

105



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGIA

0292669

**PARTICIPACION DEL SISTEMA COLINERGICO  
BASAL EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**LICENCIADO EN PSICOLOGIA**  
P R E S E N T A :  
**RANIER GUTIERREZ MENDOZA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Dedico esta tesis

A mi esposa Luisa e hijo Casiel por haberle dado sentido a mi vida y por toda la  
paciencia, comprensión y amor que me dan día con día.

A mi Madre por su sacrificio y amor, a mi Padre por enseñarme a perdonar.

A mis hermanos Katia, Jair, Areli, Gerardo, Lalo, Jazmín, Ixela, Karina, Daniel y Pablo porque la distancia no nos ha separado.

Quiero agradecer a todas las personas que me han brindado su amistad y amor desde la infancia muy especialmente a mi Madrina, a Lucha (gracias por ese avión negro) y a Lupe.

También agradezco a Coca y a Enrique por abrir me las puertas de su casa y por todo su apoyo incondicional.

A mis compañeros del laboratorio Maribel, Víctor, Ricardo, Leticia, Tania, Enrique y Gustavo, antes que nada por su amistad y por todos los momentos gratos que hemos compartido en esta nuestra segunda casa, muy especialmente quiero agradecer a Humberto por toda su paciencia y enseñanzas que en última instancia fueron las que me involucraron en la aventura de la ciencia.

A todos los estudiantes que no se vencen ante nada.

A todos ellos y a todas las personas que de alguna manera u otra han hecho posible que se cumpla este sueño, que se veía tan lejano, gracias.

## Reconocimientos

Quiero agradecer al **Dr. Federico Bermúdez Rattoni** por brindarme tantas oportunidades, por sus inagotables consejos e incondicional apoyo. También quiero reconocer al **Mtro. Gustavo Bacha Méndez** por su valiosa dedicación a la docencia, gracias por compartir tus experiencias y conocimientos durante estos tres semestres, así como, al **Dr. David Velázquez Martínez**, al **Dr. Antonio Zainos Rosales** y al **Dr. Víctor Ramírez Amaya** por su tiempo y valiosos comentarios a este trabajo.

Así mismo a **Oreste Carbajal Esquivel**, **Federico Jandete** y **Yolanda Díaz de Castro** por su amistad y ayuda en la preparación técnica de esta tesis.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 31842-N) y por la DGAPA (proyecto IN214399).

## Índice

|   |    |
|---|----|
| Índice.....   | 1  |
| Abreviaturas.....   | 2  |
| Resumen.....  | 3  |
| Introducción.....   | 4  |
| ¿Qué es el Condicionamiento Aversivo a los Sabores?.....                                    | 4  |
| Estructuras Involucradas en el CAS.....   | 9  |
| <i>Vías de procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales.</i> .....                | 9  |
| <i>Corteza Insular (CI)</i> .....   | 12 |
| <i>Amígdala</i> .....   | 13 |
| <i>Núcleo Basal Magnocelular (NBM)</i> .....  | 15 |
| Distribución Colinérgica.....   | 18 |
| Desarrollo de técnicas específicas para lesionar células colinérgicas del NBM.....          | 18 |
| El Problema y la Justificación.....   | 21 |
| Experimento 1.....  | 22 |
| Materiales y Métodos.....   | 23 |
| Resultados experimento 1.....   | 26 |
| Conclusión experimento 1.....   | 30 |
| Experimento 2.....  | 33 |
| ¿Cuál es el papel de las proyecciones colinérgicas del NBM en el aprendizaje del CAS? ..... | 33 |
| Resultados experimento 2.....   | 39 |
| Conclusión del experimento 2.....   | 40 |
| Conclusión General.....   | 42 |
| Modelo de regulación colinérgica del NBM.....   | 44 |
| ¿ Participa el NBM en procesos de aprendizaje y memoria? 49                                 |    |
| Comentario final.....   | 51 |
| Bibliografía .....  | 53 |

## Abreviaturas

|      |  |
|------|--|
| ACh  | Acetilcolina                             |
| AChE | Acetil Colinesterasa                     |
| ABL  | Amígdala Basolateral                     |
| AC   | Amígdala Central                         |
| CAS  | Condicionamiento Aversivo a los Sabores  |
| ChAT | Colin Acetiltransferasa                  |
| CI   | Corteza Insular                          |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| LiCl | Cloruro de Litio                         |
| nbM  | núcleo basal de Meynert (humano)         |
| NBM  | Núcleo Basal Magnocefaloso (rata)        |
| NMDA | N-Metil-D-Aspartato                      |
| NTS  | Núcleo del Tracto Solitario              |
| PBN  | Núcleo Parabraquial del Puente           |
| TTX  | Tetradotoxina                            |

## Resumen

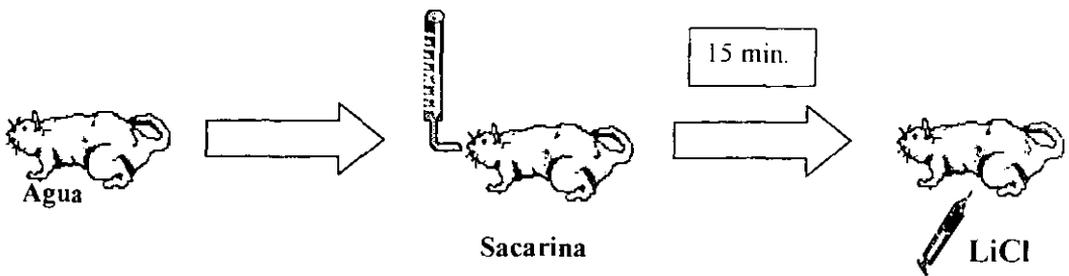
Con base en que una de las características más consistentes en la enfermedad de Alzheimer es la destrucción de los somas colinérgicos del núcleo basal de Meynert (nbM), se ha intentado correlacionar la destrucción del nbM con el marcado deterioro mnemónico que presentan estos pacientes. El nbM es la única estructura que provee de acetilcolina (ACh) a toda la corteza cerebral, por lo que, estos pacientes presentan una fuerte disminución en marcadores colinérgicos en toda la corteza cerebral. La lesión del Núcleo Basal Magnocelular (NBM) en la rata, estructura homóloga al nbM, ha sido el modelo animal más utilizado para estudiar a la enfermedad de Alzheimer, ya que con esta lesión se consigue imitar la disfunción colinérgica cortical de estos pacientes.

Hasta el momento existe una clara evidencia que ha relacionado la actividad de las neuronas del NBM con el aprendizaje de diversas tareas dentro de las que se encuentra el Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS), p. ej., si se inactivan a todas las neuronas del NBM con TTX o se les lesiona con drogas que incrementan el calcio intracelular (excitotoxinas), los animales no aprenden el CAS. En un principio, se había propuesto que las neuronas colinérgicas del NBM que proyectan a la corteza eran mayormente responsables de los procesos de aprendizaje y memoria, ciertamente los resultados de esta tesis, demuestran que en ausencia de estas neuronas que proyectan a la corteza, las ratas pueden seguir aprendiendo una tarea que es de gran relevancia para su sobrevivencia, como lo es el CAS. Adicionalmente en el segundo experimento se demuestra la participación de un segundo grupo colinérgico basal que proyecta a la Amígdala Basolateral (ABL), ya que cuando se lesiona la proyección colinérgica que se dirige a la corteza y al mismo tiempo se bloquea a la ACh en la Amígdala Basolateral (ABL), las ratas no aprenden el CAS. Adicionalmente, se abre la posibilidad de que las neuronas restantes del NBM que no son colinérgicas participen en la formación de la memoria del CAS, a las que desafortunadamente no se les ha prestado mucha atención por lo que sería interesante realizar nuevos experimentos en donde se demuestre su participación en el CAS. Ciertamente, la creación de 192 IgG saporina nos ha permitido lesionar selectivamente a neuronas colinérgicas que proyectan a la corteza, pero también nos puede brindar una herramienta para estudiar, en ausencia de ACh, la participación de otros tipos de neurotransmisores, como al sistema GABAérgico del NBM, el cual también presenta

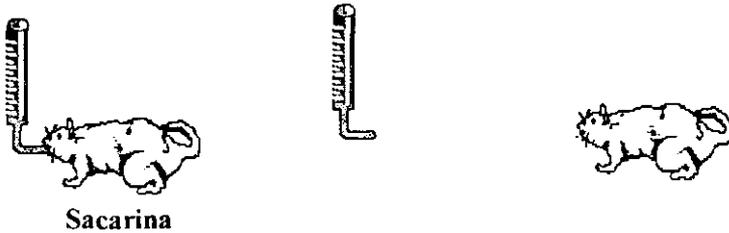
## PROTOCOLO CAS CON UNA BOTELLA

Línea  
Base

### Adquisición



### Prueba



Esquema 1.- muestra el procedimiento de CAS con una botella, brevemente. Se retira los bebederos de sus cajas 24 hrs. Antes de comenzar la línea base, la cual consiste en registrar el consumo de agua durante 15 min. durante 4 días. El día 5, se realiza la fase de adquisición, en donde, los animales son expuestos a sacarina 0.1% durante 15 min. y 15 min. más tarde, se les inyecta 7.5 ml/Kg de un irritante gástrico (LiCl 0.4 M) por vía intraperitoneal. Los días posteriores se registra el consumo de agua durante 15 min por día, hasta que los animales recuperen el nivel de consumo obtenido en la línea base. Por último, comienza la fase de prueba, en donde, se presenta por segunda ocasión sacarina 0.1%. Si el animal aprende el condicionamiento aversivo al sabor, éste reduce drásticamente el consumo de sacarina durante la prueba.

proyecciones corticales, o al sistema glutamatérgico. Al mismo tiempo nos permite conocer cual puede ser la interacción de estos tres neurotransmisores (ACh, GABA y Glutamato) en procesos tan complejos como lo son el aprendizaje y la memoria.

## Introducción

"It must have been something I ate"

John Garcia and Robert A. Koelling (1966)

### *¿Qué es el Condicionamiento Aversivo a los Sabores?*

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) es un paradigma conductual descrito por primera vez por John García<sup>37</sup>, con el cual, se puede estudiar la conducta aversiva o de rechazo que muestran casi todos los organismos a ciertas sustancias tóxicas que se encuentran en el ambiente.

En el CAS, un organismo aprende a rechazar un sabor si éste fue seguido de malestar interno en la primera ocasión que lo probó. El cambio que induce este aprendizaje, es una modificación en el valor hedónico de un sabor, el cual se convierte en aversivo o desagradable<sup>10</sup>(ver esquema 1).

La aversión puede ser inducida por algún agente que produzca malestar interno como por ejemplo radiación Gama<sup>37</sup>, irritación gástrica, drogas que induzcan émesis o estimulación vestibular (por medio de rotación<sup>35</sup>) e incluso en humanos la sugestión verbal.

Dentro de las características más importantes de este paradigma se encuentran al menos tres:

### 1 - Ciertos organismos aprenden el CAS en un solo apareamiento

En algunas especies se ha demostrado su capacidad para asociar en un solo apareamiento un estímulo gustativo con irritación gástrica inducida con LiCL, dentro de las que se encuentran ratas, coyotes, lobos y halcones<sup>16</sup>. Existen trabajos con otro tipo de especies que también pueden mostrar aversión a presas repletas de toxinas, pero por lo general se tardan más de un ensayo (insectos, gusanos y ciertas aves)<sup>19; 38</sup>

### 2 - Grandes intervalos interestimulos

La asociación del estímulo gustativo y del estímulo que induce el malestar puede ocurrir a pesar de que existan grandes demoras entre ellos. Existen diversas hipótesis que han intentado explicar por qué sucede esto, pero hasta el momento no existe una explicación adecuada (ver Domjan 1985). La idea con mayor aceptación hasta la fecha propone que se forma una representación neuronal del estímulo gustativo que perdura durante grandes intervalos en el Sistema Nervioso Central (SNC), de tal forma que cuando llega el estímulo que induce el malestar éstos se asocian<sup>24</sup>. Generalmente este aspecto del CAS no es de gran relevancia para las neurociencias<sup>24</sup> y la gran mayoría de los trabajos utilizan 15 min de separación entre los estímulos. No obstante se ha reportado que ratas aprenden el CAS aún cuando el sabor y la irritación gástrica (LiCL) difieran 6 hrs. En un estudio piloto encontramos que después de 8 hrs. de separación entre estímulos ya no se condicionan.

