emplearon microinyectores que sobresalían 1 mm por la parte inferior de la cánula guía; y -7.4 mm desde la superficie de duramadre para las cuatro ratas para las que se emplearon microinyectores de la misma longitud que la cánula guía. Estas coordenadas fueron escogidas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 1998. El mecanismo de transmisión, los electrodos conectados a tierra, las cánulas guía y el conector fueron fijados a la superficie del cráneo con tornillos y cemento dental, tal como se puede observar en la figura 4.

Al finalizar la cirugía, se aplicó sobre la herida un gel que contenía un anestésico local (Pramoxina HCl) y antibióticos (Sulfato de Polimixina B, Sulfato de Neomicina, y Bacitracina Zinc). Este gel fue aplicado sobre la herida una vez diaria durante los tres días que siguieron a la cirugía. En esos días las ratas recibieron además 30mg/kg de Cefadroxil dos veces al día.

F. Registro de la actividad neurofisiológica

Después de la cirugía, las ratas tuvieron una semana de recuperación en sus jaulas, con comida y agua en abundancia. Al terminar la semana, la cantidad de agua disponible diariamente fue reducida gradualmente antes del inicio de la colecta de datos. Se registraron potenciales eléctricos por medio de un amplificador operacional que se conectaba al inicio de la sesión en la cabeza de la rata, tal como puede verse en la figura 4. Esta actividad era enviada a un conmutador que distribuía las señales eléctricas a dos amplificadores diferenciales de cuatro canales (A-M Systems, Everitt, WA). Las señales analógicas eran amplificadas y filtradas (sólo se recogían las señales con una frecuencia mayor a 300Hz y menor a 5kHz). Por último, las señales eran digitalizadas con un convertidor analógico-digital (DT2821, 250kHz).

Únicamente se registraron, a una frecuencia de 25kHz, las señales que tenían una amplitud máxima superior a un límite mínimo definido por el usuario en cualquiera de los electrodos de un mismo electrodo doble. Para ello se emplearon los programas informáticos de Discovery (Datawave Technologies, Longmont, CO). Al inicio de una

sesión se separaba la actividad múltiple detectada en cada electrodo doble en sus varios componentes (i.e., en la actividad de las diferentes neuronas). Esto se conseguía gracias a la agrupación de las señales de cada neurona al construir gráficas empleando varios parámetros extraídos de la forma de la señal en cada uno de los electrodos. Los parámetros empleados para esto incluían: la amplitud máxima, el ángulo de fase máximo, la amplitud del valle, el ángulo de fase del valle, la amplitud entre el punto de mayor amplitud y el valle, y la amplitud máxima de la señal.

La actividad de cada neurona seleccionada era registrada a lo largo de la sesión, por un mínimo de dos sesiones normales y una sesión con distracción. Después de cada sesión con distracción, el mecanismo de transmisión era avanzado a zonas más profundas del cerebro con el objeto de estudiar la actividad de distintas neuronas. El software que controlaba la cámara de experimentación estaba programado para enviar un pulso de 5 voltios a una tarjeta digital de medición de tiempo para señalar cada suceso relevante del comportamiento. Estos incluían: la aparición de la señal luminosa, la emisión de un tono, cambios en el estado de la luz principal, el movimiento de las palancas de respuesta (tanto dentro de la ventana de respuesta como durante el ISP), la liberación de agua, y la entrada al sitio donde se encuentra el recipiente de agua. Este software también enviaba pulsos a la tarjeta de medición de tiempo que indicaban el inicio y el final de cada prueba, la duración de la señal, y los eventos no señalizados. Estos pulsos eran introducidos como banderas dentro de la señal electrofisiológica a una resolución de 0.1 milisegundo.

G. Microinyecciones

Las ratas recibieron microinyecciones dentro de los núcleos basales de forma bilateral. Este procedimiento se iniciaba 10 minutos antes del inicio de las sesiones con distracción. Se les inyectó soluciones de 0, 20 o 40 μg de clordiazepóxido en solución salina. Además, todas las ratas recibieron un tratamiento control, en el que se simulaba una microinyección pero no empleaba ninguna solución. Un grupo de ratas ($n=5$) recibió microinyecciones a una velocidad de 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante cinco minutos (para llegar a un volumen total de 0.5 μl en cada hemisferio cerebral). Para esto se emplearon microinyectores que sobresalían 1 mm por la parte inferior de la cánula guía. Para

realizar las microinyecciones del segundo grupo de ratas (n=4) se emplearon inyectores de la misma longitud de la cánula guía. Estas ratas recibieron un total de 0.5 μ l de droga en cada hemisferio cerebral a una velocidad de 0.5 μ l/min durante un minuto. En ambos casos, los inyectores fueron dejados dentro de la cánula guía durante cinco minutos al terminar la microinyección. Todas las ratas recibieron todos los tratamientos y dos sesiones con distracción sin recibir microinyecciones. El orden de los tratamientos fue determinado de forma aleatoria.

H. Lesión electrolítica

Al terminar el experimento, las ratas fueron anestesiadas con una dosis de 50 mg/kg de Nembutal. La localización final de la punta de los electrodos fue marcada haciendo una lesión electrolítica muy pequeña. Para ello se envió un pulso de -15μ A de 20 segundos de duración en cada uno de los cuatro electrodos dobles. Se empleó un estimulador y una unidad de aislamiento para realizar las lesiones electrolíticas (Grass Instruments, Quincy, MA).

I. Microinyección de colorante

Con el objeto de verificar la localización de las cánulas guía para la microinyección de las drogas, cada rata recibió una microinyección en ambos hemisferios cerebrales de una solución al 1% de Chicago Sky Blue. Para ello se siguió el mismo protocolo que el empleado para la microinyección de drogas. Las ratas fueron preparadas para perfusión cardiaca al terminar la microinyección del tinte.

J. Perfusión cardiaca e histología

Para la perfusión cardiaca se empleó una solución salina al 0.9% fría, seguida por una solución de formalina al 10% en un tampón. Posteriormente los cerebros fueron fijados por 24 horas en formalina al 10% y luego transferidos a una solución de sacarosa al 25% en un tampón de fosfato (0.1 M, pH 7.4). Se obtuvieron secciones de 50 μ m de grosor de cada cerebro usando un criostato. Estas secciones fueron colocadas en un tampón de fosfato 0.1 M de pH 7.4 y almacenados a 4° C hasta que fueron puestas en portaobjetos.

Las secciones así preparadas fueron teñidas siguiendo los procedimientos estándares para la tinción de Nissl.

K. Medidas del comportamiento

Para cada sesión se registró el número de aciertos, fallos, rechazos correctos, falsas alarmas, y errores de omisión. Únicamente las sesiones con distracción en las que las ratas respondieron a más del 50% de las pruebas fueron incluidas en el análisis. Las medidas del comportamiento generadas para el análisis estadístico fueron calculadas según las siguientes fórmulas. La exactitud de las respuestas en los eventos señalizados o porcentaje de aciertos (%A) se calculó a partir del número de aciertos (A) y de fallos (F) con la siguiente fórmula: $\%A=100*A/(A+F)$. De la misma manera, la exactitud en los eventos no señalizados o porcentaje de rechazos correctos (%RC) fue calculado a partir del número de rechazos correctos en una sesión (RC) y del número de falsas alarmas (FA) gracias a la siguiente fórmula: $\%RC=100*RC/(RC+FA)$. Además se calcularon los errores de omisión (%O) en los dos tipos de pruebas con la siguiente fórmula: $\%O=100*O/T$ donde O representa el número de omisiones y T el total de pruebas en cada sesión. El grado de preferencia por una de las palancas fue calculado con la siguiente fórmula: $P=(A+FA)/R$, donde P es la medida de preferencia y R es el número total de respuestas emitidas. Por último, se calculó el índice de vigilancia (IV) empleado por McGaughy y Sarter (1995) con la siguiente fórmula: $IV=(a-f)/[2*(a+f)-(a+f)^2]$, donde $a=A/(A+F)$, y $f=FA/(FA+RC)$. Puesto que nos interesaba estudiar el efecto de las diferentes duraciones de la señal luminosa (25, 50 y 500ms) y de la presentación de una distracción, se calcularon las diferentes medidas para cada una de las tres duraciones por separado y para cada uno de los bloques en los que se dividía la sesión.

L. Medidas electrofisiológicas

Únicamente las neuronas que presentaban más de 200 descargas durante las sesiones en las que se cumplía el criterio de desempeño fueron usadas para el análisis electrofisiológico. Se calculó la actividad promedio para cada neurona, para la sesión completa y para cada uno de los bloques en los que se dividía dicha sesión. El efecto modulador que la distracción ejercía en la actividad de las neuronas de la CPFm se

determinó por medio de la comparación de la actividad promedio durante los bloques 1 y 3 con la actividad promedio en el bloque 2. Las neuronas que exhibían un cambio en actividad cuyo valor absoluto excedía el 15% en el bloque 2 y que era revertido por un mínimo del 10% en el bloque 3 fueron denominadas neuronas con aumento (o decremento, según el sentido del cambio) de actividad inducida por la distracción. Las neuronas cuya actividad media cambiaba un 15% durante el bloque 2 pero no revertía un mínimo de 10% en el bloque 3 fueron llamadas neuronas con aumento (o decremento) de actividad asociado a la tarea. Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de neuronas que estaban incluidas en estas dos categorías, así como el porcentaje de neuronas que no presentaban cambios en su actividad. Por último, se calculó también la magnitud de los cambios en la actividad de las neuronas asociados a la presentación de una distracción, así como la magnitud en los que estos cambios fueron revertidos.

Se construyeron histogramas de tiempo centrados en eventos (HTCE) para cada neurona, con el objeto de determinar la existencia de correlaciones entre la actividad de las neuronas de la CPFm y cada uno de los sucesos relevantes para el comportamiento. Los HTCE fueron construidos alrededor de los siguientes sucesos: la presentación de la señal luminosa (para cada duración por separado y en conjunto), el tono, los aciertos, los fallos, los rechazos correctos, las falsas alarmas, el consumo de la recompensa, las respuestas durante el ISP en ambas palancas de respuesta, y para el encendido y apagado de la luz principal durante el bloque 2. Para construir los HTCE, se sumó la actividad de cada neurona en intervalos de 20 ms a lo largo de una ventana de 4 segundos, centrada en el suceso de interés, para todos los casos en que se dio ese suceso a lo largo de la sesión.

M. Análisis estadístico

1. Datos del comportamiento

Se hicieron varios análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas usando el grupo (control, 0, 20 y 40 μg de CDP) y el bloque como factores dentro de grupos, para las diferentes medidas independientes (exactitud en los eventos no señalizados, errores de omisión, preferencia, exactitud en general, e índice de vigilancia). Además se hizo un ANOVA para medidas repetidas que incluía también la duración de la señal

como un factor dentro de grupos para las medidas independientes de exactitud en eventos señalizados, IV, y errores de omisión.

2. Datos electrofisiológicos

Puesto que se registró la actividad de diferentes neuronas en cada uno de los tratamientos, se estudió la existencia de cambios en la actividad de las neuronas con un ANOVA de medidas repetidas usando el grupo como factor entre grupos, y el bloque como factor dentro de grupos. El efecto de las microinyecciones de drogas en el número de neuronas cuya actividad estaba asociada a algún suceso de la tarea, y en el número de neuronas que tenían cambios en actividad asociados a la presentación de una distracción fue examinado usando el análisis Chi cuadrado.

III. RESULTADOS

A. Histología

Para la elaboración del presente informe, únicamente se incluyó la verificación de la localización final de los electrodos y las cánulas guía para cinco sujetos. Los otros cuatro animales han sido incluidos en un estudio sobre el efecto de microinyecciones de CDP en los núcleos basales, después de realizar una lesión selectiva y localizada de las neuronas colinérgicas en la CPFm. El análisis de las secciones de los cerebros de los animales empleados en este estudio reveló que los electrodos se encontraban en el sector pre-límbico de la CPFm, tal como se puede ver en la figura 5. Las puntas de las cánulas guía para la microinyección de drogas en los distintos animales empleados en el estudio, se encontraban en el globo pálido, el núcleo basal de Meynert, y la sustancia innominada. La situación de las puntas de las cánulas guía para la microinyección de droga está representada en la figura 6.