### 3.-Predisposición biológica.

Existe una predisposición biológica para asociar el consumo de un sabor con irritación gástrica y la aplicación de un daño en órganos periféricos con estímulos exteroceptivos.

El primer experimento que puntualizó este aspecto fue realizado por Garcia y col 1966, en donde, a dos grupos de ratas les presentó agua con un sabor y al mismo tiempo un estímulo audiovisual (ruido-luz) aparecía después de cada lengüetazo, al primer grupo lo apareó con irritación gástrica y al segundo con un choque eléctrico. En la fase de prueba les presentó por separado agua adicionada con el sabor y agua con las pistas audiovisuales. El resultado fue interesante, los animales que fueron apareados con irritación gástrica mostraron mayor aversión al sabor, es decir, lo dejaron de consumir, mientras que el estímulo audiovisual no disminuyó el consumo de agua. Por otra parte el grupo que fue apareado con un choque eléctrico, no mostró aversión al sabor pero cuando se presentó solamente al estímulo audiovisual la rata redujo su consumo de agua.

Con base en estudios sobre la organización del cerebro de vertebrados, se propuso la existencia de dos sistemas de defensa, que evolucionaron a partir de la selección ejercida por la cadena alimenticia<sup>38</sup>. Los cuales son fundamentales para entender las características tan especiales del CAS y el resultado del experimento anterior.

El primero se especializa en la protección de los órganos periféricos como la piel ante el ataque de un predador, este sistema puede generar una conducta motora que se adapte a cualquier amenaza externa<sup>15</sup>, todos los vertebrados asocian específica y más fácilmente estímulos exteroceptivos con algún daño en la piel (ruido-luz-choque eléctrico). Un ejemplo de esto se encuentra en algunas especies de cánidos que viven en grupo social, en donde el macho dominante ejerce su autoridad por medio de amenazas vocales, que pueden ir

acompañadas de mordidas en la piel de sus subordinados, los cuales, aprenden rápidamente a realizar conductas de sumisión para detener la agresión.

El otro sistema se especializa en la protección del interior del organismo contra la comida tóxica que existe en la naturaleza (muchas plantas desarrollaron mecanismos de defensa basados en toxinas y algunos insectos que comen de ellas resultan tóxicos para sus predadores) Este sistema tiene un repertorio conductual muy limitado, pero puede generar cambios en el valor hedónico de un sabor u olor para convertirlos en aversivos<sup>15, 38</sup>. Muchos organismos muestran mayor facilidad, para asociar el consumo de un sabor con irritación gástrica (en un solo apareamiento).

### *Filogenia del CAS*

Para sobrevivir los organismos deben seleccionar los nutrientes y evitar alimentos tóxicos. La habilidad de los animales para reconocer a través del gusto los componentes tóxicos ha producido influencias en la evolución de predadores y de sus presas, así como de algunas plantas. De esta forma, una gran variedad de organismos pueden asociar estímulos gustativos con efectos tóxicos, aparentemente como resultado de la evolución de mecanismos de protección tanto en vertebrados como en invertebrados, p. ej.,: La mantis religiosa rápidamente aprende a evitar aun insecto (Lygacidae) que vive en el algodóncillo, ya que éste contiene una sustancia tóxica (cardenolide) que es un poderoso emético, que produce malestar generalizado y es muy amargo a bajas concentraciones. Algunas especies de vertebrados asocian pistas visuales que predicen la ocurrencia de presas con grandes concentraciones de

toxinas, por ejemplo, el pájaro arrendajo puede aprender en menos de 20 ensayos a evitar mariposas monarcas (*Danaus plexippus*) altamente tóxicas que presentan una coloración aposemática., éstas tienen grandes cantidades de cardinólido,<sup>19 20</sup> el cual, lo consiguen en su estado larvario cuando lo digieren y almacenan del algodoncillo (*Asclepias curassavica*) o de cualquier asclepiadácea. Durante su metamorfosis el veneno se distribuye a través de sus tejidos, pero se concentra en grandes cantidades en el exoesqueleto y alas. El oriol de cabeza negra de México (*Icterus galbula abeillei*) llega a consumir aproximadamente 15,000 monarcas al día, para evitar intoxicarse con grandes cantidades de cardinólido, solamente se come el abdomen y tórax en donde en promedio existe el 21 % del total de cardinólido de la mariposa monarca<sup>19</sup>.

Son clásicos los trabajos realizados por científicos de UCLA, en donde, le dan a halcones de comer ratones albinos bañados en un irritante gástrico (LiCl), en los días posteriores, cuando se les vuelve a alimentar con ratones albinos y otros de color negro, los halcones solamente comen los ratones de color negro<sup>16</sup>. De igual forma, los lobos presentaron aversión a ovejas (los que en lugar de conducta de ataque, presentan conducta de juego) así como coyotes presentan aversión a liebres, con tan solo una experiencia con una liebre que tenía una gran cantidad de LiCl en su piel<sup>16</sup>.

El hecho de que una variedad tan amplia de organismos tanto invertebrados como vertebrados puedan fácilmente asociar el consumo de un sabor con consecuencias gástricas o con pistas visuales que acompañan a las presas con toxinas, demuestra la relevancia de este tipo de aprendizaje en la vida de estos organismos, que en última instancia el aprender a discriminar entre nutrientes y toxinas se refleja en la sobrevivencia.

Todos los roedores a lo largo de su evolución, han adoptado y almacenado en su SNC aversión o agrado a sabores, olores y alimentos, lo cual, les ha permitido rechazar sustancias o alimentos que pueda envenenarlos, así como, reforzar el consumo de sustancias que improbablemente puedan tener efectos nocivos, p. ej., justo cuando se desarrollan las papilas gustativas, las ratas muestran de forma natural aversión a sabores amargos y ácidos, como el de la quinina y el ácido clorhídrico, mientras que, se genera una preferencia a sustancias dulces o saladas a ciertas concentraciones<sup>17</sup>. Ciertamente este sistema de conducta instintiva permite rechazar alimentos putrefactos o con olores y sabores desagradables (muchas toxinas en la naturaleza presentan sabores amargos), sin embargo, existe el problema de cómo rechazar sustancias que presentan sabor y olor agradable, pero, que resultan ser muy tóxicas para el organismo. Posiblemente este problema fue resuelto cuando aparecieron y se seleccionaron organismos con un potencial para aprender a asociar cualquier comida o sustancia ingerida, con sus consecuencias, de tal forma que pueda existir la capacidad plástica del SNC para modificar la preferencia hacia ciertos sabores agradables y convertirlos en aversivos<sup>62</sup>. A este potencial para aprender aversión a los sabores se le ha dedicado casi 20 años de investigación científica<sup>20</sup>, durante los cuales, se ha realizado un extenso trabajo en la búsqueda y el entendimiento de las estructuras neuronales que participan en la formación de la memoria del CAS<sup>79</sup>.

### *Estructuras Involucradas en el CAS.*

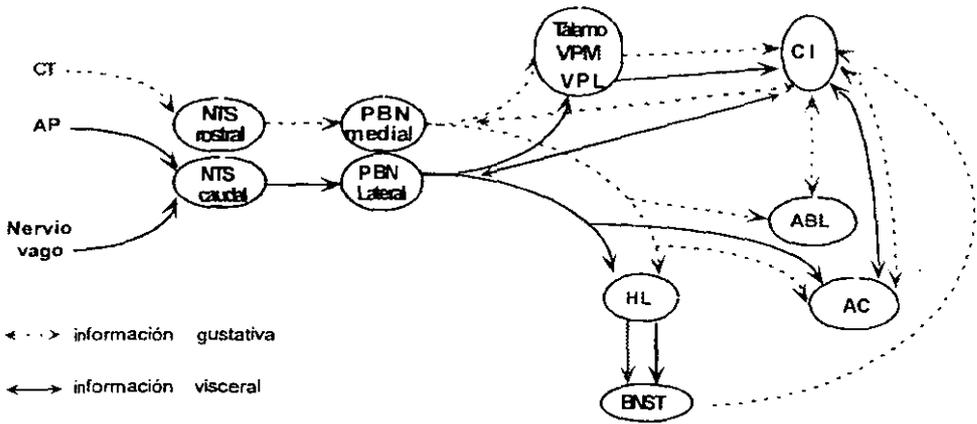
#### *Vías de procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales.*

El condicionamiento aversivo a los sabores utiliza únicamente dos estímulos, uno de ellos es gustativo generalmente sacarina y el otro es malestar gástrico, normalmente

inducido con LiCl. Cuando las moléculas de sacarina estimulan las papilas fungiformes de la parte anterior de la lengua, se genera un potencial de acción que es conducido por el nervio VII, también conocido como Corda Timpani (CT), hasta el Núcleo del Tracto Solitario rostral (NTS rostral)<sup>45</sup>, posteriormente, la información es enviada a las células del Núcleo del Parabraquial medial (PBN medial), el parabraquial presenta comunicación directa con la Corteza Insular (CI).<sup>47</sup> Adicionalmente, en este núcleo se presenta una bifurcación, en donde, la información gustativa, asciende y desciende. La vía ascendente se dirige al tálamo Ventroposteromedial (VPM), de donde se proyecta a la CI. La vía descendente se dirige hacia diversas estructuras del cerebro basal como el hipocampo, substancia innominata y al hipotálamo lateral (HL) que proyecta al núcleo de la base estria terminalis (BNST), el cual a su vez, se encuentra comunicado con la CI. Otra proyección del parabraquial es la que se dirige a la Amígdala Central (AC) y a la Amígdala Basolateral (ABL), ambas estructuras envían la información gustativa a la CI<sup>20</sup> (ver esquema 2)

Por otra parte, el estímulo visceral LiCl *i p* presenta básicamente dos formas de llegar al Núcleo del Tracto Solitario caudal (NTS caudal), la primera de ellas es por medio del nervio vago, el cual enerva entre otros órganos al tracto gastrointestinal, cuando el nervio vago detecta alguna molécula de LiCl en el peritoneo, éste envía una señal al Núcleo del NTS caudal. La segunda forma, utiliza el torrente sanguíneo, si alguna molécula de LiCl es incorporada en sangre, el Area Postrema (AP) la detecta ya que actúa como quimiorreceptor que desencadena el reflejo del vómito en humanos (las ratas no presentan este reflejo). El AP es una derivación de las células del NTS<sup>60</sup> por lo que, la información visceral llega al NTS caudal y de ahí la información visceral es mandada al Núcleo Parabraquial lateral (PBN lateral), en este núcleo se presenta una bifurcación, en donde, la información visceral

asciende y desciende (al igual que la gustativa), la vía ascendente se dirige al núcleo del tálamo ventroposterolateral (VPL), de donde se proyecta a la CI. La vía descendente visceral (al igual que la gustativa) se dirige hacia diversas estructuras del cerebro basal como el hipocampo, substancia innominata y al hipotálamo lateral (HL) que proyecta al núcleo de la base estria terminalis (BNST), el cual a su vez, se encuentra comunicado con la CI. Otra proyección de esta vía es la que se dirige a la amígdala, la información visceral llega a la Amígdala Central, de donde se envía la información visceral a la CI<sup>20</sup> (ver esquema 2). Como se observa la CI recibe aferencias de prácticamente todas las estructuras involucradas en el procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales.



Esquema 2.- Muestra las principales vías de procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales. Corda Timpani (CT), Área Postrema (AP), Núcleo del Tracto Solitario rostral (NTS rostral) y caudal (NTS caudal). Núcleo del Parabraquial Lateral (PBN lateral) y medial (PBN medial). Tálamo Ventroposteromedial (VPM) y Núcleo del Tálamo ventroposterolateral (VPL). Corteza Insular (CI). Hipotálamo Lateral (HL). Bed Núcleo de la Estria Terminalis (BNST). Amígdala Central (AC) Amígdala Basolateral (ABL).

Quando estimulaban eléctricamente esta área en humanos, generalmente sus pacientes mostraban patrones de ingesta de alimentos, como masticación y salivación

Penfield and Faulk<sup>64</sup>

### *Corteza Insular (CI)*

La insula, también llamada corteza visceral o corteza gustativa, es una región heterogénea de la archicorteza que procesa todas las modalidades sensoriales. Se encuentra conformada por su región anterior agranular (allocortical), su parte posterior granular (isocortex) y medial disgranular. La insula anterior se encuentra mayormente involucrada en el aprendizaje del CAS, la cual, procesa información visceral y autonómica<sup>31</sup>, así como olfativa y en especial gustativa, pues se ha demostrado que las células de esta corteza incrementan sus patrones de disparo tras estimular la lengua con algún sabor<sup>20</sup>. La CI se encuentra comunicada básicamente con todas las estructuras que procesan la información de los estímulos gustativos y viscerales utilizados para realizar el condicionamiento aversivo a los sabores, dentro de sus proyecciones y aferencias más importantes se encuentra la comunicación con el sistema límbico, a través, de la amígdala<sup>33: 78</sup>, además de que recibe comunicación del NTS, PBN y Tálamo<sup>47</sup>.