B. Análisis del comportamiento

1. Efecto de microinyecciones de solución salina

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el desempeño de las ratas en la tarea en las condiciones control y de microinyección de solución salina. En efecto, se encontró que la microinyección bilateral de solución salina en los núcleos basales no afectó el índice de vigilancia (IV) [$F(1,7)=1.533$, $p>0.05$] al compararlo con el IV en las sesiones control. Además, las interacciones entre la condición (microinyección de solución salina), y la duración de la señal y el bloque no fueron estadísticamente significativas [$F(2,14)=0.092$, $p>0.05$ y $F(2,14)=0.052$, $p>0.05$, respectivamente]. Así mismo, se encontró que las microinyecciones de solución salina no afectaron ni la exactitud ni el porcentaje de omisiones en ambos tipos de eventos, y que, además, no indujeron la preferencia por una de las palancas de respuesta (para todas estas comparaciones $p>0.05$). Por último, se encontró que la microinyección de solución salina no interaccionó con el bloque ni con la duración de la señal (para todas las medidas $p>0.05$). Por lo tanto, se tomó como desempeño base, para realizar todas las

comparaciones, el desempeño de los animales en las condiciones de microinyección control y de solución salina combinadas.

Al igual que en experimentos anteriores en los que se empleó esta tarea (Gill *et al*, 2000; Holley *et al*, 1995), el desempeño base se caracterizó por la dependencia del índice de vigilancia y de la exactitud en eventos señalizados, de la duración de la señal [F(2,14)=62.310, $p < 0.001$ y F(2,14)=56.467, $p < 0.001$, respectivamente]. Esta dependencia se tradujo en una mayor exactitud para ambas medidas al aumentar la duración de la señal, tal como puede verse en las figuras 7 y 8. Además, la presentación de una distracción durante el segundo bloque de pruebas provocó la disminución de la exactitud en los eventos señalizados y no señalizados, así como la disminución del índice de vigilancia (para todas las medidas, $p < 0.05$). Estos resultados están resumidos en las figuras 9 y 10, respectivamente.

2. Efecto de microinyecciones de CDP (clordiacepóxido)

El desempeño de las ratas después de recibir microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales se caracterizó también por la dependencia del índice de vigilancia y de la exactitud en eventos señalizados, de la duración de la señal ($p < 0.001$), tal como se ilustra en las figuras 7 y 8. También se observó un trastorno generalizado en el desempeño durante el bloque 2 ($p < 0.05$). Sin embargo, las microinyecciones de CDP no aumentaron el efecto nocivo de la distracción en el desempeño durante el bloque 2. En efecto, tal como puede observarse en las figuras 9 y 10, durante el bloque 2 se observó una disminución en la exactitud en ambos tipos de eventos, así como en el índice de vigilancia. No obstante, dicha disminución fue similar en todas las condiciones. En la figura 10 puede verse que la disminución en el índice de vigilancia en el bloque 2 después del tratamiento con la dosis alta de CDP es mayor que en las otras condiciones, pero que esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

El análisis de las figuras 8, 11 y 12 revelan que el trastorno global que se observó durante la presentación de la distracción no tuvo ningún efecto en la exactitud en eventos no señalizados, ni en la preferencia, ni en el porcentaje de omisiones en ambos tipos de eventos, respectivamente, al compararlos con el desempeño base (para todas las medidas, $p > 0.05$). De la misma manera, el estudio de la figura 13 revela que el índice de vigilancia

y el porcentaje de aciertos tampoco fueron afectados de forma significativa por las microinyecciones de CDP. No obstante, existe una tendencia clara que indica que el CDP produce deficiencias en el desempeño en los eventos señalizados [$F(3,18)=2.755$, $p=0.072$]. Esta tendencia es más clara cuando se analiza por separado el porcentaje de aciertos totales en aciertos para cada una de las tres diferentes duraciones de la señal luminosa [efecto de la droga $F(3,18)=3.075$, $p=0.054$]. La comparación del número de aciertos en las diferentes condiciones sugiere que la dosis alta de CDP produce la disminución de la exactitud en los eventos señalizados, mientras que la dosis baja no tiene ningún efecto. Finalmente, los resultados proporcionan evidencia de que las microinyecciones de CDP no interaccionan con la duración de la señal o el bloque [$F(6,36)=0.578$, $p=0.745$ y $F(6,36)=0.476$, $p=0.822$].

C. Análisis electrofisiológico

1. Características de las neuronas de la CPFm (corteza prefrontal medial)

A partir de la actividad múltiple registrada por cada electrodo doble, se aislaron entre dos y ocho neuronas en cada sesión. En total, se estudió la actividad de 163 neuronas en la condición control. En esta condición, la actividad promedio de las neuronas de la CPFm fue de 0.81 ± 0.07 descargas por segundo durante el período previo al inicio de la tarea. El promedio de la actividad de las distintas neuronas registradas varió entre 0.00 y 4.58 descargas por segundo. La actividad promedio no varió significativamente al inicio del período de tarea (en el bloque 1), ya que se encontró que durante ese bloque las neuronas tuvieron una actividad promedio de 0.79 ± 0.08 descargas por segundo, con un rango que variaba entre 0.01 y 7.81 descargas por segundo. La mayoría de las neuronas registradas tenía potenciales de acción con la característica forma bifásica, aunque se observaron algunas neuronas con potenciales de acción de forma trifásica. La duración de los potenciales de acción variaba entre 0.92 y 1.3 milisegundos.

2. Las microinyecciones de CDP aumentan la actividad durante el desempeño base

El análisis de la actividad promedio bajo las distintas condiciones, reveló que las microinyecciones de solución salina no alteraron de manera significativa la velocidad de

descarga durante el período previo al inicio de la tarea [$F(1,309)=0.006$, $p>0.05$], ni durante el primer bloque [$F(1,309)=0.420$, $p>0.05$], tal como puede verse en el cuadro 1. La comparación de la velocidad de descarga promedio en cada uno de los bloques y en la sesión completa, reveló que el tratamiento con solución salina no produjo ningún efecto (para todas las medidas, $p>0.05$). Por lo tanto, la información sobre la velocidad de descarga en estas dos condiciones fue combinada y considerada la actividad base de las neuronas. El efecto de las microinyecciones de CDP en el diencefalo fue estudiado por comparación con la actividad base.

Se encontró que ambas dosis de CDP produjeron un incremento en el promedio de velocidad de descarga durante el nivel basal de desempeño (bloque 1), tal como se puede observar en el Cuadro 1 [$F(2, 620)=3.411$, $p<0.05$]. Sin embargo, las microinyecciones de CDP no afectaron de manera significativa la actividad promedio de las neuronas durante el período previo al inicio de la tarea. Por último, se observó que las microinyecciones de CDP produjeron un aumento considerable, aunque no significativo, de la actividad neuronal durante la sesión completa [$F(2,620)=2.454$, $p=0.087$].

3. Cambios en la actividad neuronal asociados a la presentación de una distracción

Se encontró que la presentación de una distracción durante el bloque 2, alteraba la velocidad de descarga de algunas de las neuronas de la CPFm. En la figura 14 se presentan ejemplos representativos de este fenómeno. En el cuadro 2 se presenta un resumen de los cambios observados en la actividad neuronal asociados a la presentación de una distracción. Aproximadamente el 36% de las neuronas registradas bajo el tratamiento control presentaron cambios en su actividad que estaban asociados a la introducción de la distracción. Dos tercios de las neuronas en esta categoría disminuyeron su actividad durante el bloque 2, mientras que únicamente un tercio aumentó la velocidad de descarga. La comparación por Chi cuadrado de la proporción de neuronas cuya actividad se reducía durante el bloque 2 reveló que existía una diferencia significativa entre el control y el tratamiento con solución salina ($\chi^2=4.32$, $p<0.05$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la proporción de neuronas cuya actividad aumentaba durante el bloque 2 ($p>0.05$).

Puesto que el tratamiento con solución salina tuvo efectos significativos en la actividad neuronal en la CPFm, se emplearon las medidas tomadas después del tratamiento con solución salina como actividad base para la comparación con los tratamientos con CDP. Se encontró que las microinyecciones de CDP no afectaron significativamente la proporción de neuronas cuya actividad cambiaba durante el bloque 2 (para todas las medidas, $p > 0.05$).

El 30% de las neuronas registradas después del tratamiento control exhibieron cambios en actividad que estaban asociados a la realización de la tarea. Estas neuronas se caracterizaban por cambiar su actividad en el bloque 2 en relación con el bloque 1, sin revertir esta tendencia durante el bloque 3. La proporción de neuronas que presentaron una disminución de la actividad asociada a la realización de la tarea después de los tratamientos con solución salina y con CDP, era significativamente diferente de la proporción observada en la condición control (para todas las medidas, $p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar los efectos de microinyecciones de solución salina con los efectos de las microinyecciones de CDP ($p > 0.05$). Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la proporción de neuronas cuya actividad aumentaba durante la realización de la tarea (para todas las medidas, $p > 0.05$).

4. Correlación de actividad neuronal de la CPFm con las medidas de comportamiento

Al igual que en informes previos publicados por Gill *et al* (2000), se encontró que la actividad de las neuronas en la CPFm presentaba cambios que correlacionaban con sucesos críticos de la tarea. En la figura 15 se presentan ejemplos ilustrativos de dichas correlaciones entre actividad neuronal y eventos. El patrón de actividad de la mayoría de las neuronas estaba correlacionado con las respuestas y con la anticipación y el consumo de la recompensa. Adicionalmente, al menos el 10% de las neuronas registradas en todas las condiciones presentaban un patrón de actividad que correlacionaba con la respuesta sensorial. Por lo tanto, las neuronas de la CPFm fueron clasificadas como neuronas que presentaban correlación con la respuesta o con la recompensa, o que tenían correlación sensorial. Adicionalmente, las neuronas que presentaban correlación con la respuesta y con la recompensa fueron divididas en subgrupos según el sentido del cambio (inhibición

o excitación) y el momento en el que ocurría (anticipación o ejecución de respuesta, anticipación o consumo de la recompensa).

La comparación de la proporción de neuronas que exhibían cada tipo de correlación en cada una de las cuatro condiciones reveló que el procedimiento de microinyección tuvo un efecto en el patrón de actividad de las neuronas en la CPFm. En efecto, se observó que la proporción de algunos tipos de correlaciones difería en las condiciones control y de microinyección de solución salina ($p > 0.05$). No obstante, este efecto no es generalizado para todos los tipos de correlación, ya que se observa únicamente en la proporción de neuronas cuya actividad está correlacionada con la respuesta, tal como se desprende del análisis de los resultados presentados en el cuadro 3. Por lo tanto, se utilizó el tratamiento con solución salina como medidas base para determinar el efecto de las microinyecciones de CDP.

El análisis Chi cuadrado reveló que únicamente la dosis alta de CDP afectó significativamente la proporción de neuronas que exhibía cada tipo de correlación. Es interesante notar que las microinyecciones de la dosis alta de CDP no afectaron de manera significativa el número de neuronas que presentaban correlación con la respuesta ($\chi^2 = 0.007$, $p > 0.05$). Sin embargo, este tratamiento aumentó de manera significativa y selectiva la proporción de neuronas que no exhibían ningún tipo de correlación ($\chi^2 = 6.346$, $p < 0.05$). Al mismo tiempo, este tratamiento redujo el número total de neuronas que presentaban correlación con la recompensa ($\chi^2 = 3.972$, $p < 0.05$). Esto último fue el resultado de una disminución en el número de neuronas que presentaban una disminución de la actividad que correlacionaba con la anticipación y el consumo de la recompensa ($p < 0.05$). Adicionalmente, la especificidad de las neuronas que presentaban correlación entre su actividad y la recompensa fue reducida significativamente por la microinyección de la dosis alta de CDP ($\chi^2 = 6.821$, $p < 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

Al igual que en experimentos anteriores en los que se empleó la misma tarea (Gill *et al.*, 2000; Holley *et al.*, 1995; y Miner *et al.*, 1997), el desempeño de las ratas se caracterizó por la dependencia de dos medidas importantes, de la duración de la señal luminosa. Estas dos medidas son la exactitud de las respuestas en los eventos señalizados, y el índice de vigilancia. Así mismo, el desempeño se caracterizó por la aparición de deficiencias en la exactitud, durante la presentación de una distracción. Tal como se esperaba, la microinyección de solución salina (el vehículo empleado para las soluciones de droga) no afectó ningún aspecto del comportamiento. De la misma manera, las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales no tuvieron ningún efecto en la exactitud de las respuestas en los eventos no señalizados, ni en el porcentaje de omisiones, ni en la preferencia por alguna de las palancas de respuesta.

Sin embargo se encontró que, contrariamente a lo expuesto por Holley y colaboradores (1995), las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales no produjeron deficiencias significativas en la exactitud en los eventos señalizados. No obstante, se observó una tendencia muy clara en ese sentido (reducción de la exactitud en eventos señalizados) después de las microinyecciones de la dosis de 40 μ g de CDP. La falta de significación estadística puede ser el resultado del pequeño tamaño de la muestra (n=9) empleada para este estudio. El tamaño de la muestra es un factor determinante, especialmente si se toma en cuenta que uno de los sujetos empleados en el estudio fue excluido del análisis debido a que no respondió más del 50% de las veces después del tratamiento con la dosis alta de CDP. Una posible explicación para la ausencia de efecto de la dosis baja de CDP, en contraposición con los resultados publicados por Holley y colaboradores (1995), es el hecho de que los animales empleados en el presente estudio trabajaban a un nivel más alto de exactitud en condiciones normales. Por lo tanto, es posible que sea necesario un desafío más fuerte al sistema de los núcleos basales para poder observar efectos en el comportamiento.

Contrariamente a nuestras predicciones, no se observó ninguna tendencia o interacción significativa entre la microinyección de droga y la duración de la señal o el bloque. Los resultados publicados por Holley y colaboradores en 1995 indican que las

microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales disminuyen de forma muy acentuada el porcentaje de aciertos en eventos para los cuales se emplea una señal muy corta (25 y 50 milisegundos) durante el bloque 1. Sin embargo, en los dos últimos bloques, la droga parece tener un mayor efecto en los eventos para los cuales se emplea una señal de larga duración (500 milisegundos).

La explicación propuesta para el efecto aparentemente contradictorio que se observó con el experimento de Holley y colaboradores (1995) es la existencia de un efecto "suelo". Para los animales empleados en ese estudio el porcentaje de aciertos para señales cortas era normalmente muy bajo. El efecto de las microinyecciones de CDP en el bloque 1 fue la reducción de la habilidad de las ratas para acertar en los eventos señalizados, especialmente en los que la duración de la señal es muy corta. Sin embargo, en los siguientes bloques el CDP no podía producir una deficiencia mayor en los eventos en los que la señal era corta, puesto que las ratas estaban trabajando al nivel más bajo posible de exactitud. Los resultados obtenidos en este experimento confirman esta hipótesis, puesto que cuando las ratas parten de un nivel base de aciertos que es mayor, las microinyecciones de CDP provocan una disminución en el porcentaje de aciertos que afecta por igual a todos los tipos de señal. Además, esta disminución se mantiene a lo largo de la sesión.

Adicionalmente se encontró que, contrariamente a lo predicho, las microinyecciones de CDP no acentuaron las deficiencias provocadas por la presentación de una distracción. La falta de interacción entre la microinyección de droga y el bloque, determinada por comparación entre el comportamiento en las situaciones sin distracción y con distracción, sugiere que el aumento en la actividad del sistema colinérgico producido por un aumento en la necesidad de poner atención (según lo publicado por Himmelheber *et al.*, 2000) puede superar la potenciación del efecto inhibitor de los niveles normales de GABA por el CDP.

La velocidad promedio de emisión de potenciales de acción (o actividad promedio) de las neuronas estudiadas en este experimento no cambió durante el período previo al inicio de la tarea como resultado de la microinyección de CDP dentro de los núcleos basales. Sin embargo, después de los tratamientos con ambas dosis de CDP se observó un aumento significativo en la actividad promedio al inicio de la tarea, durante el bloque 1.

Esto sugiere que durante la realización de la tarea de atención visual sostenida, existe un incremento en la actividad basal de GABA en los núcleos basales. Los mecanismos por los cuales el sistema GABAérgico de los núcleos basales está activamente comprometido en el desempeño en esta tarea, y su importancia en la comprensión de los sistemas cerebrales que controlan el proceso de atención, todavía deben ser descubiertos. Es interesante notar la existencia de una tendencia hacia el aumento en la actividad promedio durante la sesión completa, después de tratamientos con CDP. Esto sugiere que los efectos del CDP perduran en toda la sesión. Esto concuerda con lo que se puede deducir del análisis del comportamiento, ya que las deficiencias en el comportamiento no desaparecen durante el último bloque de la tarea.

Experimentos anteriores revelaron que las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales disminuyen la liberación de acetilcolina en la corteza cerebral (Moore *et al.*, 1993 y 1995). Por otra parte, se ha demostrado que la pérdida de impulsos colinérgicos en el área de registro se traduce en la reducción de la velocidad promedio de descarga (Gill *et al.*, 2000). Con base en los resultados anteriores, se predijo que las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales tendrían un efecto en la actividad de las neuronas piramidales similar al observado por Gill y colaboradores (2000). Sin embargo, al hacer esta predicción no se tomó en cuenta la posibilidad de que la acetilcolina tenga un efecto dual en la velocidad de descarga de las neuronas piramidales de la corteza cerebral.

En efecto, existen informes que indican que la acetilcolina puede inducir potenciales post sinápticos inhibitorios en las células piramidales de forma indirecta, por medio de sus efectos en las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral (McCormick y Prince, 1986). La eliminación del estímulo colinérgico tendrá como efecto la desinhibición de las neuronas piramidales, al estar menos excitadas las interneuronas GABAérgicas por la falta de acetilcolina. Por otra parte, se ha demostrado que la acetilcolina puede desencadenar la despolarización o hiperpolarización de distintas neuronas en preparaciones de secciones de la corteza cerebral, dependiendo del tipo de receptores presentes en dichas neuronas (Metherate y Ashe, 1995; Xiang *et al.*, 1998). Por lo tanto, es de esperar que una reducción de la acetilcolina en la corteza tenga un

efecto más complejo que el predicho inicialmente, es decir, que la reducción de la actividad de las neuronas piramidales.

Por otro lado, la complejidad de la organización de los núcleos basales y de los receptores de GABA, dificulta la predicción del efecto que las microinyecciones de CDP pueden tener sobre la actividad de las neuronas de la corteza cerebral. En efecto, ha sido ampliamente documentado que todas las regiones de los núcleos basales contienen diferentes tipos de células: células colinérgicas, pero también células no colinérgicas, de las cuales la mayoría son neuronas GABAérgicas (Zaborszky *et al.*, 1999). Además, diversos estudios anatómicos en varias especies, han revelado que las neuronas de proyección de los núcleos basales, incluyen tanto neuronas colinérgicas como GABAérgicas y otras neuronas no colinérgicas. Todos estos tipos de neuronas comparten muchas similitudes desde el punto de vista estructural y de organización, que incluyen: su tamaño, la formación de sinapsis simétricas, el arreglo difuso del árbol terminal, y su amplia distribución en las diferentes láminas que forman la corteza cerebral (Gritti *et al.*, 1997; Saper, 1984; Fisher *et al.*, 1988).

Los resultados de varios estudios indican que las neuronas de proyección GABAérgicas de los núcleos basales terminan de forma predominante en interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral (Freund y Gulyas, 1991; Martínez-Guijarro y Freund, 1992; Freund y Meskeinate, 1992). Se sabe que cada interneurona GABAérgica hace contacto con cientos de células piramidales. Por consiguiente, la activación del circuito GABAérgico que conecta el diencefalo con la corteza cerebral, se traduce probablemente en la desinhibición de las neuronas piramidales (Freund y Meskeinate, 1992).

No obstante, no todas las neuronas GABAérgicas de los núcleos basales son neuronas de proyección. Además, es importante notar que no se conoce cuál es la proporción de interneuronas y de neuronas de proyección en la población de neuronas GABAérgicas de los núcleos basales (Zaborszky *et al.*, 1999). Por último, debe recalarse que no se conoce de qué manera las neuronas de proyección de los núcleos basales (tanto colinérgicas como GABAérgicas) son afectadas por las interneuronas GABAérgicas dentro de los núcleos basales (Zaborszky y Duque, 2000).

Otro aspecto de la organización de los núcleos basales que dificulta la predicción de los cambios en la actividad de la corteza cerebral debido a las microinyecciones de CDP, es la distribución diferencial y las diferencias en sensibilidad de los distintos subtipos de receptores GABA_A en las diferentes poblaciones neuronales del diencefalo. En efecto, en experimentos de inmunohistoquímica y de expresión de ARN mensajero en varias especies, se determinó que diferentes tipos celulares expresan diferentes subtipos de receptores GABA_A (Gao *et al.*, 1995; Härtig *et al.*, 1995; Henderson, 1995). En efecto, se encontró que las neuronas colinérgicas expresaban receptores que contenían la combinación de subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ (Gao *et al.*, 1995), mientras que las neuronas GABAérgicas expresaban receptores con las combinaciones $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ y $\alpha_1\alpha_3\beta_2\gamma_2$ (Gao *et al.*, 1995; Härtig *et al.*, 1995; Henderson, 1995).

Los receptores GABA_A con diferente composición tienen diferente sensibilidad tanto a GABA como a las benzodiazepinas. Por ejemplo, los receptores recombinantes con la combinación $\alpha_3\beta_x\gamma_2$ se caracterizan por tener baja sensibilidad a GABA (Bakus *et al.*, 1993), mientras que los receptores que contienen la subunidad α_1 tienen alta sensibilidad a GABA (Angelotti y Macdonald, 1993). Por consiguiente, las microinyecciones de CDP dentro del diencefalo no potencian únicamente el efecto de GABA en las neuronas colinérgicas, sino que también afectan la actividad de las neuronas GABAérgicas del diencefalo. Por otra parte, los receptores GABA_A que se encuentran en las células GABAérgicas son más sensibles a GABA que los receptores de las neuronas colinérgicas. Esto sugiere que los efectos de CDP en la realización de la tarea y en la actividad de la CPFm son modulados por cambios en la actividad del sistema GABAérgico de los núcleos basales.

Tal como había sido descrito por Gill y colaboradores (2000), se encontró que la presentación de una distracción induce cambios en la velocidad de descarga de algunas de las neuronas de la CPFm. No obstante, las microinyecciones de CDP no tuvieron ningún efecto en el porcentaje de neuronas cuya actividad era modulada por la distracción. Este resultado contrasta con el publicado por Gill y colaboradores (2000), quienes encontraron que la pérdida unilateral del impulso colinérgico en el área de registro reducía el porcentaje de neuronas que presentaban un aumento en actividad asociado a la distracción.

Adicionalmente, en este experimento se encontró que las microinyecciones de CDP redujeron el número de neuronas que presentaban correlación con la recompensa, en especial correlaciones inhibitorias. Al mismo tiempo, se observó un aumento en el número de neuronas que no presentaban correlación con sucesos de la tarea. En contraposición, el estudio de Gill y colaboradores (2000) reveló que la pérdida del impulso colinérgico reducía el porcentaje de todos los tipos de correlaciones, aumentando el número total de neuronas que no presentaban correlación con eventos del comportamiento.

Las diferencias entre el efecto de las microinyecciones de CDP y el efecto de la pérdida del impulso colinérgico proporciona evidencia adicional en favor de la hipótesis de que el mecanismo por el cual el CDP afecta el desempeño en la tarea es complejo, y no se limita a la reducción de los niveles de acetilcolina en la corteza cerebral. Sin embargo, es difícil comparar las diferencias observadas en los efectos que estos dos tratamientos tienen en la actividad neuronal asociada a la realización de la tarea, puesto que tienen diferente efecto en el comportamiento.

En el presente estudio se encontró que el procedimiento de microinyección afectaba el patrón de actividad de las neuronas de la CPFm sin afectar el comportamiento (ver por ejemplo el efecto de las microinyecciones de solución salina en el porcentaje de neuronas que presentan una reducción de la velocidad de descarga asociada a la distracción, y el porcentaje de neuronas que presentan correlación con diferentes aspectos del comportamiento). Esta observación sugiere que pequeños cambios en la actividad neuronal en la CPFm, en particular en lo que respecta a las correlaciones con distintos aspectos de la realización de una tarea de atención, no son suficientes para afectar el desempeño de las ratas en dicha tarea. Esto es consistente con los resultados de Gill y colaboradores (2000), que indican que la pérdida local del impulso colinérgico afecta la actividad neuronal de la CPFm sin afectar el desempeño en la tarea.