Los primeros experimentos en los que se relaciona a la CI en procesos cognitivos que involucran estímulos gustativos comenzaron a principios de los 70's<sup>18</sup>, desde entonces se ha demostrado que lesiones electrolíticas<sup>17: 65</sup>, inactivación temporal de canales de sodio con Tetradotoxina (TTX)<sup>36</sup>, lesiones excitotóxicas con N-metil-D-aspartato (NMDA)<sup>11</sup>, aplicación de antagonistas de receptores muscarínicos<sup>39</sup>, así como, microinyecciones de antagonistas de

receptores tipo NMDA<sup>41</sup> en CI deteriora la adquisición del CAS, estos datos indican el fuerte papel que desempeña la integridad anatómica y funcional de la CI para que los animales continúen aprendiendo el CAS. Otra estructura que ha sido involucrada en el aprendizaje del CAS es la Amígdala, la cual, juega un papel muy importante en la expresión de las emociones.

Grandes lesiones de la amígdala, incrementan el número de contactos que una rata puede hacer con un gato sedado, de hecho, algunos animales se montan sobre el gato y le morderían su oreja, conducta no mostrada en animales no lesionados

The amygdala p284

### *Amígdala*

En 1923 J.B. Johnston introduce la clasificación de la amígdala más ampliamente utilizada, él propuso que la amígdala está dividida en un grupo primitivo de núcleos asociados con el sistema olfatorio (núcleos central, medial y cortical) y un grupo filogenéticamente nuevo (núcleo lateral y basal). Actualmente se considera a la amígdala como una región heterogénea tanto funcional como estructural, conformada por una expansión ventromedial del estriado (núcleos central, medial y anterior), otra parte caudal, formada por las cortezas olfativas (núcleo del tracto lateral olfativa, postpiriforme y piriforme amigdalares) y una tercera área que es una extensión ventromedial del claustrum (lateral, basal y núcleos posteriores)<sup>68</sup>. La amígdala central, proyecta al núcleo dorsal motor del nervio vago, al NTS, al PBN y al HL, por otra parte, recibe un amplio rango de información

sensorial que desciende de vías corticales (corteza insular) e información ascendente del puente y del tálamo<sup>12</sup>. La amígdala lateral y basolateral tienen conexiones bidireccionales con el sistema olfativo, con la región prefrontal y con la corteza insular agranular<sup>55</sup>

Los estudios de lesión de la amígdala y de sus subnúcleos han resultado ser en cierto grado contradictorios<sup>12</sup>, p. ej., cuando se lesiona al complejo amígdalino (a todos los núcleos de la amígdala) electrolíticamente o con bloqueadores temporales de canales de sodio (con TTX)<sup>36, 41</sup>, se afecta el aprendizaje del CAS, no obstante, estas técnicas afectan el funcionamiento de casi todos los subnúcleos de la amígdala, además de destruir o bloquear (respectivamente) las fibras de paso que van del núcleo parabraquial a CI, de igual forma, cuando se lesiona con la excitotoxina, ácido iboténico, exclusivamente en el núcleo de la amígdala basolateral (ABL) se afecta el aprendizaje del CAS<sup>11:27</sup>, sin embargo, también se ha reportado que lesiones de este mismo núcleo (ABL) con otra excitotoxina (NMDA) no deteriora el aprendizaje de esta tarea<sup>55</sup>, hasta el momento no existe una explicación convincente que nos ayude a entender este resultado, además, de que se han utilizado concentraciones y coordenadas de lesiones diferentes. Desde mi punto de vista, este efecto diferencial entre el ácido iboténico y NMDA puede depender en la extensión de la lesión, p. ej., la microinyección de NMDA produce una lesión muy delimitada en los confines de la ABL, que se circunscribe a la región de la microinyección y no lesiona a la ABL en toda su extensión, en algunos casos se llega a formar una cavidad<sup>11:39</sup>. Por otra parte, la lesión con ácido iboténico no induce una lesión tan marcada y delimitada, pero se logra lesionar un 90% a la ABL en casi toda su extensión<sup>55</sup>.

Como se puede observar, el papel de la ABL en la adquisición del CAS resulta hasta la fecha muy controversial, quedando aun por determinar su verdadero nivel de

participación en los procesos de asociación de estímulos gustativos con sus consecuencias gástricas.

Por otra parte, cuando se lesiona el núcleo central de la amígdala (Adyacente a ABL ver esquema 3) con ácido iboténico, no se altera el aprendizaje del CAS<sup>55</sup>.

### *Núcleo Basal Magnocelular (NBM)*

La primera descripción exacta del ganglio basal de Meynert, fue hecha por A. Von Kölliker (1896) quien la denominó así en honor a su descubridor<sup>73</sup>. El ganglio basal de Meynert se encuentra dentro de la sustancia innominata de Reichert, un área localizada dentro de la región sublenticular. Desde los primeros estudios se identificó la existencia de proyecciones corticopetales originadas en unas neuronas muy grandes que se encuentran dentro de la sustancia innominata<sup>46</sup>. Posteriormente se descubrió que esta proyección contiene principalmente acetilcolina (ACh)<sup>67</sup>, aunque, neuronas no colinérgicas también existen dentro de este núcleo y pueden proyectar a la corteza o al ganglio contralateral<sup>31</sup>.

La estructura homóloga en rata del ganglio basal de Meynert es el Núcleo Basal Magnocelular (NBM), éste contiene grandes neuronas colinérgicas (20-30  $\mu\text{m}$ ) que se encuentran difusamente distribuidas a través del pallidum ventral y la sustancia innominata<sup>73</sup>. Estas neuronas proveen de acetilcolina al manto neocortical<sup>66</sup> y a la amígdala<sup>43; 77</sup>.

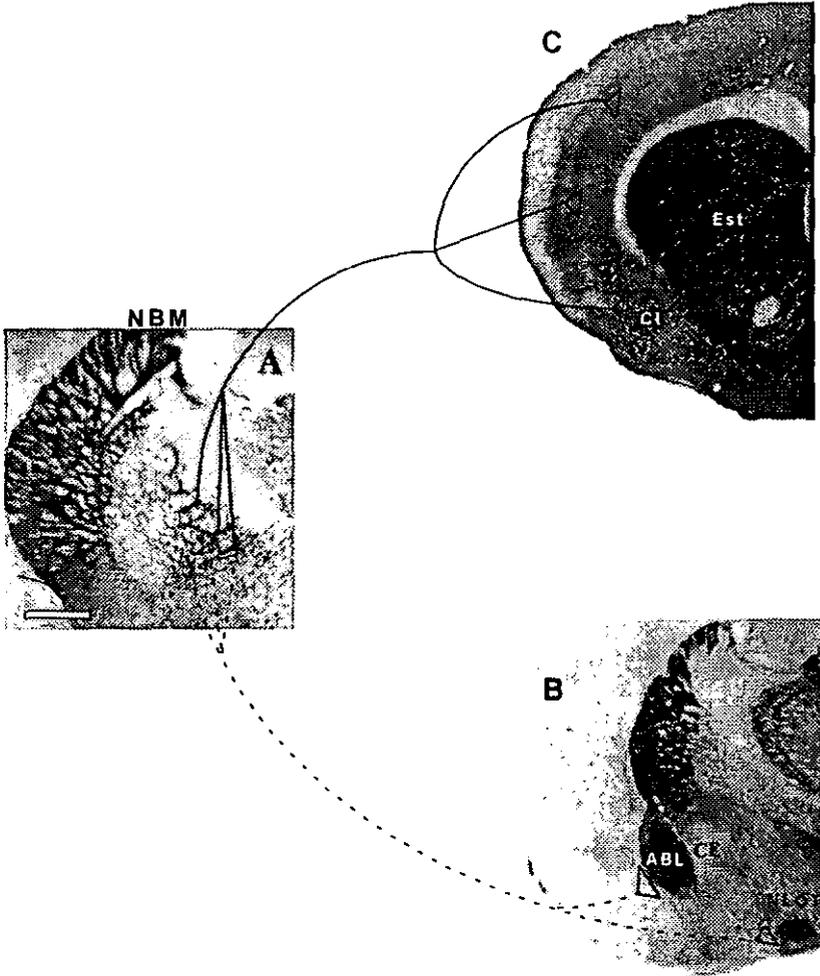
En el NBM se localizan dos poblaciones de células colinérgicas unas contienen el receptor de baja afinidad p75 de NGF (positivo-P75 NGFr)<sup>44</sup> y otras no lo presentan

(negativo-P75 NGFr)<sup>43</sup>, las primeras se dirigen a la corteza formando la vía colinérgica NBM-Corteza<sup>66</sup> y las segundas se dirigen a la amígdala basolateral formando la vía colinérgica NBM-ABL<sup>43, 77</sup> (ver esquema 3).

Existen diversos trabajos que han relacionado a esta estructura con el aprendizaje del CAS, p. ej., se ha reportado que lesiones del NBM con ácido quiscúlico<sup>49</sup> o el bloqueo temporal de canales de sodio por medio de microinyecciones de TTX<sup>53</sup> deteriora fuertemente el aprendizaje de esta tarea.

El interés en el NBM aumentó cuando se correlacionó la disminución en cantidad y actividad de marcadores colinérgicos en la corteza (ChAT enzima de síntesis, AChE enzima de hidrólisis de acetilcolina) y el deterioro mnemónico que presentaban personas con la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente un gran número de investigaciones realizadas en ratas se enfocaron en deteriorar el aprendizaje de diversas tareas por medio de tratamientos con anticolinérgicos (escopolamina) y en revertir el deterioro con fármacos que incrementan el nivel de ACh (Fisostigmina)<sup>6, 58</sup>. Todo esto involucró a las células colinérgicas como posibles responsables de algunos de los deterioros cognitivos asociados con la edad y la enfermedad de Alzheimer<sup>6, 22, 61</sup>.

Es conocido que sujetos mayores de 65 años presentan mayor riesgo de sufrir Alzheimer o algún otro tipo de demencia senil. El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que deteriora las capacidades cognitivas en especial las mnemónicas, altera componentes del lenguaje<sup>1</sup> y genera deficiencias en procesos atencivos<sup>31, 56, 73</sup>. Esta enfermedad ha estimulado a un gran número de investigadores que han intentado entender cuáles son los procesos bioquímicos que sustentan el aprendizaje y la memoria.



Esquema 3. Muestra cortes coronales de cerebros de rata con histoquímica para colinesterasa (enzima que degrada ACh), entre más oscuro sea el tejido mayor cantidad de colinesterasa, lo cual significa que en ese lugar puede existir actividad colinérgica.

En A,B y C se muestran las dos principales proyecciones colinérgicas del NBM, la primera de ellas, se origina en neuronas colinérgicas que presentan el receptor de NGF (positivas NGFr), principalmente proyectan sus axones al manto cortical (línea continua). La segunda proyección (línea punteada) parte de neuronas colinérgicas que no presentan el receptor de baja afinidad de NGF (negativas-NGFr), sus axones pasan a través de la estria terminalis cruzando por la amígdala central (CE), hasta llegar al núcleo Basolateral (ABL) y al Tracto Olfatorio del Núcleo Lateral (NLOT), figura B.

En la figura C se muestra la Corteza Insular (CI) y el estriado (Est.), éste último presenta una gran cantidad de actividad colinérgica independiente del NBM, es decir, el estriado tiene interneuronas colinérgicas que producen su propia ACh.

En este intento lo primero que se hizo fue averiguar qué estructuras del SNC y que moléculas se encuentran alteradas en pacientes con esta enfermedad, con respecto a sujetos sanos de la misma edad. Lo que se ha encontrado, desde que Alois Alzheimer reportó el análisis post-mortem del cerebro de una mujer que presentaba pérdida de la memoria ha sido, la formación de depósitos de proteína  $\beta$  amiloide<sup>42</sup> y degeneración de los somas del complejo del cerebro basal anterior<sup>6</sup>, en donde, se localiza el NBM, muy probablemente a consecuencia de la destrucción de este núcleo los pacientes con Alzheimer presentan disminución cortical de marcadores colinérgicos<sup>22</sup>, recientemente se demostró que existe una disminución en la expresión de mRNA de colin acetiltransferasa (ChAT, enzima de síntesis de ACh) en corteza de pacientes con Alzheimer<sup>56</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que animales viejos presentan menor actividad de ChAT y mayores problemas para realizar ciertos paradigmas conductuales. Todos estos datos dieron origen a la hipótesis colinérgica, la cual, involucra a la ACh en procesos de aprendizaje y memoria<sup>6</sup>.