Por último, es interesante observar que los cambios en el porcentaje de neuronas que presentan correlación con la respuesta después de las microinyecciones de solución salina y CDP no son suficientes para afectar el desempeño de manera significativa. No obstante, las microinyecciones de altas dosis de CDP tienden a reducir el porcentaje de aciertos. Los resultados de este experimento sugieren que, para observar una reducción

en el porcentaje de aciertos, es necesario un cambio en el número de neuronas cuya actividad presente correlación con la recompensa. Esto concuerda con varios informes que sugieren que la CPFm está más relacionada con la anticipación y con la obtención de una recompensa (Chang *et al.*, 1997; y Gill *et al.*, 2000). Los cambios observados en la realización de la tarea de atención visual sostenida al alterar el funcionamiento de la CPFm pueden ser el resultado de la pérdida de la habilidad de las neuronas para responder a la anticipación y consumo de una recompensa.

V. CONCLUSIONES

Las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales producen deficiencias no significativas en el porcentaje de aciertos en una tarea de atención visual. No obstante, la ausencia de significación estadística puede ser el resultado del pequeño tamaño de la muestra empleada en este experimento. Se encontró además, que las microinyecciones de CDP no afectan el porcentaje de rechazos correctos, ni de omisiones, y que no inducen la preferencia por una de las palancas de respuesta. Estos resultados indican que, tal como indicaban los resultados de Holley y colaboradores (1995), el CDP reduce la habilidad de las ratas para detectar señales que ocurren de forma impredecible y sugieren que el CDP produce deficiencias de atención.

Sin embargo, se encontraron algunas diferencias en cuanto al efecto del CDP en el desempeño en la tarea. En primer lugar, únicamente la dosis alta produjo deficiencias en el porcentaje de aciertos. Además, a diferencia de los resultados de Holley y colaboradores (1995), se encontró que las microinyecciones de CDP no interactúan con la duración de la señal o con el bloque. En este experimento se entrenó a los animales para trabajar a un nivel de exactitud mayor que en el experimento de Holley y colaboradores (1995). Esto era necesario para hacer posible la identificación de patrones de actividad de las neuronas de la CPFm que presentan correlación con sucesos de la tarea. Por lo tanto es posible que, contrariamente a los resultados de Holley *et al.* (1995), la dosis baja de CDP no tenga efecto en el porcentaje de aciertos pues se necesita un estímulo más fuerte para producir deficiencias en el desempeño de las ratas en la tarea.

Por otra parte, ya que los sujetos empleados en este experimento tenían un mayor porcentaje de aciertos en eventos señalizados con señales de corta duración, el efecto “suelo” observado por Holley y colaboradores (1995) no puede confundir los resultados de este experimento. En efecto, se encontró que las microinyecciones de CDP en el diencefalo reducen el porcentaje de aciertos a los tres tipos de señal en la misma medida, y que el efecto es similar en los tres bloques de la tarea.

Por último, hay que resaltar la importancia de la falta de interacción entre la droga y el bloque, especialmente si se considera que durante el bloque 2 se aumentó la dificultad de la tarea mediante la introducción de una distracción. Este resultado es inesperado, puesto

que nuestra hipótesis proponía que el CDP afectaría la realización de la tarea por medio de la reducción de los niveles de acetilcolina en la corteza (de acuerdo con los resultados de Moore *et al.*, 1993 y 1995). Se predijo que las microinyecciones de CDP en los núcleos basales impedirían el aumento de los niveles de acetilcolina en la corteza cerebral que se observan en condiciones que requieren un alto nivel de atención (según los resultados de Himmelheber *et al.*, 2000; y Sarter *et al.*, 1996). Además, se ha propuesto que el aumento en los niveles corticales de acetilcolina son necesarios para mantener el nivel de exactitud en los eventos señalizados en condiciones de gran dificultad (Gill *et al.*, 2000). El hecho de que no se observara interacción entre la droga y el bloque sugiere que el aumento en la actividad del sistema colinérgico producido por un incremento en la dificultad de la tarea, sobrepasa la potenciación por el CDP del efecto inhibitorio de los niveles normales de GABA.

Se encontró que las microinyecciones de CDP dentro del diencefalo afectan la actividad de las neuronas de la CPFm. Se observó una tendencia hacia el aumento de la velocidad de descarga promedio durante el desempeño base. Esta observación sugiere que hay un incremento en los niveles basales de GABA dentro de los núcleos basales durante la realización de la tarea. Además, esta tendencia se mantiene a lo largo de la sesión, sugiriendo que el efecto de la droga perdura durante la sesión completa.

El cambio observado en la velocidad de descarga es opuesto al predicho a partir de los efectos que la pérdida del impulso colinérgico tiene en las neuronas de la CPFm según el informe de Gill y colaboradores (2000). Además, las microinyecciones de CDP no afectaron la proporción de neuronas que presentaban cambios en actividad asociados a la introducción de una distracción, mientras que la pérdida de acetilcolina en el área de registro la redujo (Gill *et al.*, 2000). De la misma manera, la pérdida de acetilcolina redujo el porcentaje de neuronas cuya actividad presentaba correlación con todos los sucesos importantes de la tarea (Gill *et al.*, 2000). El CDP, por el contrario, únicamente afectó el porcentaje de neuronas que presentaban una disminución en actividad que estaba correlacionada con la recompensa. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual las microinyecciones de CDP dentro de los núcleos basales producen deficiencias en el desempeño no se limita a la disminución de los niveles corticales de acetilcolina. En efecto, los núcleos basales contienen neuronas colinérgicas y no

colinérgicas (de las cuales la mayoría son GABAérgicas). Además, se han encontrado receptores GABA_A con diferente composición en ambos tipos celulares en el diencefalo (Gao *et al.*, 1995; Härtig *et al.*, 1995; Henderson, 1995). Se sabe que los distintos subtipos de receptores GABA_A tienen diferente sensibilidad a GABA y a las benzodiazepinas, y que los receptores que se encuentran en las neuronas colinérgicas poseen menor sensibilidad (Angelotti y Macdonald, 1993; Bakus *et al.*, 1993).

Por último, se sabe que las neuronas GABAérgicas del diencefalo incluyen tanto interneuronas (Zaborszky *et al.*, 1999) como neuronas de proyección que forman sinapsis principalmente con interneuronas de la corteza cerebral (Freund y Meskeinate, 1992; Gritti *et al.*, 1997). Es importante notar que se desconoce cuál es el porcentaje de las neuronas GABAérgicas que son interneuronas, y cuál es su efecto en las vías colinérgicas y GABAérgicas del diencefalo (Zaborszky *et al.*, 1999). Sin embargo, las diferencias en los efectos que las microinyecciones de GABA y la pérdida de los impulsos colinérgicos tienen en la actividad neuronal de la CPFm, sugieren que las deficiencias en el desempeño en la tarea inducidas por el CDP son el resultado de alteraciones en la actividad de ambos sistemas.

Es necesario llevar a cabo nuevos experimentos con el objeto de diferenciar entre los efectos de las microinyecciones de CDP en las neuronas colinérgicas y GABAérgicas de los núcleos basales, así como para determinar en qué medida la acción del CDP en cada uno de esos dos sistemas contribuye a producir deficiencias en el desempeño en una tarea de atención. El empleo de agonistas de benzodiazepinas más selectivos, que se unan específicamente a receptores GABA_A con una composición determinada, permitiría determinar de manera más precisa el mecanismo por el cual la activación de la transmisión GABAérgica dentro del diencefalo afecta la realización de una tarea de atención. En particular, permitiría determinar cuál es la contribución individual de los sistemas colinérgico y GABAérgico en la inducción de deficiencias en el desempeño. Adicionalmente, el estudio del efecto de microinyecciones de CDP en animales que han sufrido una lesión restringida y selectiva de las neuronas colinérgicas en el área de registro, proporcionará evidencia más firme sobre la naturaleza del sistema neurotransmisor que es afectado por el CDP.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, R. 1991. "Cell excitation enhances muscarinic cholinergic responses in rat association cortex". *Brain Research* [Holanda]. 548: 81-93.
- Angelotti, T. y Macdonald, R.L. 1993. "Assembly of GABA_A receptor subunits: $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_1\beta_1\gamma_{2,3}$ subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 13: 1429-1440.
- Aston-Jones G.; Shaver, R.; y Dinan, T.G. 1985. "Nucleus Basalis neurons exhibit axonal branching with decreased impulse conduction velocity in rat cerebrocortex". *Brain Research* [Holanda]. 325: 271-285.
- Bakus, K.H. *et al.* 1993. "Stoichiometry of a recombinant GABA_A-receptor deduced from mutation-induced rectification". *NeuroReport* [Reino Unido]. 5: 285-288.
- Balleine, B.W. y Dickinson, A. 1998. "Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates". *Neuropharmacology* [Estados Unidos]. 37: 407-419.
- Bartus, R.T. *et al.* 1982. "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction". *Science* [Estados Unidos]. 217: 408-417.
- Baxter, M.G., *et al.* 1995. "Selective immunotoxic lesions of the basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats". *Behavioral Neuroscience* [Estados Unidos]. 109: 714-722.
- Bigl, V.; Woolf, N.J. y Butcher, L.L. 1982. "Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis". *Brain Research Bulletin* [Estados Unidos]. 8: 727-749.
- Brito, G.N.O. y Brito, L.S.O. 1990. "Septo-hippocampal system and the prefrontal sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat". *Behavioural Brain Research* [Holanda]. 36: 127-146.
- Brown, V.J.; Bowman, E.M., y Robbins, T.W. 1991. "Response-related deficits following unilateral lesions of the medial agranular cortex of the rat". *Behavioral Neuroscience* [Estados Unidos]. 105: 567-578.

- Buzsáki, G. *et al.* 1988. "Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 8: 4007-4026.
- Buzsáki, G. y Gage, F.H. 1991. "Role of the basal forebrain cholinergic system in cortical activation and arousal". En *Activation to acquisition: functional aspects of the basal forebrain cholinergic system*, de R.T. Richardson. Boston, Birkhäuser. págs. 115-133
- Chang, J.Y. *et al.* 1997. "Neuronal responses in prefrontal cortex and nucleus accumbens during heroin self-administration in freely moving rats". *Brain Research* [Holanda]. 754: 12-20.
- Chiba, A.A. *et al.* 1999. "Selective removal of cholinergic neurons in the basal forebrain alters cued target detection". *NeuroReport* [Reino Unido]. 10: 3119-3123.
- Corbetta, M. *et al.* 1991. "Selective and divided attention during visual discriminations of shape, colour and speed: functional anatomy by positron emission tomography". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 11: 2383-2402.
- Coyle, J.T.; Price, D.L. y DeLong, M.R. 1983. "Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation". *Science* [Estados Unidos]. 219: 1184-1190.
- Dekker, J.A.M.; Connor, D.J. y Thal, L.J. 1991. "The role of cholinergic projections from the nucleus basalis in memory". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* [Estados Unidos]. 15: 299-317.
- de Lacalle, S.; Iraizoz, I. y Ma Gonzalo, L. 1991. "Differential changes in cell size and number in topographic subdivisions of human basal nucleus in normal aging". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 43: 445-456.
- Détári, L.; Rasmusson, D.D. y Semba, K. 1999. "The role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex". *Progress in Neurobiology* [Estados Unidos]. 58: 249-277.
- Dunne, M.P. y Hartley, L.R. 1986. "Scopolamine and the control of attention in humans". *Psychopharmacology* [Alemania]. 89: 94-97.
- Dunnett, S.B. *et al.* 1987. "Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 20: 653-669.

- Dunnett, S.B.; Everitt, B.J. y Robbins, T.W. 1991. "The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions". *Trends in Neurosciences* [Holanda]. 14: 494-501.
- Etienne, P. *et al.* 1986. "Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimer's disease". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 19: 1279-1291.
- Fibiger, H.C. 1991. "Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence". *Trends in Neurosciences* [Holanda]. 14: 220-223.
- Fisher, R.S. *et al.* 1988. "GABAergic basal forebrain neurons project to the neocortex: the localization of glutamic acid decarboxylase and choline acetyl-transferase in feline corticopetal neurons". *Journal of Comparative Neurology* [Estados Unidos]. 272: 489-502.
- Freund, T.F. y Gulyás, A.I. 1991. "GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex". *Journal of Comparative Neurology* [Estados Unidos]. 314: 187-199.
- Freund, T.F. *et al.* 1983. "Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex". *Journal of comparative Neurology* [Estados Unidos]. 221: 263-278.
- Freund, T.F. y Meskeinate, V. 1992. "Gamma-aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 89: 738-742.
- Fuster, J.M. 1991. "The prefrontal cortex and its relation to behavior". *Progress in Brain Research* [Holanda]. 87: 201-211.
- Fuster, J.M. 1995. "Memory and planning. Two temporal perspectives of frontal lobe function. En *Epilepsy and the functional anatomy of the frontal lobe*, de H.H. Jasper; S. Riggio y P.S. Goldman-Rakic. New York, Raven Press. págs. 9-20.
- Gao, B.; Hornung, J.P. y Fritschy, J.M. 1995. "Identification of distinct GABAA-receptor subtypes in cholinergic and parvalbumin-positive neurons of the rat and marmoset medial septum-diagonal band complex". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 65: 101-117.