Se han realizado intentos para curar esta enfermedad por medio de microinyecciones de neurotrofinas (factores de supervivencia neural) que en cierto grado revierten la atrofia de células colinérgicas, estos intentos, han sido motivados principalmente por investigaciones en donde se muestra que la aplicación de neurotrofinas como el Factor de Crecimiento Neural (NGF) revierte el deterioro en células colinérgicas y puede mejorar la memoria de ratas viejas<sup>32</sup>, p. ej., en un estudio<sup>4</sup>, en donde le implantaron a una mujer que presentaba Alzheimer una bomba osmótica, que le inyectó NGF intracerebroventricular, durante tres meses, al término del tratamiento, la paciente mejoró significativamente su ejecución en la capacidad de memoria episódica verbal, por lo cual, los autores concluyeron, que este tipo de tratamiento podría ser una alternativa viable para mejorar a estos pacientes. Habría que aclarar que no se

encontró mejora alguna en memoria espacial, reconocimiento de rostros, evocación a largo y corto plazo, y en la repetición de series de números hacia delante y hacia atrás. En un trabajo más reciente<sup>30</sup> utilizando el mismo protocolo del experimento anterior en tres pacientes con Alzheimer, no encontraron mejora visible en ningún proceso cognitivo mencionado antes.

### ***Distribución Colinérgica***

Existe un acuerdo general, sobre la existencia de dos grandes grupos de neuronas colinérgicas en el cerebro. El primero de ellos es el cerebro basal anterior (CBF) que está conformado por el núcleo del septum medial (MS), núcleo límbico de la banda diagonal de Broca vertical (vdB) y horizontal (hdB) y el Núcleo basal Magnocelular (NBM), también llamado núcleo basal de Meynert (nbM) en humanos. El segundo grupo de células colinérgicas, se encuentra en el puente del tronco encefálico, específicamente en la región pedúnculo pontina tegmental (PPTg) y en el tegmento laterodorsal pontino<sup>31</sup>.

Las neuronas colinérgicas del NBM proyectan a la amígdala basolateral (ABL) y enervan con acetilcolina a casi toda la corteza en especial a la corteza piriforme y Corteza Insular (CI)<sup>43</sup>, mientras que las neuronas colinérgicas del puente enervan principalmente al tálamo.

### ***Desarrollo de técnicas específicas para lesionar células colinérgicas del NBM.***

Como ya mencionamos antes, la destrucción del NBM ha resultado en un modelo animal ampliamente utilizado para estudiar la pérdida de funciones cognitivas y para entender el papel de esta estructura en la enfermedad de Alzheimer<sup>28, 31, 57</sup>

Una de las primeras técnicas utilizadas para lesionar al NBM, fue la aplicación de un pulso de corriente, lo que resulta en una lesión electrolítica que destruye inespecíficamente todo el tejido cercano a la corriente eléctrica. Esta lesión genera un fuerte deterioro en diversas de tareas, sin embargo, las neuronas colinérgicas del NBM se encuentran entremezcladas con células corticopetales no colinérgicas<sup>31</sup> y fibras de paso, por lo que, no podemos saber con toda certeza cual es el papel que desempeña el sistema colinérgico en el aprendizaje. Posteriormente se emplearon lesiones con aminoácidos excitadores (AAE) mejor conocidos como excitotoxinas (por ejemplo, alfa-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazol ácido propinico, ácido iboténico, ácido quisquálico, ácido quinolinico y NMDA) que son análogos del glutamato (neurotransmisor excitador del SNC por excelencia)<sup>61</sup>. Las lesiones excitotóxicas presentan la ventaja de no destruir fibras de paso<sup>34</sup>, pero, continúan siendo inespecíficas para lesionar a neuronas colinérgicas y por ende, inactivan a todas las neuronas que presentan receptores a glutamato, en algunos casos lesionan a estructuras adyacentes al NBM<sup>13, 57</sup>, p. ej., Se ha demostrado que inyecciones de ácido iboténico en el NBM genera un gran deterioro conductual, pero, a su vez, afecta a grupos celulares que no forman parte del NBM, como es el caso de la amígdala basolateral y de la formación reticular del tálamo<sup>31</sup>, mientras que la aplicación de ácido quisquálico, que no destruye estructuras adyacentes, no deteriora el aprendizaje de forma tan severa, a pesar de disminuir la actividad de ChAT cortical a niveles similares a los producidos por lesiones de ácido iboténico<sup>21</sup>. Esto ha llevado a algunos investigadores a concluir que el deterioro conductual observado tras lesiones con ciertas excitotoxinas especialmente ácido iboténico y NMDA no puede ser atribuido principalmente a la disminución en los niveles colinérgicos en corteza, si no mas bien, al daño producido en células no colinérgicas y/o a estructuras adyacentes<sup>21, 31, 57, 70</sup>. De acuerdo con lo anterior, cuando se utiliza alfa-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazol ácido propinico (AMPA)

para lesionar el NBM se consigue eliminar a células colinérgicas sin destruir estructuras adyacentes, lo mas sorprendente es que, no se observa un deterioro tan marcado en procesos de aprendizaje y memoria<sup>57</sup>, es decir, las excitotoxinas que dañan preferentemente la actividad colinérgica cortical y no afectan a estructuras neuronales adyacentes al NBM (como AMPA y ácido quiscuálico) no afectan el aprendizaje tan fuertemente, mientras que, las excitotoxinas que lesionan a estructuras adyacentes (NMDA, ácido iboténico) afectan el aprendizaje de forma severa en diversos paradigmas conductuales

Sin duda alguna la utilización de lesiones excitotóxicas resultó en un gran avance para el entendimiento del papel colinérgico del NBM, sin embargo, debido a su inespecificidad también lesionan a grupos neuronales no colinérgicos (interneuronas GABAérgicas), que probablemente puedan contribuir a la pérdida de procesos cognitivos<sup>31</sup>. Recientemente se desarrolló<sup>75</sup> una inmunotoxina llamada 192 IgG-saporina que es la unión de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de baja afinidad p75 del Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), con una toxina llamada saporina *officinalis* que irreversiblemente detiene la síntesis de proteínas, lo cual, resulta en muerte celular<sup>70, 72</sup>. Debido a que las células colinérgicas del complejo basal anterior (en donde se encuentra el NBM), son las únicas que presentan el receptor de baja afinidad p75, esta inmunotoxina resulta ser una poderosa herramienta para destruir selectivamente a grupos celulares colinérgicos de proyección cortical<sup>5; 25; 26; 39; 40; 48; 69; 72</sup>. Lo mas sorprendente de esta técnica es que a pesar de disminuir la actividad colinérgica en todo el manto cortical (a niveles nunca antes conseguidos por cualquier excitotoxina) consistentemente ha fallado para deteriorar el aprendizaje de prácticamente todos los paradigmas conductuales que miden aprendizaje y memoria. Dentro de las tareas conductuales que no se ven afectadas por la disminución de ACh cortical, se

encuentran Prevención Pasiva, laberinto T<sup>69</sup>, laberinto de 8 brazos<sup>25</sup>, Laberinto de Agua<sup>25</sup>, inhibición latente paradigma adaptado al CAS<sup>26</sup>, no obstante, que todas estas tareas se ven afectadas por lesiones excitotóxicas, como se muestra en la tabla 1.

*Tabla 1 muestra tareas afectadas por lesiones excitotóxicas e inmunotóxica.*

| Lesión NBM           | Selectividad colinérgica | Tareas afectadas  | Tareas no afectadas  |
|----------------------|--------------------------|---|--|
| <b>Excitotóxicas</b> |                          |   |  |
| Acido iboténico      | Muy baja                 | Laberinto de agua <sup>21, 28, 70, 71</sup> Laberinto Radial de 8 brazos, <sup>2, 28</sup> Laberinto radial de 16 brazos <sup>34</sup> Prevención pasiva y activa, laberinto en T (alternancia), igualación a la muestra demorada, discriminación temporal. <sup>28</sup> |  |
| NMDA                 | Muy baja                 | Laberinto de agua <sup>28</sup> , condicionamiento aversivo a los sabores, <sup>39, 40</sup> prevención pasiva y activa, laberinto en T (alternancia), igualación a la muestra demorada, discriminación temporal. <sup>28</sup>   |  |
| Acido quisquálico    | Mediana                  | Laberinto de agua <sup>21, 70</sup> , condicionamiento aversivo a los sabores, prevención pasiva <sup>69</sup> , laberinto radial de 8 brazos,  | Prevención pasiva <sup>69</sup>  |
| AMPA                 | Alta                     | Deterioro no tan severo de: laberinto de agua, <sup>70, 71</sup>  |  |
| <b>Inmunotoxina</b>  |                          |   |  |
| 192 IgG saporina     | Muy alta                 |   | Laberinto de agua, <sup>2, 8, 25, 69</sup> laberinto radial de 8 brazos <sup>25</sup> , laberinto en T (alternancia), <sup>69</sup> condicionamiento aversivo a los sabores, <sup>40</sup> tarea de igualación al lugar, <sup>8</sup> prevención pasiva. <sup>69</sup> |

## El Problema y la Justificación.

Como ya se ha mencionado, un gran número de trabajos utilizando lesiones excitotóxicas del NBM, principalmente NMDA y ácido iboténico, han puntualizado la participación de la proyección colinérgica que provee de ACh al manto cortical en procesos de aprendizaje y memoria. Lamentablemente esta técnica de lesión es inespecífica para células colinérgicas. Recientemente se<sup>75</sup> desarrolló una técnica de inmunolesión (192 IgG-

Saporina) extremadamente específica para destruir únicamente a las células colinérgicas que proyectan a corteza, interesantemente esta lesión consistentemente no deteriora ningún paradigma conductual de aprendizaje y memoria, afectado por las lesiones excitotóxicas.

En un intento para saber porqué sucede esta contradicción decidimos lesionar el NBM con estos dos tipos de lesión y basándonos en que el deterioro conductual inducido por la lesión excitotóxica del NBM se ha atribuido principalmente a la disminución en la actividad de marcadores colinérgicos en corteza, utilizamos el condicionamiento aversivo a los sabores, ya que es un paradigma que depende de la actividad de corteza insular<sup>11;17</sup>. Además de que se ha demostrado la participación del NBM en la formación del aprendizaje de esta tarea<sup>49;53</sup>.

## Experimento 1

Este experimento fue diseñado para estudiar el efecto conductual producido en el condicionamiento aversivo a los sabores, por dos tipos de lesión del NBM, una inespecífica (NMDA) y otra específica (192 IgG-saporina) para lesionar neuronas colinérgicas. Nosotros analizamos el nivel de destrucción de neuronas colinérgicas por medio de la disminución en la actividad de ChAT y de acetilcolinesterasa (AChE) tanto en CI como en la ABL, debido a que estas estructuras son dos de los principales centros de proyección colinérgica del NBM<sup>40; 43; 44; 77</sup>.

### ***Materiales y Métodos***

**Sujetos:** Se utilizaron 49 ratas de la cepa Wistar, entre 250-300 g., todas las ratas fueron separadas en cajas individuales y mantenidas en un ciclo de 12 hrs. luz/obscuridad, todas las manipulaciones fueron realizadas en la fase de luz.

**Procedimientos quirúrgicos:** los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (65 mg/kg.) y colocados en un aparato estereotáxico. Las lesiones fueron realizadas por medio de la inyección de toxinas con aguja dental de calibre 30, conectada a una tubería de teflón unida a una microjeringa de vidrio de 10  $\mu$ l montada en una bomba de microinyección. Para lesionar el NBM se utilizaron las siguientes coordenadas según Paxinos y Watson<sup>63</sup> a partir de Bregma: anteroposterior; -0.8 mm, lateral; 2.5 mm y dorso ventral; 8 mm. Se inyectó bilateralmente a una velocidad de 0.5  $\mu$ l/min, un volumen total de 0.8  $\mu$ l de 192 IgG-saporina por hemisferio (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l: Chemicon, Tamecula, CA) o de NMDA (10  $\mu$ g/l: Sigma St. Louis, MO) diluidos en Buffer Fosfato Salino (PBS). El inyector fue mantenido 3 min antes de retirarlo para permitir una adecuada difusión.