- Gill, T.M.; Sarter, M. y Givens, B. 2000. "Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic modulation". *The Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 20: 4745-4757.
- Granon, S. *et al.* 1994. "Working memory response selection and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions". *Behavioral Neuroscience* [Estados Unidos]. 108: 883-891.
- Gritti, I. *et al.* 1997. "GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat". *Journal of Comparative Neurology* [Estados Unidos]. 383: 163-177.
- Hars, B. *et al.* 1993. "Basal forebrain stimulation facilitates tone-evoked responses in the auditory cortex of awake rat". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 56: 61-74.
- Härtig, W. *et al.* 1995. "Regional and cellular expression sites of the α_1 subunit of GABA_A receptors in the rat basal forebrain: a cytochemical study with glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase, calcium-binding proteins and nitric oxide synthase as second markers". *Brain Research* [Holanda]. 692: 215-226.
- Henderson, Z. 1995. "Expression of GABA_A receptor subunit messenger RNA in non-cholinergic neurons of the rat basal forebrain". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 65: 1077-1086.
- Herremans, A.H.J.; Hijzen, T.H. y Olivier, B. 1997. "Effects of cholinergic drug infusions into the dorsal part of the medial prefrontal cortex on delayed conditional discrimination performance in the rat". *Behavioral Brain Research* [Holanda]. 84: 291-299.
- Himmelheber, A.M.; Sarter, M. y Bruno, J.P. 2000. "Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats". *Cognitive Brain Research* [Holanda]. 9: 313-325.
- Holley, L.A. *et al.* 1995. "Dissociation between the attentional effects of infusions of a benzodiazepine receptor agonist and an inverse agonist into the basal forebrain". *Psychopharmacology* [Alemania]. 120: 99-108.
- Howard, M.A. y Simons, D.J. 1994. "Physiologic effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on rat barrel cortex neurons". *Experimental Brain Research* [Alemania]. 102: 21-33.

- Inglis, F.M.; Day, J.C. y Fibiger, H.C. 1994. "Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 62: 1049-1056.
- Jiménez-Capdeville, M.E.; Dykes, R.W. y Myasnikov, A.A. 1997. "Differential control of cortical activity by the basal forebrain in rats: a role for both cholinergic and inhibitory influences". *Journal of Comparative Neurology* [Estados Unidos]. 381: 53-67.
- Kesner, R. 1988. "Reevaluation of the contribution of the basal forebrain cholinergic system to memory". *Neurobiology of Aging* [Estados Unidos]. 9: 609-616.
- Knight, R.T.; Grabowecky, M.F. y Scabini, D. 1995. "Role of human prefrontal cortex in attention control". En *Epilepsy and the functional anatomy of the frontal lobe*, de H. Jasper; S. Riggio y P.S. Goldman-Rakic. New York; Raven press. págs. 21-36.
- Kolb, B. 1984. "Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review". *Brain Research Reviews* [Holanda]. 8: 65-98.
- Krnjevič, K.; Pumain, R. y Renaud, L. 1971. "The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex". *Journal of Physiology London* [Reino Unido]. 215: 247-268.
- Lamour, Y.; Dutar, P. y Jobert, A. 1984. "Cortical projections of the nucleus of the diagonal band of Broca and of the substantia innominata in the rat: an anatomical study using the anterograde transport of a conjugate of wheat germ agglutinin and horseradish peroxidase". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 12: 395-408.
- Martínez-Guijarro, F.J. y Freund, T.F. 1992. "GABA-immunoreactive basal forebrain afferents innervate GABA-immunoreactive non-pyramidal cells in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 51: 425-437.
- McCormick, D.A. y Prince, D.A. 1986. "Mechanisms of action of ACh in the guinea pig cerebral cortex in vitro". *Journal of Physiology London* [Reino Unido]. 375: 169-194.
- McGaughy J.; Kaiser, T. y Sarter, M. 1996. "Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density". *Behavioral*

- Neuroscience* [Estados Unidos]. 110: 247-265.
- McGaughy, J. y Sarter, M. 1995. "Behavioral vigilance in rats: task validation and effects of age, amphetamine, and benzodiazepine receptor ligands". *Psychopharmacology* [Alemania]. 117: 340-357.
- McGaughy, H. y Sarter, M. 1998. "Sustained attention performance in rats with intracortical infusions of 192 IgG-saporin-induced cortical cholinergic deafferentation: effects of physostigmine and FG7142". *Behavioral Neuroscience* [Estados Unidos]. 112: 1519-1525.
- McKenna, T.M.; Ashe, J.H. y Weinberger, N.M. 1989. "Cholinergic modulation of frequency receptive fields in auditory cortex. I. Frequency-specific effects of muscarinic agonists". *Synapse* [Estados Unidos]. 4: 30-43.
- McNaughton, B.L.; O'Keefe, J. y Barnes, C.A. 1983. "The stereotrodes: a new technique for simultaneous isolation of several single units in the central nervous system from multiple unit records". *Journal of Neuroscience Methods* [Holanda]. 8: 391-397.
- Mesulam, M.M. 1981. "A cortical network for directed attention and unilateral neglect". *Annals of Neurology* [Estados Unidos]. 10: 309-325.
- Mesulam, M.M. 1983. "The functional anatomy and hemispheric specialization for directed attention. The role of the parietal lobe and its connectivity". *Trends in Neuroscience* [Holanda]. 6: 384-38.
- Mesulam, M.M. 1995. "The cholinergic contribution to neuromodulation in the cerebral cortex". *Seminars in the neurosciences* [Reino Unido]. 7: 297-307.
- Metherate, R. y Ashe, J.H. 1993. "Nucleus basalis stimulation facilitates thalamocortical synaptic transmission in the rat auditory cortex". *Synapse* [Estados Unidos]. 1: 132-143.
- Metherate, R.; Cox, C.L. y Ashe, J.H. 1992. "Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 12: 4701-4711.
- Metherate, R.; Tremblay, N. y Dykes, R.W. 1988. "The effects of acetylcholine on response properties of cat somatosensory cortical neurons". *Journal of Neurophysiology* [Estados Unidos]. 59: 1231-1252.

- Metherate, R. y Weinberger, N.M. 1990. "Cholinergic modulation of responses to single tones produces tone-specific receptive field alterations in cat auditory cortex". *Synapse* [Estados Unidos]. 6: 133-145.
- Miner, L.A.H.; Ostrander, M. y Sarter, M. 1997. "Effects of ibotenic acid-induced loss of neurons in the medial prefrontal cortex of rats on behavioral vigilance: evidence for executive dysfunction". *Journal of Psychopharmacology* [Reino Unido]. 11: 169-178.
- Moore, H.; Sarter, M. y Bruno, J.P. 1993. "Bidirectional modulation of stimulated cortical acetylcholine release by benzodiazepine receptor ligands". *Brain Research* [Holanda]. 627: 267-274.
- Moore, H.; Sarter, M. y Bruno, J.P. 1995. "Bidirectional modulation of cortical acetylcholine efflux by infusions of benzodiazepine receptor ligands into the basal forebrain". *Neuroscience Letters* [Holanda]. 89: 31-34.
- Muir, J.L. *et al.* 1992. "Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task". *Experimental Brain Research* [Alemania]. 89: 611-622.
- Muir, J.L.; Everitt, B.J. y Robbins, T.W. 1995. "Reversal of visual attentional dysfunction following lesions of the cholinergic basal forebrain by physostigmine and nicotine but not by the 5-HT₃ receptor antagonist, ondansetron". *Psychopharmacology* [Alemania]. 118: 82-92.
- Muir, J.L.; Everitt, B.J. y Robbins, T.W. 1996. "The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task". *Cerebral Cortex* [Estados Unidos]. 6: 470-481.
- Muir, J.L. *et al.* 1993. "Excitotoxic lesions of the basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention". *Behavioral Brain Research* [Holanda]. 57: 123-131.
- Murphy, P.C. y Sillito, A.M. 1991. "Cholinergic enhancement of direction selectivity in the visual cortex of the cat". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 40: 13-20.
- Olton, D.S. *et al.* 1988. "Attention and the frontal cortex as examined by simultaneous

- temporal processing". *Neuropsychologia* [Holanda]. 26: 307-318.
- Olton, D.S.; Wenk, G.L. y Markowska, A.M. 1991. "Basal forebrain, memory and attention. En *Activation to acquisition: functional aspects of the basal forebrain cholinergic system* de R.T. Richardson. Boston; Birkhäuser. págs. 247-262
- Pang, K. et al. 1993. "Nucleus basalis magnocellularis and attention: effects of muscimol infusions". *Behavioral Neuroscience* [Estados Unidos]. 107: 1031-1038.
- Pardo, J.V.; Fox, P.T. y Raichle, M.E. 1991. "Localization of a human system for sustained attention by positron emission tomography". *Nature* [Reino Unido]. 349: 61-64.
- Paxinos, G. y Watson, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4ª ed. San Diego: Academic Press. 213 págs.
- Perry, E. et al. 1999. "Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness". *Trends in Neuroscience* [Holanda]. 22: 273-280.
- Phillis, J.W. 1968. "Acetylcholine release from the cerebral cortex: its role in cortical arousal". *Brain Research* [Holanda]. 7: 378-389.
- Posner, M.I. et al. 1984. "Effects of parietal injury on covert orienting of attention". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 4: 1863-1874.
- Poucet, B. y Herrmann, T. 1990. "Septum and medial frontal cortex contribution to spatial problem-solving". *Behavioural Brain Research* [Holanda]. 37: 269-280.
- Preston, G.C. et al. 1988. "Effects of lorazepam on memory, attention, and sedation in man". *Psychopharmacology* [Alemania]. 95: 208-215.
- Richardson, R.T. y DeLong, M.R. 1990. "Context-dependent responses of primate nucleus basalis neurons in a go/no-go task". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 10: 2526-2540.
- Robbins, T.W. et al. 1989. "Comparative effects of quisqualic and ibotenic acid-induced lesions of the substantia innominata and globus pallidus on the acquisition of a conditional visual discrimination: differential effects on cholinergic mechanisms". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 28: 337-352.
- Robbins, T.W. y Everitt, B.J. 1995. "Arousal systems and attention. En *The cognitive neurosciences* de M.S. Gazzaniga. Cambridge; MIT Press. págs. 703-720

- Sahakian B. *et al.* 1989. "The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type". *British Journal of Psychiatry*. 154: 797-800.
- Sarter, M. *et al.* 1992. "Cognition enhancement based on GABA-cholinergic interactions". En *Neurotransmitter interactions and cognitive function* de: E.D. Levin; M. Decker y L.L. Butcher. Boston; Birkhäuser. págs. 329-354.
- Sarter, M. y Bruno, J.P. 1994. "Cognitive functions of cortical acetylcholine: lessons from studies on the transynaptic modulation of activated efflux". *Trends in Neuroscience* [Holanda]. 17: 217-221.
- Sarter, M. y Bruno, J.P. 1997. "Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis". *Brain Research Reviews* [Holanda]. 23: 28-46.
- Sato, H. *et al.* 1987. "A functional role of cholinergic innervation to neurons in the cat visual cortex". *Journal of Neurophysiology* [Estados Unidos]. 58: 765-780.
- Somogyi, P. *et al.* 1983. "Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 10: 261-294.
- Spehlman, R.; Daniels, J.C. y Smathers, C.C. Jr. 1971. "Acetylcholine and the synaptic transmission of specific impulses to the visual cortex". *Brain* [Estados Unidos]. 94: 125-138.
- Torres, E.M. *et al.* 1994. "Behavioral, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system". *Neuroscience* [Estados Unidos]. 63: 95-122.
- Tremblay, N.; Warren, R.A. y Dykes, R.W. 1990. "Electrophysiological studies of acetylcholine and the role of the basal forebrain in the somatosensory cortex of the cat: II. Cortical neurons excited by somatic stimuli". *Journal of Neurophysiology* [Estados Unidos]. 64: 1212-1222.
- Turchi, J.; Holley, L.A. y Sarter, M. 1995. "Effects of nicotinic acetylcholine receptor ligands on behavioral vigilance in rats". *Psychopharmacology* [Alemania]. 118: 195-205.