Los primeros 18 animales recibieron microinyección bilateral de 192 IgG-saporina intra-NBM (grupo Sap/NBM), otro grupo de 15 animales recibieron microinyección bilateral en el NBM de NMDA (grupo NMDA/NBM), por último un grupo de 16 animales permanecieron sin operar durante todo el experimento como control intacto (grupo Ctrl/I).

**Tabla 1. Muestra las manipulaciones realizadas a cada grupo.**

| <b>Grupo</b>           | <b>Forma de lesión del NBM</b>           | <b>Ensayo enzimático de ChAT</b> | <b>Histoquímica para AChE</b> |
|------------------------|--|----------------------------------|-------------------------------|
| <b>Ctrl/I (n=18)</b>   | <b>Ninguna</b>                           | <b>n=8</b>                       | <b>n=10</b>                   |
| <b>Sap/NBM (n=15)</b>  | <b>Inmunotóxica<br/>192 IgG-saporina</b> | <b>n=10</b>                      | <b>n=5</b>                    |
| <b>NMDA/NBM (n=16)</b> | <b>Excitotóxica<br/>NMDA</b>             | <b>n=7</b>                       | <b>n=9</b>                    |

**Procedimiento conductual:** dos semanas después de la cirugía, a todos los animales se les retiró el agua por 24 hrs., posteriormente se les registró su consumo de agua diariamente durante 15 min al día. Cuando consiguieron establecer un nivel asintótico de consumo de agua, se realizó el ensayo de **adquisición**, que consistió en la presentación de un sabor novedoso, el cual fue obtenido al diluir sacarina en agua (0.1%), los animales consumieron este sabor por 15 min y 15 min después se les indujo irritación gástrica por medio de inyección i.p. de LiCl 0.15 M (7.5 ml/Kg). En los dos días subsiguientes se les dió agua para que recuperaran el nivel asintótico de consumo. Al tercer día se realizó el ensayo de **prueba** que consistió en dar a beber por segunda ocasión sacarina. El porcentaje de consumo de sacarina en la prueba con respecto al consumo de agua en línea base, fue utilizado

como índice de aversión al sabor de tal forma, entre menor consumo de sacarina mayor aversión.

**Ensayo enzimático de ChAT:** Un día después de terminado el procedimiento conductual, se tomaron al azar a ratas de cada grupo para su posterior decapitación (Sap/NBM, n=10; NMDA/NBM, n=7; Ctrl/I, n=8). Con ayuda de un microscopio estereoscópico, se tomaron muestras de corteza insular, complejo amigdalino y estriado dorsal, las muestras de tejido fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis de actividad enzimática de Colina acetiltransferasa (ChAT). Se incluyeron muestras de tejido del estriado dorsal como control, debido a que es una estructura rica en acetilcolina independiente del sistema colinérgico basal.

Cada muestra fue sonicada en 1 ml. de buffer fosfatos 25 mM que contenía 0.5% Triton X-100, todas las muestras fueron mantenidas en hielo para evitar sobrecalentamiento. El homogenado resultante fue centrifugado a  $20,000\times g$  por 15 min. El ensayo enzimático fue realizado con 200  $\mu\text{l}$ . del sobrenadante y 50  $\mu\text{l}$ . de solución sustrato que contenía: 10 mM Colina clorada, 0.2 mM neostigmina, 20 mM EDTA y 0.4 mM de acetil coenzima A disuelto en PBS 0.1 M pH 7.4. El sobrenadante y la solución sustrato fue mezclada e incubada por 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . La reacción fue detenida al agregar 10  $\mu\text{l}$ . de ácido perclórico 1 M y 1 ml. de agua destilada. Posteriormente fue filtrado con un filtro ultraspin 30.000 MW (Cole-Parmer) y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis cromatográfico.

**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** A las muestras anteriores, se les midió el nivel de ACh utilizando HPLC con detección electroquímica. Se utilizó una fase móvil pH 8.5 que contenía PBS 50 mM y 0.5% de bactericida regente Kathon (BAS). Todas las muestras fueron inyectadas en una columna poliédrica de fase reversa (BAS ACh-Choline

assay Kit), en un reactor post columna que contenía acetilcolinesterasa inmovilizada y colina oxidasa (BAS) la ACh y la colina fueron convertidas en peróxido de hidrógeno y betaina. Un reactor de colina catalasa-oxidasa (BAS) fue adherido para evitar detección de colina en la solución de sustrato. El peróxido de hidrógeno fue detectado electroquímicamente con un electrodo de platino de 500 mV (Us Ag/AgCl). El límite de detección (definido como el monto de ACh que produce un doble pico detectable del nivel de ruido base) fue de 0.2 pmol.

**Histología:** Inmediatamente después de terminado el procedimiento conductual, se seleccionó cierto número de animales (ver tabla 1) de cada uno de los grupos, se les aplicó una sobredosis de pentobarbital (1 ml.) y posteriormente fueron perfundidos por medio intra-arterial con 100 ml. de solución salina (9 g/l) y 100 ml. de fijador (paraformaldehído 4%, 4 ml. glutaraldehído al 25%, aforado a un litro de buffer fosfato 0.1 M). Sus cerebros fueron retirados y almacenados en glucosa 30%. Se obtuvieron cortes coronales de 40  $\mu$ m para su tinción en histoquímica para acetilcolinesterasa (AChE, enzima de hidrólisis de ACh) de acuerdo con el protocolo modificado de Paxinos y Watson {Paxinos & Watson 1986 ID: 31}. Brevemente, los cortes se incuban durante toda una noche en 50 mM de Buffer de acetato de sodio pH 5.0, 4 mM de sulfato cúprico, 16 mM de glicina, 4 mM acetilcolina yodada y 0.1 mM etopropazina. Acabada la incubación, los cortes se sumergen dentro de la solución reveladora (1% sulfato de sodio pH 7.5) durante 10 min.

### ***Resultados experimento 1***

**Condicionamiento aversivo a los sabores:** Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA simple para comparar el consumo de líquidos entre grupos. Para el análisis Post-hoc se usó la prueba de Fisher. No se encontraron diferencias en el consumo de agua

durante la fase de línea base entre grupos ( $F(2,46)=0.325$ ;  $p>0.05$ ) La media del consumo de línea base fue de: (en ml.)  $15.08\pm0.64$ ,  $15.74\pm0.85$  y  $14.95\pm1.13$  Ctrl/I, Sap/NBM, NMDA/NBM, respectivamente. Como se muestra en la figura 1 (barras blancas), no existen diferencias significativas entre grupos en el porcentaje de consumo de sacarina durante el ensayo de adquisición con respecto a la línea base de cada animal. ( $F(2,46)=0.24$ ,  $p>0.05$ )

En la fase de prueba (segunda presentación de sacarina) diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas entre grupos ( $F(2,46)=43.94$ ;  $p<0.01$ ). El análisis post-hoc con la prueba de Fisher mostró diferencias estadísticamente significativas únicamente en el grupo lesionado con la excitotoxina NMDA (valor  $p<0.01$ ), es decir la lesión del NBM con NMDA fue la única que evita que los animales aprendan el CAS. El grupo inmunolesionado con 192 IgG-saporina no deterioró la aversión al sabor comparado con el grupo control (Ctrl/I). (ver figura 1)

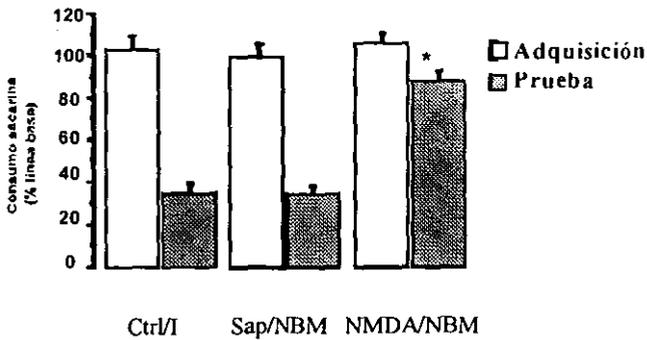


Figura.-1 Se muestra la media  $\pm$  S.E.M. en el ensayo de adquisición (barras blancas) y en la fase de prueba (barras sombreadas) de los grupos Ctrl/I= control intacto, Sap/NBM= lesión inmunotóxica del NBM con 192 IgG saporina, NMDA/NBM= lesión excitotóxica del NBM con NMDA. En la fase de prueba entre menor porcentaje de consumo de sacarina mayor aversión. \*Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.01$ ) con respecto al grupo Ctrl/I y Sap/NBM.

**Actividad enzimática de ChAT:** Se utilizaron las mismas pruebas estadísticas anteriormente mencionadas para analizar la actividad de ChAT. En la figura 2A, se observa una fuerte disminución en la actividad de ChAT de corteza insular, inducida por la lesión del NBM con 192 IgG saporina y con NMDA, con respecto al grupo control intacto ( $F(2,22)=18.46$ ;  $p<0.01$ ). Sin embargo, la reducción en la actividad enzimática fue más evidente en el grupo con inmunolesión (ver fig.2A, Sap/NBM). La media de acetilcolina producida por ChAT cortical fue de: ( en pMol/min/mg de proteína)  $123\pm17$ ,  $17\pm4$ ,  $55\pm6.45$  en los grupos Ctrl/I, Sap/NBM y NMDA/NBM respectivamente. El análisis post hoc mostró diferencias estadísticamente significativas de ambos grupos lesionados comparados con el control intacto (valor  $p<0.01$ ). Adicionalmente, fueron encontradas diferencias significativas entre el grupo Sap/NBM y NMDA/NBM (ver fig.2A) (valor  $p<0.05$ ), lo que indica que la lesión del NBM con 192 IgG saporina afecta de forma más severa la actividad de ChAT en corteza insular con respecto a la lesión con NMDA.

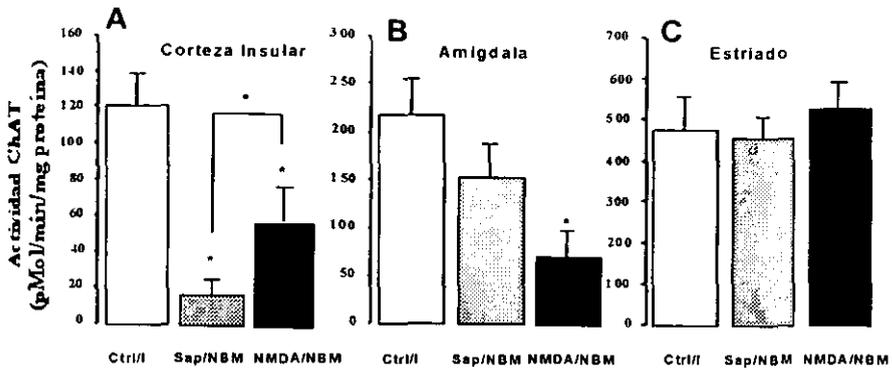


Figura 2.- muestra la media  $\pm$  S.E.M. de acetilcolina (pMol/min/mg de proteína) producida por la enzima ChAT, que se extrajo de la corteza insular, amígdala y estriado dorsal, de cada uno de los siguientes grupos: Ctrl/I= control intacto no recibió lesión, Sap/NBM= lesión inmunotóxica del NBM por medio de 192 IgG saporina, NMDA/NBM= lesión excitotóxica del NBM por medio de NMDA. Las ratas fueron lesionadas en el NBM porque son las únicas neuronas que proveen de Ach a toda la corteza (en especial a corteza insular) y a la amígdala. Se tomó como control positivo al estriado dorsal debido a que su actividad colinérgica es independiente del NBM. \* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) con respecto al grupo Ctrl/I, ° ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo NMDA/NBM.

Por otra parte, en el complejo amigdalino se observa un patrón inverso de disminución en la actividad de ChAT (ver fig.2B). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $F(2,22)=6.36$ ;  $p < 0.01$ ). La media de acetilcolina producida por ChAT amigdalina fue de: (en pMol/min/mg de proteína)  $219 \pm 38$ ,  $153 \pm 30$ ,  $70 \pm 26$  en los grupos Ctrl/I, Sap/NBM y NMDA/NBM respectivamente. La prueba post hoc de Fisher mostró disminución significativa (valor  $p < 0.01$ ) solamente en la actividad enzimática del grupo con lesión excitotóxica (NMDA/NBM). Esto indica que solo este tipo de lesión disminuye la actividad de ChAT en el complejo amigdalino, por otra parte, no se encontró reducción significativa en el grupo Sap/NBM (ver fig.2B).