- Turchi, J. y Sarter, M. 1997. "Cortical acetylcholine and processing capacity: effects of cortical cholinergic deafferentation on crossmodal divided attention in rats". *Cognitive Brain Research* [Holanda]. 6: 147-158.
- Voytko, M.L. *et al.* 1994. "Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 14: 167-186.
- Wenk, G.L. *et al.* 1986. "Cholinergic function and memory: extensive inhibition of choline acetyltransferase fails to impair radial maze performance in rats". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* [Estados Unidos]. 25: 521-526.
- Wenk, G.L. *et al.* 1994. "Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192 IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 14: 5986-5995.
- Wenk, G.L. 1997. "The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress". *Neurobiology of learning and memory* [Estados Unidos]. 67: 85-95.
- Whitehouse, P.J. 1981. "Alzheimer's disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis". *Annals of Neurology* [Estados Unidos]. 10: 122-126.
- Wiley, R.G.; Oeltmann, T.N. y Lappi, D.A. 1991. "Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor". *Brain Research* [Holanda]. 562: 149-153.
- Wilson, F.A.W. y Rolls, E.T. 1990. "Learning and memory is reflected in the responses of reinforcement-related neurons in the primate basal forebrain". *Journal of Neuroscience* [Estados Unidos]. 10: 1254-1267.
- Woody, C.D.; Swartz, B.E. y Gruen, E. 1978. "Effects of acetylcholine and cyclic GMP on input resistance of cortical neurons in awake cats". *Brain Research* [Holanda]. 158: 373-395.
- Woolf, N.J.; Eckenstein, F. y Butcher, L.L. 1984. "Cholinergic systems in the rat brain: I. Projections to the limbic telencephalon". *Brain Research Bulletin* [Estados Unidos]. 13: 751-784.
- Woolf, N.J. 1991. "Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord". *Progress*

- in Neurobiology* [Estados Unidos]. 37: 475-524.
- Xiang, Z.; Huguenard, J.R. y Prince, D.A. 1998. "Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks". *Science* [Estados Unidos]. 281: 985-988.
- Záborszky, L. 1989. "Afferent connections of the forebrain cholinergic projection neurons with special reference to monoaminergic and peptidergic fibers". En *Central cholinergic synaptic transmission* de M. Frotscher y U. Misgeld. Basel; Birkhäuser. págs. 12-22.
- Záborszky, L. 1992. "Synaptic organization of basal forebrain cholinergic projection neurons". En *Neurotransmitter interactions and cognitive functions* de E. Levin; M Decker y L. Butcher. Boston; Birkhäuser. pp. 27-65.
- Záborszky, L. *et al.* 1986. "Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band". *Journal of Comparative Neurology* [Estados Unidos]. 243: 488-509.
- Záborszky, L. y Duque, A. 2000. "Local synaptic connections of basal forebrain neurons". *Behavioral Brain Research* [Holanda]. 115: 143-158.
- Záborszky, L. *et al.* 1999. "The basal forebrain corticopetal system revisited". *Annals of the New York Academy of Science* [Estados Unidos]. 877: 339-367.

VII. ANEXO: CUADROS Y FIGURAS

A. Métodos

1. Aparatos para el estudio del comportamiento y reglas de respuesta

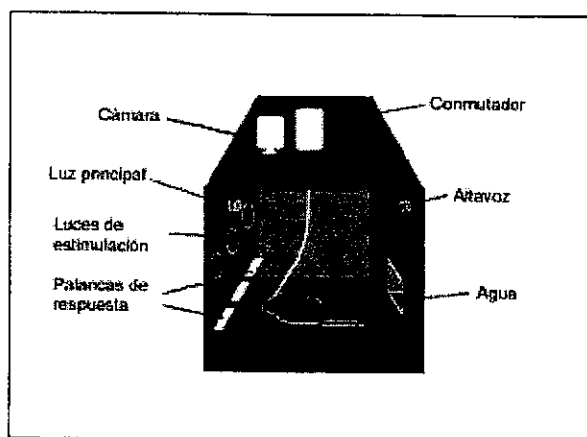


Figura 1. Dibujo esquemático de la cámara de experimentación adaptada para registrar la actividad electrofisiológica.

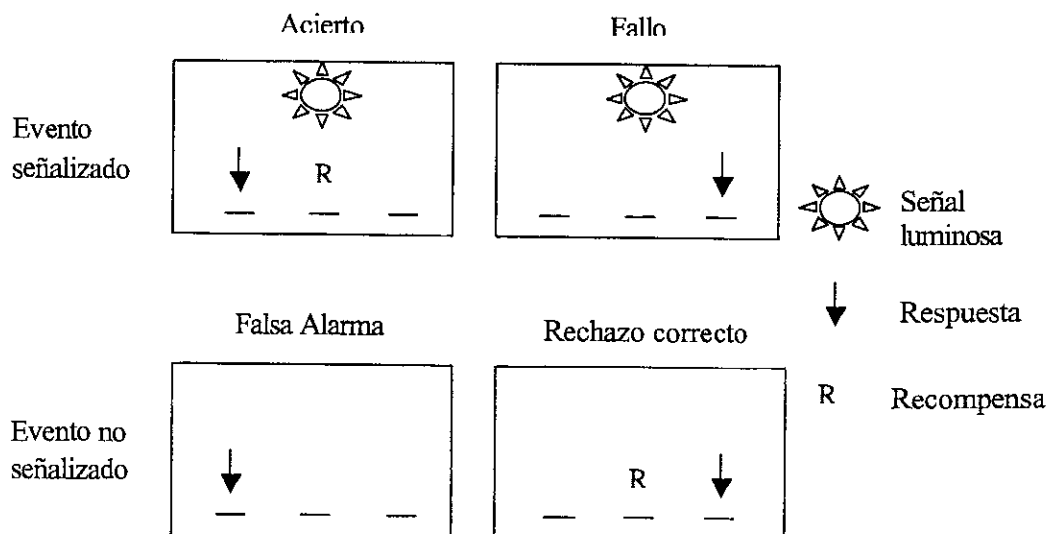


Figura 2. Parte frontal de la cámara de entrenamiento y reglas de respuesta. La parte superior presenta las reglas de respuesta para los eventos señalizados, mientras que la parte inferior presenta las reglas de respuesta para los eventos no señalizados.

2. Electrodo

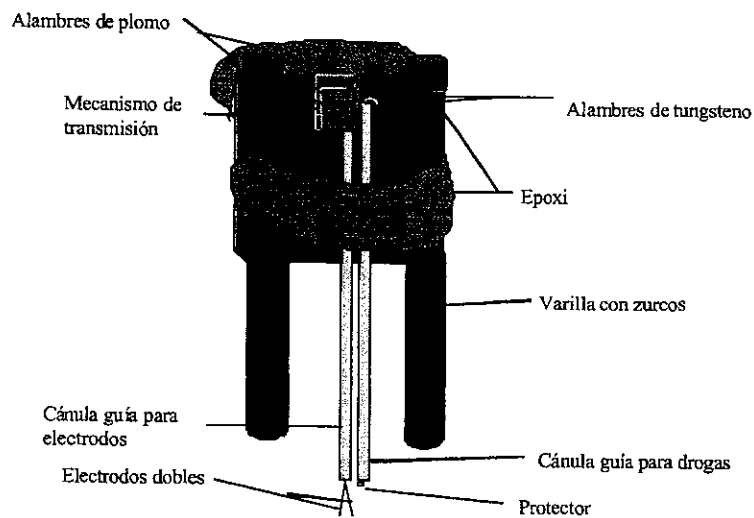


Figura 3. Esquema de los electrodos empleados para registrar la actividad electrofisiológica

3. Sujetos de estudio



Figura 4. Sujeto con el mecanismo de registro de la actividad electrofisiológica.

B. Resultados

1. Histología

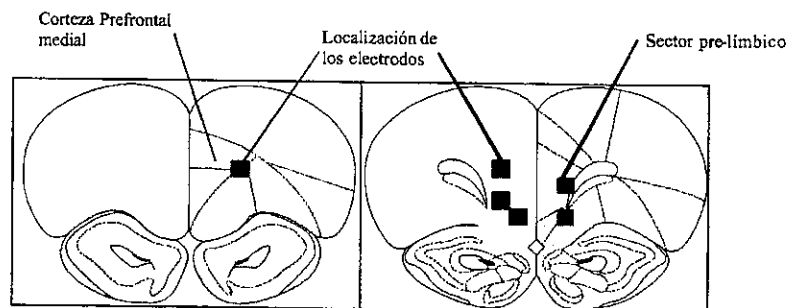


Figura 5. Localización de la punta de los electrodos dentro de la CPFm (los dibujos han sido adaptados del atlas de Paxinos y Watson, 1998).

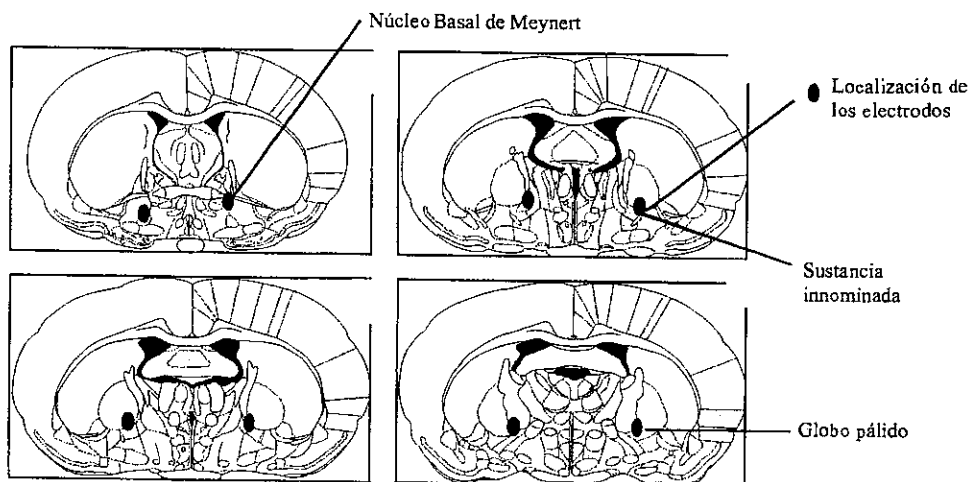


Figura 6. Localización de las cánulas guía para la microinyección de drogas (los dibujos han sido adaptados del atlas de Paxinos y Watson, 1998).

2. Análisis del comportamiento

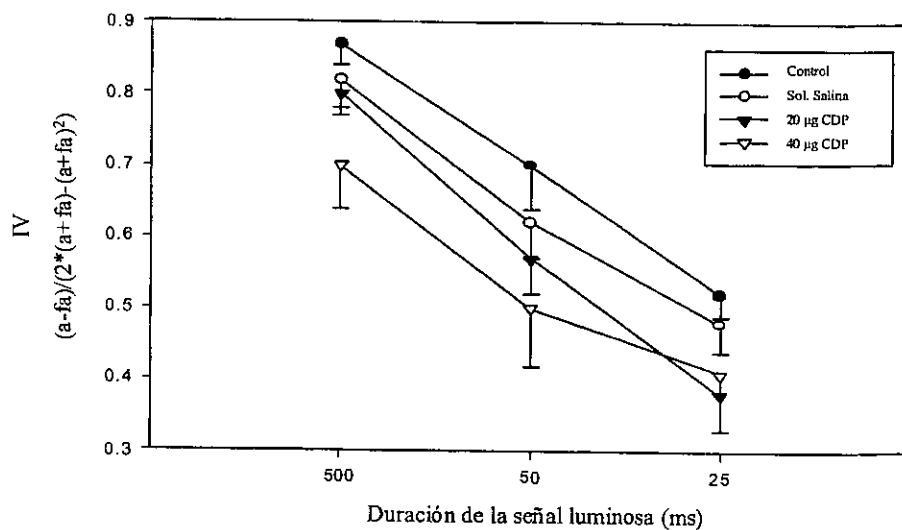


Figura 7. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el índice de vigilancia para cada una de las duraciones de la señal luminosa.