En el estriado dorsal no se encontró ningún efecto con ninguno de los tratamientos ( $F(2,22)= 0.38$ ;  $p>0.05$ ), la media de acetilcolina producida por ChAT amigdalina fue de: (en  $\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína)  $480\pm 78$ ,  $455\pm 49$ ,  $533\pm 62$  en los grupos Ctrl/I, Sap/NBM y NMDA/NBM respectivamente.

**Confirmación de la lesión:** La extensión y localización de la lesión colinérgica en los tres grupos fue confirmado por medio de la histoquímica para AChE (enzima de hidrólisis de ACh). En la figura 3 se muestra la tinción de fibras que contienen AChE (enzima que degrada ACh) en corteza insular del control intacto (fig.3 A), con inyección intra-NBM de 192 IgG-saporina (fig.3 B) e inyección intra-NBM de NMDA (Fig.3 C). Obsérvese la diferencia en la cantidad de AChE teñida con ambos grupos lesionados, con respecto, al control intacto.

Por otra parte en el complejo amigdalino, específicamente en el núcleo de la ABL, se puede observar que la lesión con NMDA del NBM, fue la única que afectó la actividad de AChE en la amígdala (fig.3F).

### *Conclusión experimento 1*

La lesión del NBM con la excitotoxina NMDA pero, no con la inmunotoxina 192 IgG-Saporina afecta la capacidad de un organismo para discriminar y rechazar un sabor apareado con malestar gástrico. Una serie de investigaciones han puntualizado el fuerte deterioro conductual inducido por la lesión del NBM por medio del NMDA en el aprendizaje de diversas tareas<sup>21; 28; 29; 58; 70</sup>. El efecto del NMDA en el aprendizaje se ha atribuido principalmente a la destrucción de somas colinérgicas que presentan proyecciones corticopetales, por ende, a la disminución de ACh cortical. Basándonos en esta explicación

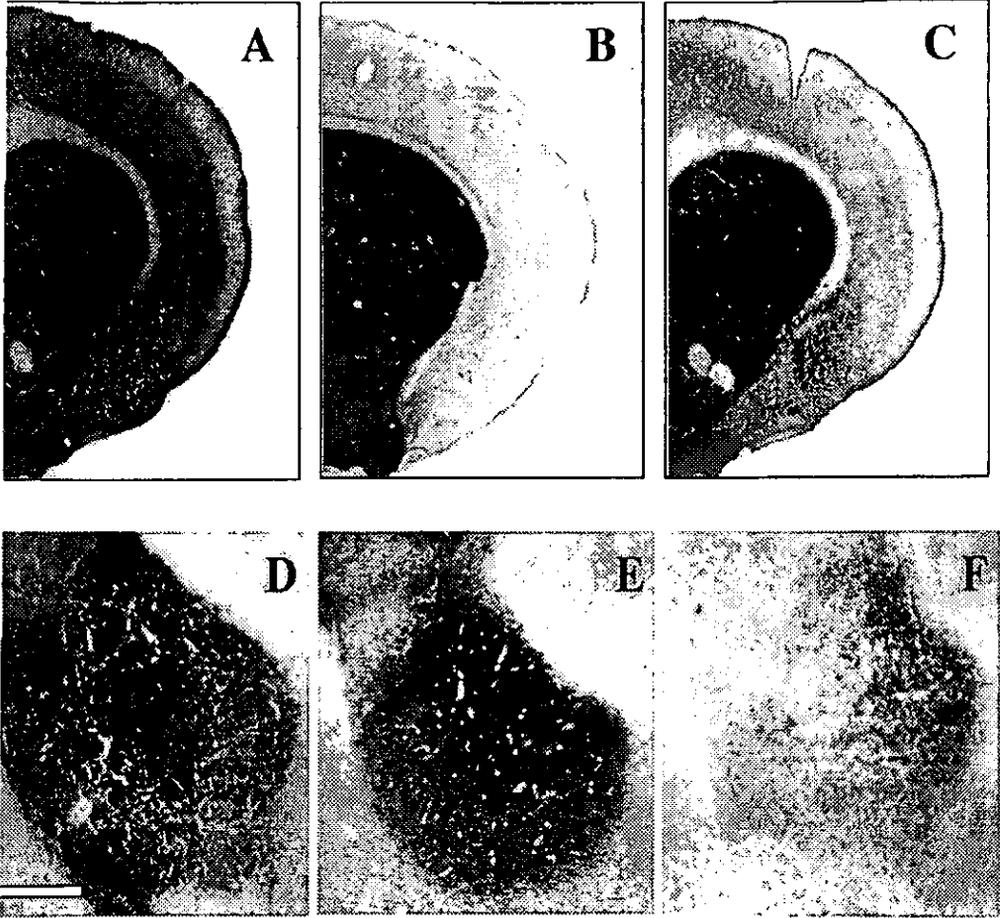


Figura 3. Se muestran cortes coronales representativos con histoquímica para acetilcolinesterasa (AChE) de corteza (A-C) y amígdala basolateral (D-F). De los grupos control intacto {Ctl/I (A,D)}, lesión inmunotóxica del NBM con 192 IgG saporina {Sap/NBM (B, E)} y lesión excitotóxica del NBM con NMDA, {NMDA/NBM (C,F)}. Se puede observar que el grupo Sap/NBM presentó mayor disminución de AChE en corteza (B). Mientras que, el grupo NMDA/NBM presentó mayor disminución en la tinción en la amígdala basolateral. (F)

nosotros encontramos que la destrucción de la actividad colinérgica cortical no explica por completo el deterioro conductual inducido por el NMDA.

El análisis de la actividad enzimática, demostró que lesiones del NBM con NMDA disminuyen la actividad de ChAT (enzima de síntesis de ACh) en la CI, en un 55% con respecto a ratas no lesionadas. Por otra parte, la inmunotoxina 192IgG-saporina reduce la actividad de ChAT en la CI en un 86% no obstante los efectos conductuales esperados no fueron evidentes.

El nivel de tinción en corteza de AChE (enzima de hidrólisis de ACh) en toda la corteza cerebral, se afecta de forma similar al de ChAT, es decir, la inmunotoxina disminuye mayor cantidad de esta enzima con respecto a la reducción inducida por la excitotoxina. Recientemente reportamos que la misma dosis de 192 IgG-saporina inyectada en las mismas coordenadas utilizadas en este experimento, reduce un 97% la liberación de ACh inducida por la aplicación de un pulso de alto potasio (KCl, 56 mM) en corteza insular, mientras que la lesión con NMDA disminuye un marginal 26% de liberación, recolectada por microdiálisis *in vivo* y medida con HPLC<sup>40</sup>.

Todos estos datos indican que una rata puede aprender el condicionamiento aversivo a los sabores, con niveles reducidos de AChE, sin el 86% de actividad de ChAT y sin el 97% de liberación de ACh cortical. La conclusión mas obvia de estos resultados es: Contrario a lo propuesto anteriormente<sup>21; 29; 58; 70</sup>, el deterioro conductual inducido por medio de la microinyección de NMDA no puede ser atribuido principalmente a la disminución del sistema colinérgico a nivel cortical.

Lo anterior se puede observar en la figura 4, en donde, se muestra la cantidad de aprendizaje de cada uno de los tres grupos utilizados en este experimento, con la cantidad de

ACh producida por la enzima ChAT extraída de corteza insular de cada grupo de animales, se puede ver que el grupo con lesión del NBM con 192 IgG saporina presenta la misma aversión al sabor que el control intacto (barras sombreadas), a pesar de que es el grupo con menor cantidad de actividad colinérgica en corteza insular (barras blancas).

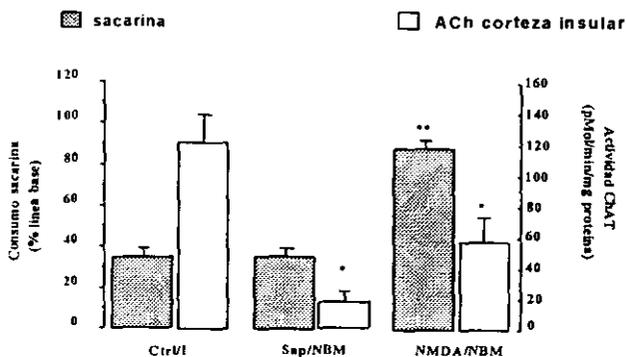


Figura 4.- En la ordenada izquierda se muestra la media  $\pm$  S.E.M. del porcentaje de consumo de sacarina en la fase de prueba del condicionamiento aversivo a los sabores (barras sombreadas). En la ordenada derecha se grafica la actividad enzimática de ChAT en pMol/min/mg de proteína, las barras blancas muestran la cantidad de acetilcolina (ACh) producida por la enzima ChAT extraída de la corteza insular de los siguientes grupos: Ctrl/I= control intacto, Sap/NBM= inmunolesión del NBM por medio de 192 IgG saporina, NMDA/NBM= lesión excitotóxica del NBM por medio de NMDA. \*\*Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) con respecto a valores del grupo Ctrl/I y Sap/NBM (Barras sombreadas).

\*Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a valores del grupo Ctrl/I (barras blancas).

Si el efecto conductual inducido por la excitotoxina NMDA no se debe principalmente a la disminución de marcadores colinérgicos en corteza, entonces, ¿por qué la lesión con NMDA deteriora el aprendizaje del CAS?. Nuestros datos indican que la lesión con NMDA fue la única que lesionó a las dos proyecciones colinérgicas del NBM (NBM-

corteza y NBM-ABL) y probablemente, porque disminuye la actividad colinérgica tanto en CI como en la ABL (ver fig. 3) se afectó el aprendizaje del CAS. Por lo que, se diseñó un experimento para estudiar el papel de las proyecciones colinérgicas del NBM en la formación del aprendizaje del CAS.

## Experimento 2

### **¿Cuál es el papel de las proyecciones colinérgicas del NBM en el aprendizaje del CAS?**

El NBM se encuentra conformado principalmente por dos grupos celulares colinérgicos, el primero tiene la peculiaridad de contener el receptor de baja afinidad p75 de NGF (positivo p75-NGFr)<sup>43</sup> que principalmente proyecta a todo el manto cortical (proyección NBM-Corteza)<sup>66</sup>. El segundo grupo no presenta este receptor (negativo p75 NGFr)<sup>43</sup> y proyecta principalmente a la amígdala basolateral (proyección NBM-ABL)<sup>77</sup> (Ver esquema 3).

#### *¿La destrucción de la proyección colinérgica NBM-corteza afecta el aprendizaje del CAS?*

Los resultados del primer experimento demostraron que la proyección NBM-corteza se ve deaferentada al lesionar el NBM con NMDA ó con 192 IgG saporina. No obstante que este último decrementa mas severamente la actividad y cantidad de marcadores colinérgicos medidos en corteza insular, los animales con 192 IgG saporina continúan aprendiendo, mientras que los animales con NMDA, que presentan mayor actividad colinérgica residual, no aprenden el CAS. Con base en estos resultados, lo único que podemos afirmar sobre la participación de la proyección NBM-corteza en el aprendizaje del CAS es que las ratas pueden seguir aprendiendo el CAS a pesar de no tener

aproximadamente el 86% de actividad de la enzima ChAT y sin el 97 % de liberación de ACh en CI.

*¿La destrucción de la proyección colinérgica NBM-ABL afecta el aprendizaje del CAS?*

Debido a que no contamos con algún fármaco que deaferente exclusivamente a la proyección NBM-ABL, se pueden utilizar diversas formas para bloquear esta proyección, una posibilidad es utilizando excitotoxinas que deaferentan ambas proyecciones pero principalmente a la proyección NBM-ABL, como es el caso del ácido quinolinico<sup>57</sup>. Otra alternativa para bloquear esta proyección es lesionando a la amígdala más específicamente al núcleo de la ABL, porque es el núcleo de la amígdala que recibe la mayor cantidad de ACh que proviene del NBM<sup>77</sup>.

El resultado del primer experimento de esta tesis, mostró que la lesión con NMDA pero no con 192 IgG-saporina disminuye la actividad de ChAT en el complejo amígdalino, así como la cantidad de tinción de AChE específicamente en la ABL. Algunos investigadores han propuesto que la destrucción de las neuronas colinérgicas del NBM que proyectan al núcleo de la ABL puede ser responsable del deterioro conductual observado en diversas tareas. P. ej., se ha encontrado que las excitotoxinas que deaferentan a ambas proyecciones pero preferentemente a la vía NBM-ABL (ácido quinolinico y ácido fólico) deterioran el aprendizaje del laberinto de doble "Y", mientras que, las excitotoxinas que deaferentan a ambas proyecciones pero principalmente a la actividad colinérgica de la proyección NBM-Corteza no afectan tan fuertemente el aprendizaje de esta tarea (ácido quisquálico y AMPA). Es decir las excitotoxinas que preferentemente disminuyen el nivel de ACh en ABL afectan el aprendizaje de un laberinto en "Y"<sup>50</sup> o de otras tareas como prevención pasiva y condicionamiento de preferencia al lugar<sup>52</sup>.

Estos resultados implican que probablemente la disminución de la actividad colinérgica en la ABL por sí sola, sea condición suficiente para deteriorar el aprendizaje del CAS, sin embargo, en el caso de esta tarea se ha demostrado que la lesión de la ABL con NMDA no afecta el aprendizaje del CAS<sup>11, 27, 39</sup>.

*¿La destrucción de las dos proyecciones colinérgicas del NBM simultáneamente afecta el aprendizaje del CAS?*

Debido a que ninguno de los tratamientos anteriores por separado afecta la adquisición del CAS, solo nos resta suponer la existencia de una regulación sinérgica y redundante del NBM y de sus proyecciones, en donde se necesita reducir en cierta parte la actividad colinérgica de ambas proyecciones (NBM-corteza y NBM-ABL) para deteriorar el aprendizaje del CAS.

En apoyo a lo anterior, recientemente reportamos, que la lesión del NBM con 192 IgG-saporina (que deaferenta específicamente la proyección colinérgica NBM-Corteza) más la lesión con NMDA del núcleo de la ABL (se lesionan neuronas colinoceptivas y no-colinoceptivas) deteriora el aprendizaje del CAS, mientras que ninguno de estos tratamientos por separado genera efectos conductuales<sup>39</sup>.

*¿El bloqueo específico de la actividad colinérgica en corteza y amígdala es condición suficiente para afectar el aprendizaje del CAS?*

El procedimiento de doble lesión, es muy específico para destruir a las neuronas positivas al receptor de baja afinidad p75 de NGF las cuales proyectan a la corteza, por ende se consigue deaferentar únicamente a la proyección NBM-corteza, por otra parte, al

lesionar la ABL con NMDA se destruye casi por completo la actividad de las neuronas colinoceptivas (principalmente GABAérgicas) y no colinoceptivas de la ABL (que no presentan receptores a ACh)<sup>23, 80</sup>. Adicionalmente, se ha demostrado que la ABL recibe proyecciones dopaminérgicas de la sustancia nigra, así como las neuronas del rafe dorsal proyectan terminales serotoninérgicas a la ABL, el locus ceruleus le proyecta noradrenalina<sup>77</sup>, también se ha demostrado la presencia de células piramidales no-colinoceptivas, las cuales son principalmente glutamatérgicas<sup>23</sup>. Como se puede observar la lesión de la ABL resulta bastante inespecífica pero a pesar de este problema, con el procedimiento de doble lesión se encontró que el núcleo de la ABL participa en el CAS siempre y cuando se encuentre disminuida la ACh en la corteza, pero debido a la inespecificidad de la lesión con NMDA y a la presencia de otros grupos no colinérgicos, aún no sabemos si los animales dejaron de aprender el CAS, por qué la lesión de la ABL (con NMDA) eliminó la recepción de ACh proveniente de la proyección NBM-ABL o por qué esta lesión afectó a otros grupos neuronales que no son colinoceptivos, como las células piramidales de ABL. Para conocer si el bloqueo en la recepción de ACh en neuronas colinoceptivas es el medio por el cual la doble lesión afecta la adquisición del CAS, diseñamos un experimento muy sencillo, en donde, destruimos la actividad colinérgica NBM-Corteza por medio de la lesión del NBM con 192 IgG-saporina y bloqueamos temporal y específicamente la recepción colinérgica de las células colinoceptivas por medio de la microinyección de escopolamina en ABL 20 minutos antes de la adquisición del CAS.

**Materiales y métodos:** se utilizaron veintinueve ratas macho de la cepa Wistar entre 250-300g., todos los animales fueron almacenados y sometidos a las mismas condiciones descritas en el primer experimento.

Las ratas fueron aleatoriamente distribuidas en cuatro grupos, los grupos Sap/veh (n=6) y Sap/sc (n=8) recibieron lesión bilateral con 192 IgG-saporina, dentro del NBM con las mismas coordenadas utilizadas en el primer experimento. Dos semanas después de la cirugía los grupos (Sap/veh, Sap/sc) y un grupo adicional (sc/ABL n=7) se les implantó cánulas bilaterales dirigidas a la amígdala basolateral (ABL). La cánula fue introducida 2mm a partir de Bregma. Las coordenadas fueron: AP=-1.8 mm; lateral= 4.7 mm; DV=-8.3 mm; a partir de Bregma. Las guías cánulas fueron sostenidas al cráneo por medio de dos tornillos de acero incrustados al cráneo y fijados con acrílico de dentista. Un grupo de 8 ratas permaneció sin operar durante todo el experimento como grupo control (Ctrl/I). Cinco días después de la implantación de las guías cánulas, a todas las ratas se les retiró el agua, 24hrs después se midió el consumo de agua durante 15 min al día. Cuando las ratas consiguieron un nivel asintótico de consumo, se les realizó el ensayo de adquisición y prueba del condicionamiento aversivo a los sabores (descrito en el experimento 1). con la única excepción de que 20 min antes del ensayo de adquisición se les inyectó escopolamina a los grupos Sap/sc y Sc/ABL. El grupo Sap/veh fue control sham, recibió inyección isotónica de buffer fosfato salino (PBS).

**Inyección de escopolamina:** A los animales canulados se les inyectó 20 min antes del ensayo de adquisición del CAS, 0.5  $\mu$ l de escopolamina (8  $\mu$ g/ 0.5  $\mu$ l) o PBS en 60 seg. por medio de una aguja de dentista de acero inoxidable 2 mm. más larga que la guía cánula, la

aguja estuvo conectada a tubería de teflón unida a una microjeringa de 10 µl montada en una bomba de microinyección.

Para confirmar el nivel de lesión, 5 cerebros al azar de cada grupo, fueron procesados para histoquímica de acetilcolinesterasa (AChE). (Descrita en el experimento 1).

**Tabla 2. Muestra el diseño experimental utilizado en el experimento 2.**

| Grupo         | Lesión NBM<br>192 IgG-saporina | Cánulas dirigidas<br>a la ABL | Microinyección<br>en la ABL antes de<br>la adquisición. |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|---|
| Ctrl/I (n=8)  | No                             | No                            | Nada  |
| Sap/Veh (n=6) | Si                             | Si                            | PBS   |
| Sap/sc (n=8)  | Si                             | Si                            | Escopolamina  |
| Sc/ABL (n=7)  | No                             | Si                            | Escopolamina  |

### *Resultados experimento 2*

**Condicionamiento aversivo a los sabores:** Se analizó el consumo de todos los grupos con la prueba estadística ANOVA simple. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el consumo de agua durante la línea base ( $F_{3,25} = .644, p > 0.05$ ). La media del consumo de agua fue  $15.62 \pm 1.81$ ,  $14.72 \pm 2.85$ ,  $16.12 \pm 1.93$  y  $14.76 \pm 2.65$  para los grupos

CTRL/I, Sap/veh, Sap/sc y Sc/ ABL, respectivamente. En el ensayo de adquisición, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de sacarina entre grupos. ( $F_{3,25} = .465$   $p > 0.05$ ). Durante el ensayo de prueba se encontraron diferencias significativas entre grupos, en el consumo de sacarina ( $F_{3,25} = 54.77$ ,  $p < 0.001$ ). La prueba post-hoc de Fisher pareada, mostró que el grupo Sap/sc afecta el aprendizaje del CAS, indicado por un incremento en el consumo de sacarina el día de la prueba, con respecto al control intacto ( $p < 0.001$ ), ninguno de los otros tratamientos afecta al CAS. Estos resultados sugieren un efecto cooperativo entre la lesión colinérgica del NBM y bloqueo de receptores muscarínicos de la ABL

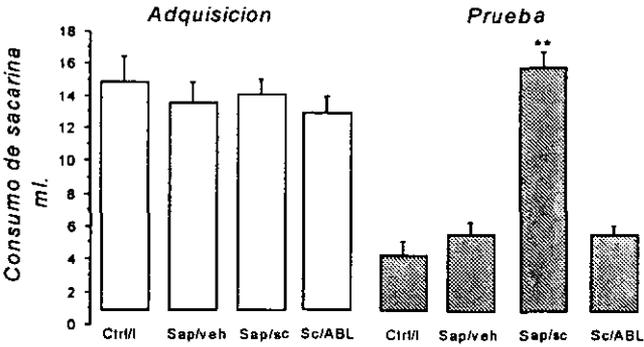


Figura 6. - muestra la media del % de consumo de sacarina  $\pm$ SEM el día de la prueba, de los grupos. Control intacto (Ctrl/I), lesión del NBM con 192 IgG-saporina más PBS en ABL (Sap/veh), lesión del NBM con 192 IgG-saporina más escopolamina en ABL (Sap/sc), el último grupo solamente se le inyectó escopolamina en ABL.(Sc/ABL). Se puede observar que el único grupo que no aprendió el CAS fue Sap/sc.

**Microinyección de escopolamina:** Se han hecho estudios con ciertos colorantes como el rojo ink y se ha demostrado que 0.5  $\mu$ l difunden a núcleos adyacentes de la

amígdala, pero no más allá de ella. Aunque no son comparables los coeficientes de difusión, probablemente la cantidad de volumen de escopolamina que inyectamos (0.5  $\mu$ l) en ABL pueda también difundir a núcleos adyacentes de la amígdala, como el núcleo central, pero debido a que se ha reportado que la lesión de este núcleo no afecta la adquisición del CAS y puesto que no recibe proyecciones colinérgicas, podemos afirmar con ciertas reservas que los efectos conductuales observados tras la aplicación de escopolamina se deben principalmente al bloqueo de receptores muscarínicos de ABL.

**Confirmación de la lesión:** El nivel de tinción de AChE en corteza confirma la extensión de la denervación colinérgica inducida por la lesión del NBM con 192 IgG-saporina (ver figura 7) en los grupos Sap/veh (B) y Sap/sc (C). Mientras que la corteza insular de los animales que recibieron escopolamina en la amígdala basolateral, Sc/ABL (D), y el grupo control intacto, Ctrl/I (A), presentan una fuerte tinción de acetilcolinesterasa cortical.

Ninguno de los tratamientos disminuyó el nivel de tinción de acetilcolinesterasa en la ABL con respecto al control intacto (figura 7 E,F,G,H).

### *Conclusión del experimento 2*

El resultado principal fue que la lesión con 192 IgG saporina más el bloqueo de los receptores muscarínicos por medio de la microinyección de escopolamina en la ABL, afecta la capacidad de un organismo para asociar el consumo de un sabor con sus consecuencias gástricas, mientras que ninguno de estos tratamientos por separado deterioró la adquisición del CAS.