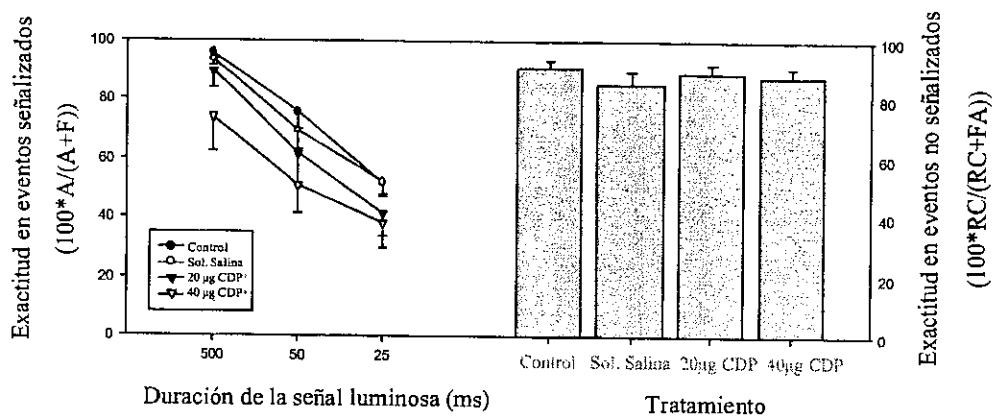


Figura 8. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el desempeño de ratas en una tarea de atención visual sostenida. A la izquierda se muestra la exactitud en eventos señalizados (porcentaje de Aciertos) a cada duración de la señal luminosa, y a la derecha se muestra la exactitud en eventos no señalizados (porcentaje de Rechazos Correctos).

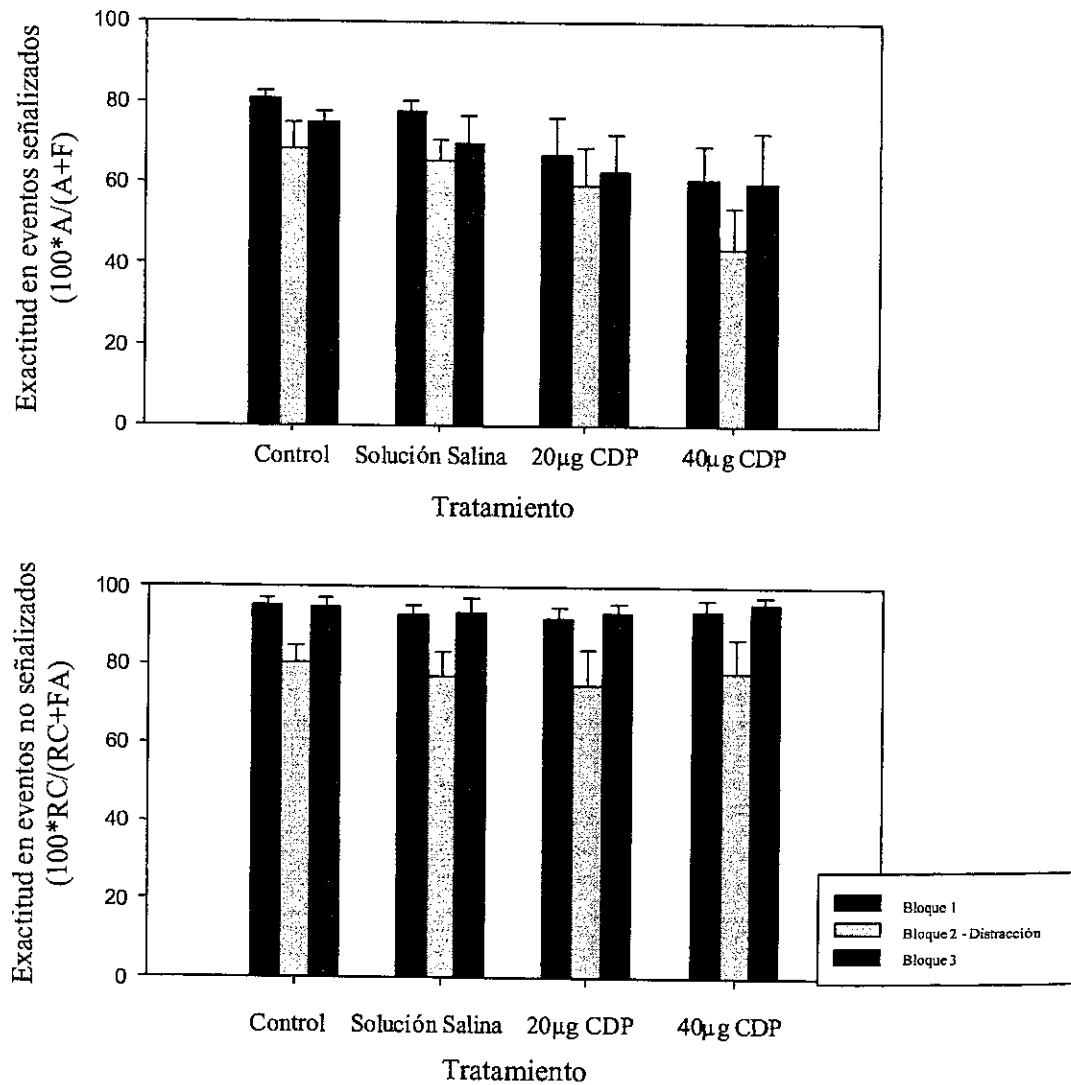


Figura 9. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en la exactitud en eventos señalizados (parte superior) y en la exactitud en eventos no señalizados (parte inferior), en cada uno de los bloques.

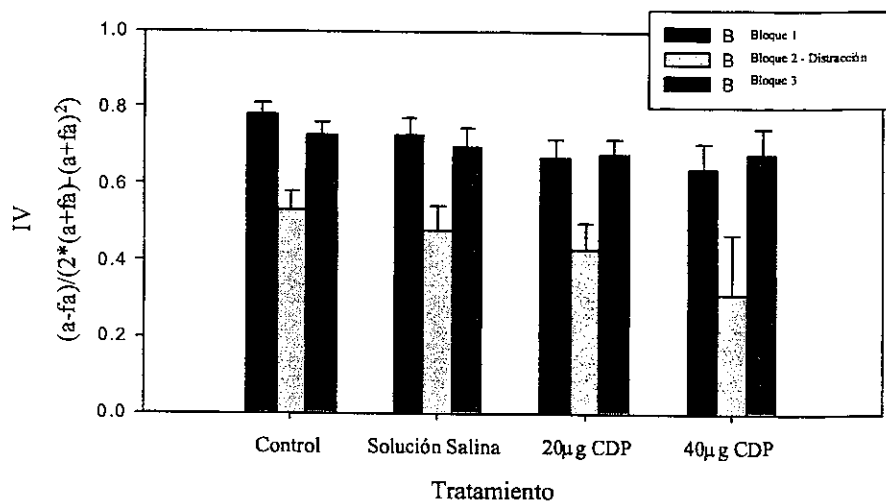


Figura 10. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el índice de vigilancia (IV) en cada bloque. La presentación de una distracción (la luz principal parpadeando a 0.5 Hz) durante el bloque 2 no aumenta las deficiencias en el desempeño observadas después de las microinyecciones de CDP.

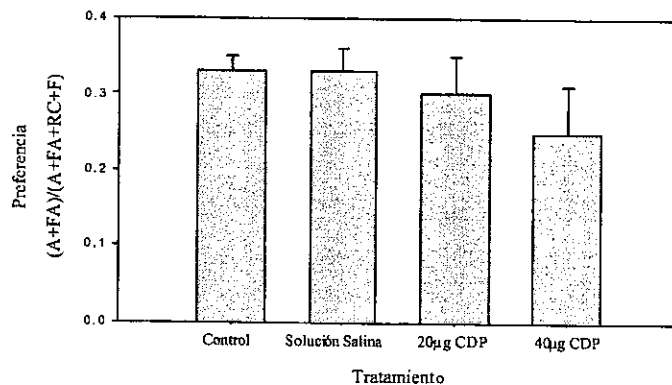


Figura 11. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en la preferencia por alguna de las palancas de respuesta. Las microinyecciones de CDP no inducen la preferencia por alguna de las palancas.

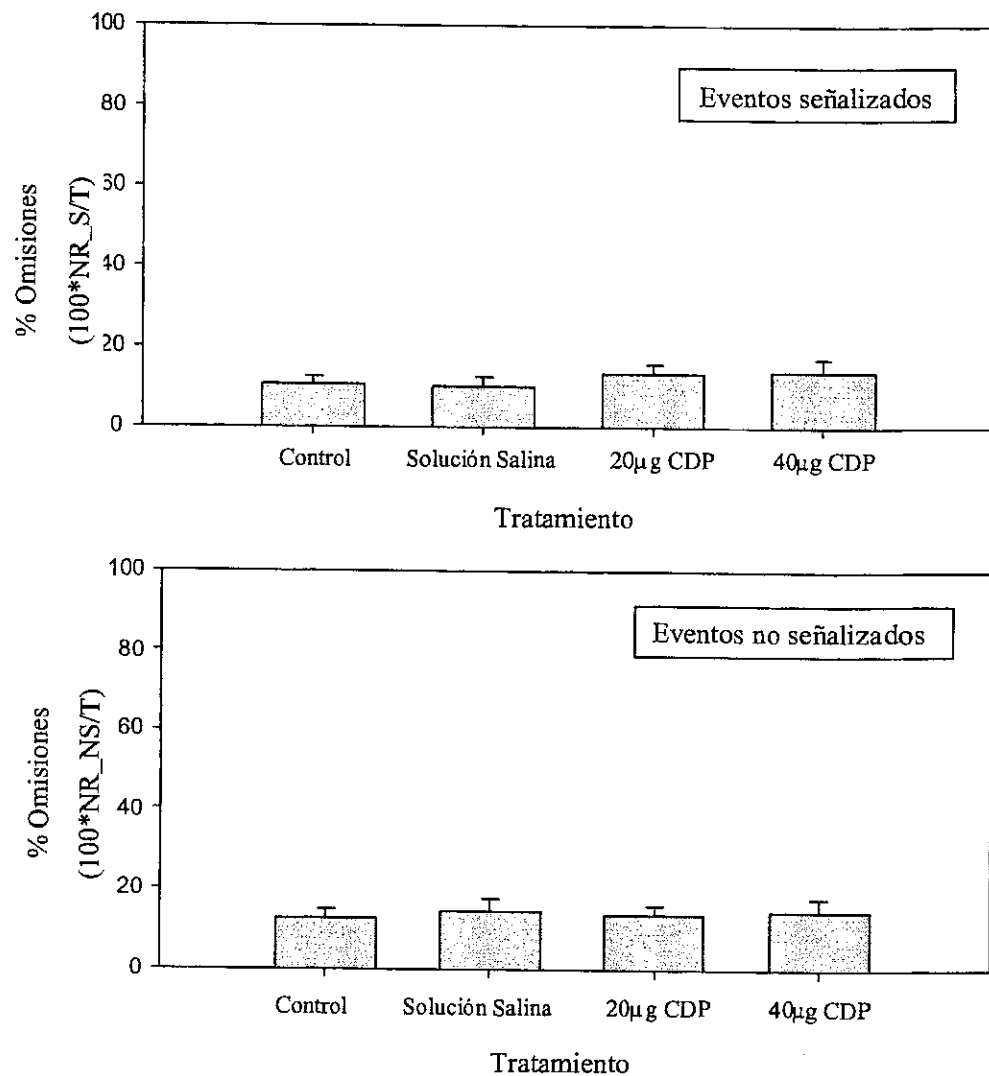


Figura 12. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el porcentaje de omisiones en eventos señalizados (parte superior de la figura) y en eventos no señalizados (parte inferior).

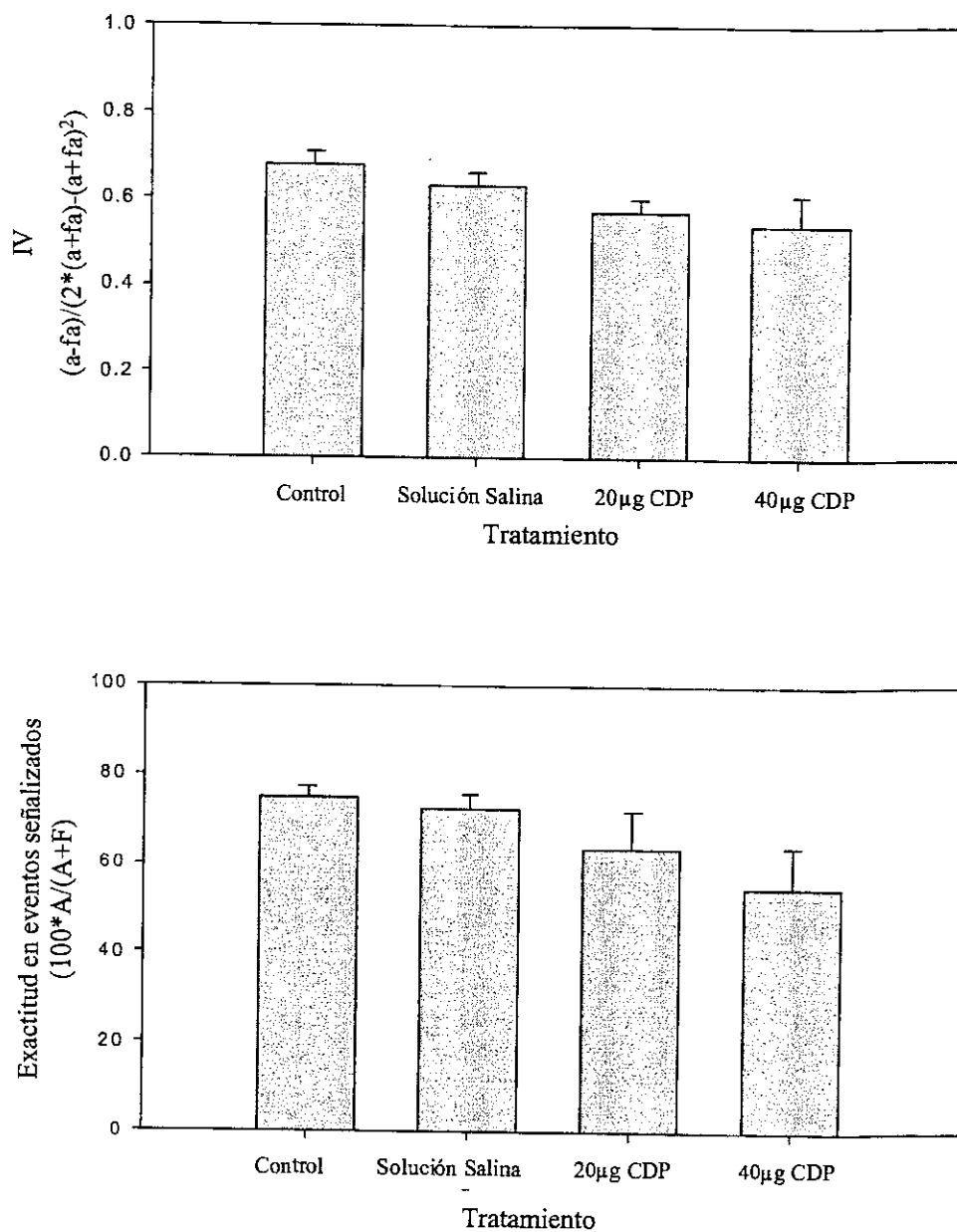


Figura 13. Efecto de las microinyecciones de CDP, dentro de los núcleos basales del diencefalo, en el índice de vigilancia (IV) y la exactitud en los eventos señalizados. Puede verse una clara tendencia hacia la disminución en el porcentaje de aciertos en el tratamiento con la dosis alta de CDP.

3. Análisis electrofisiológico

Condición	Previo	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Posterior	Completo
Control	0.81	0.79	0.90	0.94	1.05	0.89
Solución salina	0.82	0.87	0.87	0.84	0.80	0.85
20 ug CDP	1.06	1.12	1.15	1.13	1.10	1.12
40 ug CDP	1.05	1.03	0.99	1.00	1.04	1.02

Cuadro 1. Velocidad de descarga promedio (en descargas por segundo) en cada bloque y durante la sesión completa después de cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Aumento asociado a la distracción	Disminución asociada a la distracción	Aumento asociado a la tarea	Disminución asociada a la tarea	Sin cambios
Control	14.46% (23)	22.01% (35)	24.53% (39)	6.29% (10)	32.70% (52)
Solución salina	11.80% (17)	13.89% (20)	18.75% (27)	19.44% (28)	36.11% (52)
20 ug CDP	14.54% (24)	12.73% (21)	21.82% (36)	15.76% (26)	35.15% (58)
40 ug CDP	10.27% (15)	13.70% (20)	15.07% (22)	18.49% (27)	42.47% (62)

Cuadro 2. Cambios en la velocidad de descarga de las neuronas de la CPFm durante la presentación de una distracción. Los datos están expresados como el porcentaje de neuronas que presentan cambios en su velocidad de descarga sobre el total de neuronas registradas en cada condición (el número de neuronas en cada caso se muestra entre paréntesis).

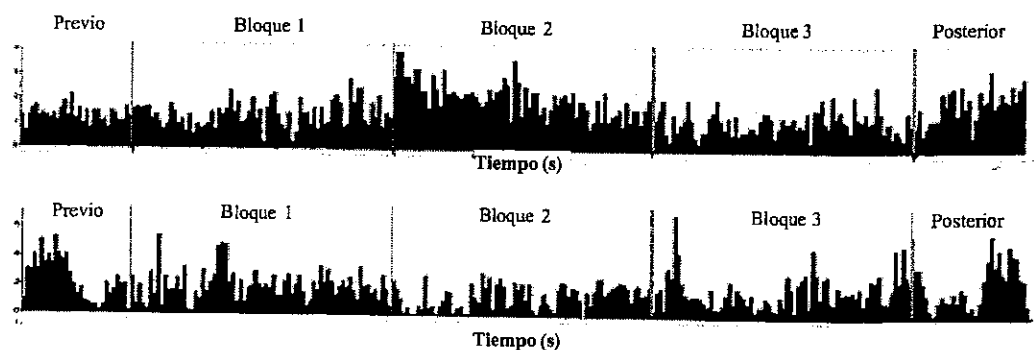


Figura 14. Ejemplos representativos de las neuronas que presentaron cambios en la velocidad de descarga durante la presentación de la distracción (bloque 2). La parte superior de la figura presenta una neurona que exhibía un incremento en la velocidad de descarga asociado a la distracción, mientras que la parte inferior de la figura presenta una neurona cuya actividad disminuía al introducir la distracción.

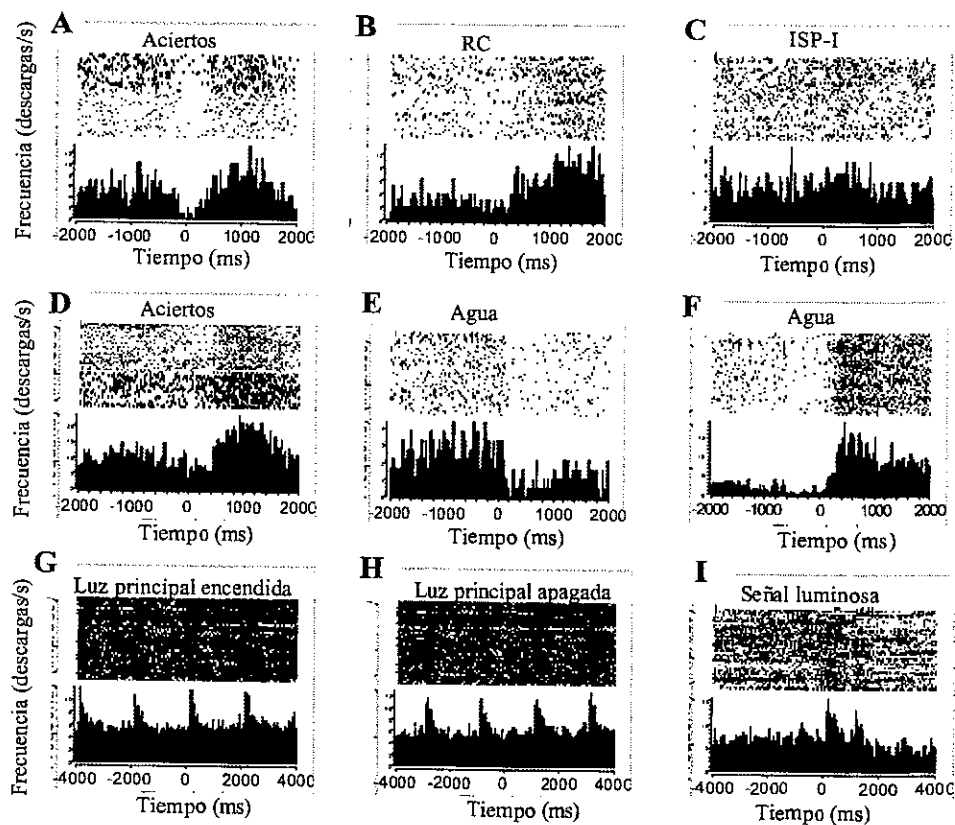


Figura 15. Ejemplos de correlaciones entre la actividad neuronal de la CPFm y diversos sucesos de la tarea de atención visual sostenida.

A-C: Ejemplos representativos de correlaciones con la respuesta, con especificidad con respecto al tipo de evento. *A* ilustra una correlación inhibitoria con la respuesta, en la que se puede observar una reducción en la velocidad de descarga que coincide con un acierto. *B*: La misma neurona no presenta una disminución en la velocidad de descarga al efectuar un rechazo correcto o al presionar la palanca izquierda durante el ISP (*C*). *D-F*: Ejemplos representativos de correlaciones con la recompensa. *D*: una correlación excitadora de anticipación a la recompensa, en la que la velocidad de descarga aumenta después de un acierto y se mantiene elevada hasta el momento de recibir la recompensa. Correlaciones con el consumo de la recompensa, inhibitoria (*E*) y excitadora (*F*), en la que las neuronas aumentan y disminuyen, respectivamente, la velocidad de descarga inmediatamente después de recibida la recompensa. La velocidad de descarga se mantiene elevada durante el consumo de la recompensa. *G-I*: Ejemplos representativos de correlaciones sensoriales. La misma neurona presenta un incremento en la velocidad de descarga al encenderse la luz principal (*G*) y al ser presentada la señal luminosa (*I*). La misma neurona no alteraba su actividad cuando la luz principal se apagaba (*H*).

Tipo de correlación	Tratamiento			
	Control	Sol. salina	20 µg CDP	40 µg CDP
Con la respuesta	27.0% (43)	18.8% (27)	17.6% (29)	18.5% (27)
Excitadora anterior a la respuesta	6.9% (11)	3.5% (5)	3.0% (5)	4.1% (6)
Inhibidora anterior a la respuesta	1.9% (3)	0.7% (1)	0.6% (1)	0.7% (1)
Respuesta-excitadora	15.7% (25)*	5.6% (8)	6.1% (10)	4.8% (7)
Respuesta-inhibitoria	4.4% (7)*	9.7% (14)	10.9% (18)	10.3% (15)
Especificidad con el tipo de evento	20.13% (32)*	11.1% (16)	11.5% (19)	11.6% (17)
Con la recompensa	62.3% (99)	56.2% (81)	64.2% (106)	43.8% (64)**
Anticipación	32.7% (52)	33.3% (48)	40.0% (66)	25.34% (37)
excitadora	15.7% (25)	15.3% (22)	18.8% (31)	15.1% (22)
inhibitoria	18.2% (29)	19.4% (28)	23.0% (38)	10.3% (15)**
Consumo	45.9% (73)	41.7% (60)	44.2% (73)	28.1% (41)**
Excitadora	24.5% (39)	30.6% (44)	28.5% (47)	23.3% (34)
Inhibitoria	21.4% (34)	11.1% (16)	15.8% (26)	4.8% (7)**
Especificidad con el tipo de evento	17.6% (28)	18.1% (26)	20.6% (34)	8.9% (13)**
Sensoriales	7.6% (12)	13.2% (19)	10.3% (17)	13.0% (19)
Múltiples	29.6% (47)	23.6% (34)	30.3% (50)	17.9% (26)
Total	78.6% (125)	77.1% (111)	77.0% (127)	67.1% (98)
Ninguna correlación	21.4% (34)	22.9% (33)	23.0% (38)	32.9% (48)**

Cuadro 3. Correlación de la actividad neuronal en la CPFm con diferentes aspectos de la tarea de atención visual sostenida.

Los datos están presentados como el porcentaje de neuronas que presentan cada tipo específico de correlación del total de neuronas registradas. * medidas que son estadísticamente diferentes en las condiciones control y de microinyección de solución salina; ** medidas que son estadísticamente diferentes entre las condiciones de microinyección de droga y de solución salina ($p < 0.05$).