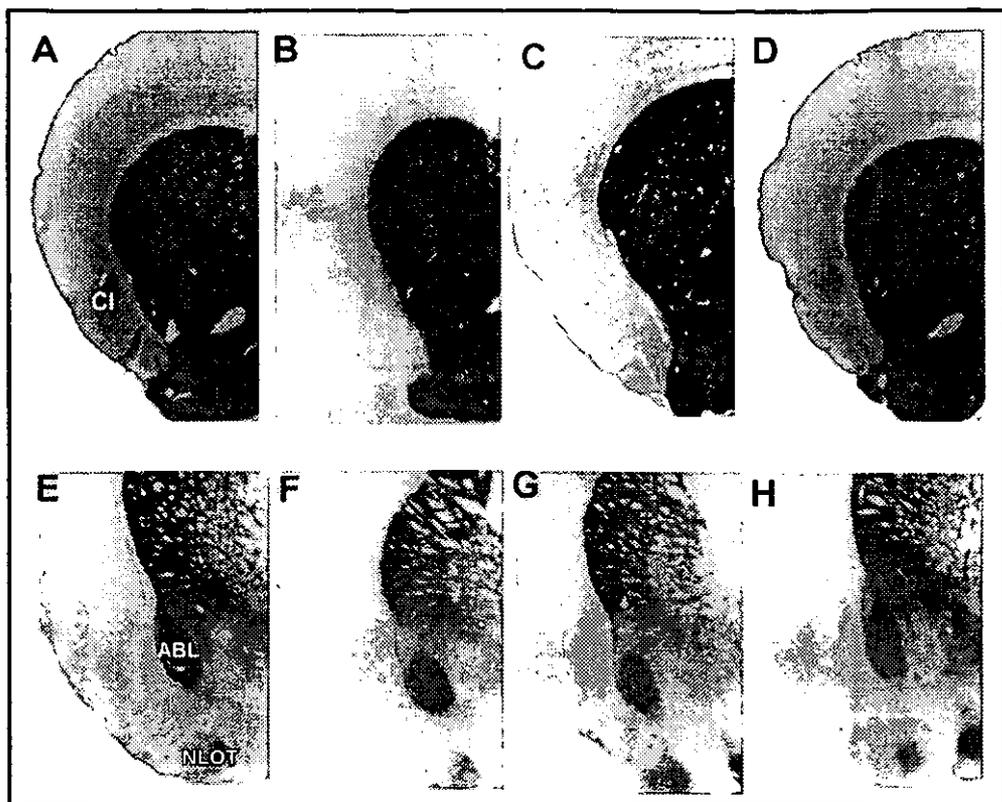


Figura 7.- Muestra tejidos con tinción de acetilcolinesterasa, en corteza y amígdala. En "A y E" se muestra la CI y ABL del grupo control intacto (Ctrl/I). En "B y F" grupo lesión del NBM con 192 IgG-saporina más PBS en ABL (Sap/veh). En "C y G" grupo lesión del NBM con 192 IgG-saporina más escopolamina en ABL (Sap/sc). Por último, en "D y H" grupo con únicamente escopolamina en ABL (Sc/ABL).

Se puede observar que la corteza de los animales lesionados (B y C) presenta menor tinción de acetilcolinesterasa que los grupos no lesionados (A y D). Por otra parte, ninguno de los tratamientos afecta el nivel de tinción en ABL ni en NLOT, las cuales son proyecciones colinérgicas del NBM que provienen de células insensibles a la lesión con 192 IgG-saporina (P75 NGFR negativas)

CI=Corteza Insular, ABL= Amígdala Basolateral, NLOT= Núcleo Lateral del Tracto Olfatorio.

Como ya se mencionó anteriormente se ha propuesto que las lesiones del NBM con excitotoxinas que deterioran principalmente la proyección NBM-ABL afectan la adquisición del laberinto "Y" <sup>9, 14, 30</sup>, pero lo que nosotros encontramos en el CAS es que ambas proyecciones NBM-Corteza y NBM-ABL son redundantes, es decir, el NBM puede por cualquiera de las dos proyecciones mantener el aprendizaje del CAS y éste resulta afectado cuando ambas vías se ven seriamente deaferentadas.

Como se mencionó al principio del experimento, el procedimiento de doble lesión (192 IgG saporina en el NBM, más NMDA en ABL) no nos informa. Si el bloqueo de la recepción de ACh en las neuronas colinoceptivas de ABL, es condición suficiente para deteriorar la capacidad de los animales para adquirir el CAS. Este problema en principio fue resuelto al utilizar escopolamina para bloquear la recepción colinérgica en la amígdala basolateral, ya que este antagonista colinérgico solamente bloquea temporalmente a todos los tipos de receptores muscarínicos, con lo cual, se consigue selectivamente bloquear la recepción colinérgica en las neuronas colinoceptivas de la ABL sin destruir o afectar (no de forma directa) a las neuronas no colinoceptivas ya que éstas no contienen receptores muscarínicos.

Por lo tanto se puede concluir que la recepción de ACh en neuronas colinoceptivas de la ABL es necesaria para aprender el CAS siempre y cuando la proyección colinérgica NBM-Corteza se encuentre afectada.

Esto no descarta la posibilidad de que otros grupos neuronales no colinoceptivos u otros neurotransmisores que se encuentren en la ABL puedan también participar en el mantenimiento del CAS, pero esta posibilidad requiere una investigación más detallada que aun falta por explorarse. Lo que sí podemos concluir es que la disminución exclusivamente

de la actividad colinérgica en Corteza y en la ABL de forma simultánea, es condición suficiente para afectar la adquisición de esta tarea.

## **Conclusión General.**

En el NBM se localizan dos poblaciones de células colinérgicas unas proveen de ACh a todo el manto cortical formando la proyección colinérgica NBM-corteza y las segundas se dirigen a la amígdala basolateral formando la vía colinérgica NBM-ABL.

En el primer experimento encontramos que la lesión del NBM con NMDA pero no con 192 IgG-saporina afecta la formación de la memoria del CAS, a pesar de que este último, deaferenta mas severamente el nivel colinérgico del manto cortical. Esto nos llevó a concluir, que contrario a lo propuesto anteriormente, el deterioro conductual no puede ser atribuido principalmente a la disminución de la actividad colinérgica en corteza (proyección NBM-corteza) pero entonces, ¿ a qué puede ser atribuido?.

Debido a que la lesión del NBM con NMDA fue la única que deaferentó a ambas proyecciones, pero principalmente a la proyección NBM-ABL, esto nos hizo pensar que probablemente la disminución de la actividad colinérgica en el núcleo ABL sea por si sola suficiente para deteriorar el aprendizaje del CAS, no obstante, contrario a lo anterior se ha reportado que la lesión de ABL con NMDA no deteriora el aprendizaje de esta tarea<sup>11; 27</sup>.

Con base en que la única condición en que se afectó el aprendizaje del CAS fue cuando las dos proyecciones colinérgicas del NBM estaban lesionadas (ver figura 3 C,F), esto solamente nos dejó una posibilidad, es decir, el NBM y sus dos proyecciones colinérgicas pueden de manera redundante modular el aprendizaje del CAS. En apoyo a lo anterior, en nuestro laboratorio utilizando un procedimiento de doble lesión, se encontró que

la lesión con 192 IgG-saporina en el NBM (que deafferenta específicamente la proyección colinérgica del NBM-Corteza) mas la lesión con NMDA en la ABL (que destruye a neuronas que reciben ACh de la proyección NBM-ABL) deteriora el aprendizaje del CAS, mientras que ninguno de estos tratamientos por separado genera algún efecto conductual. Por lo cual, se confirma un efecto cooperativo al bloquear la actividad de ambas proyecciones. Sin embargo la lesión con NMDA que bloquea la actividad colinérgica en la ABL, también lesiona a células no-colinoceptivas (que no tienen receptores colinérgicos) que podrían también ser responsables del deterioro conductual observado al utilizar este protocolo.

En el segundo experimento de esta tesis utilizamos un protocolo experimental muy similar al anterior, en donde, lesionamos la proyección colinérgica NBM-corteza por medio de la lesión con 192 IgG saporina y en el mismo animal bloqueamos específicamente la recepción colinérgica en la ABL por medio de microinyecciones de escopolamina 20 min. antes de la fase de adquisición del CAS. El resultado fue similar al encontrado con el protocolo de doble lesión, se deteriora el aprendizaje del CAS, mientras que ninguno de estos tratamientos por separado genera efectos conductuales. Con este procedimiento inferimos de forma mas precisa que el simple hecho de disminuir simultánea y específicamente la actividad colinérgica en ambas vías es condición suficiente para que el CAS se pierda. Por otra parte, este resultado no descarta una posible participación de otros grupos neuronales no-colinoceptivos en la ABL (por ejemplo neuronas glutamatérgicas), que por el simple hecho de lesionarlas exclusivamente pueda también producir un efecto conductual similar al inducido por la disminución del sistema colinérgico, pero esto aún no lo sabemos.

### *Modelo de regulación colinérgica del NBM.*

De los resultados encontrados en esta tesis y en reportes previos<sup>39</sup>, podemos inferir un modelo en principio redundante en la modulación colinérgica del NBM y la relevancia de ésta en la formación de la memoria del CAS. P. ej., si dividimos en dos la población de neuronas colinérgicas (p75-NGFr positivas y P75-NGFr negativas), las primeras proveen de ACh a todo el manto cortical, formando la proyección NBM-corteza. Las segundas proveen de ACh principalmente a la amígdala basolateral formando la proyección NBM-ABL.

Basándonos en lo anterior proponemos que cuando se afecta a la primera población por medio de microinyecciones de 192 IgG-saporina en el NBM, el animal puede continuar aprendiendo debido a que se encuentra disponible la actividad colinérgica de la segunda población de neuronas (que proyecta a la ABL), de igual forma sucede cuando se lesiona con NMDA o se le inyecta una dosis baja de escopolamina en la ABL, el animal continúa aprendiendo debido a que aún tiene disponible la actividad colinérgica en la corteza. Por otra parte, cuando se disminuyen los niveles de ACh de forma simultánea en corteza y en ABL los animales no aprenden el CAS, como es el caso con la lesión inducida por la microinyección de NMDA en el NBM, el cual, lesiona en cierto grado a las dos poblaciones de neuronas colinérgicas del NBM, esto genera una disminución en la actividad colinérgica en ambas estructuras (CI y ABL). En este mismo sentido, cuando lesionamos con 192 IgG-saporina el NBM e inyectamos escopolamina en la ABL se afecta el aprendizaje del CAS, es decir, lo que se consigue con este tratamiento es disminuir la actividad colinérgica en corteza, por medio de la destrucción de neuronas p75-NGF positivas y evitamos que la ACh active los receptores muscarínicos de las neuronas colinoceptivas en la ABL (ver figura 8).

## CAS

## NO CAS

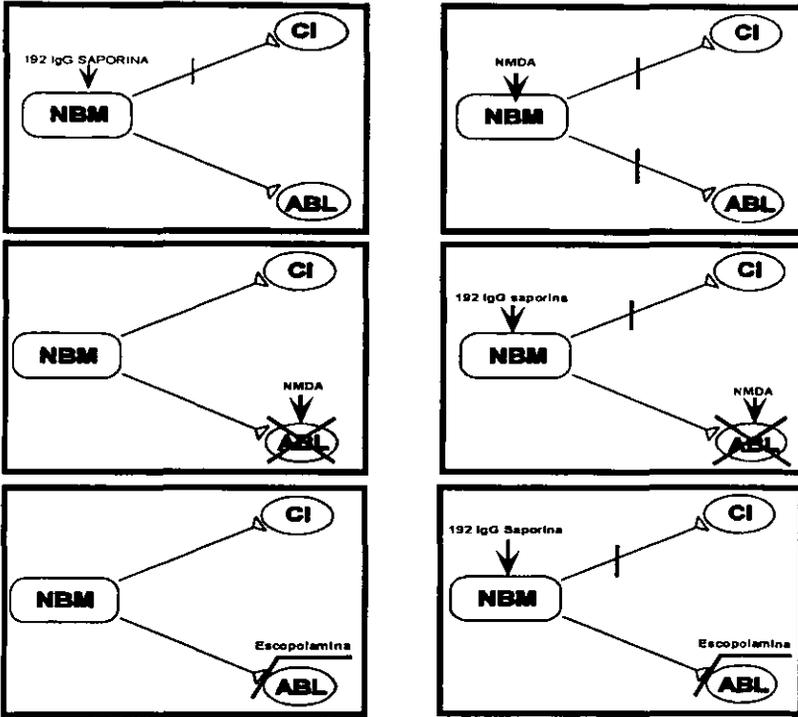


Figura 8.- representación esquemática del modelo propuesto para la regulación del aprendizaje del CAS ejercida por las proyecciones colinérgicas del Núcleo Basal Magnocelular (NBM). de acuerdo con este modelo la regulación puede ser ejercida de manera redundante por ambas proyecciones colinérgicas basalo-cortical y basalo-amigdalina. ABL; amígdala basolateral, CI; Corteza insular. En base a este modelo se puede observar en la columna izquierda que después de la lesión del NBM con 192 IgG saporina, lesión de ABL, así como después de la aplicación de escopolamina (antagonista colinérgico) los animales pueden aprender el CAS. Mientras que en la columna derecha se observa que los animales nunca aprenden el CAS debido a la destrucción o al bloqueo de ambas proyecciones

¿Por qué la lesión del NBM con NMDA afecta el aprendizaje del CAS?

Podemos mencionar al menos dos motivos por los cuales la microinyección de NMDA deteriora el aprendizaje del CAS.

1. Una posibilidad es que la lesión con NMDA deteriore el aprendizaje del CAS por medio de la destrucción de grupos celulares no colinérgicos.

En el NBM existen células GABAérgicas intercaladas con células colinérgicas, así también se conoce la presencia de proyecciones glutamatérgicas<sup>51</sup>. Debido a la presencia de neuronas no colinérgicas y aunado a que estas neuronas también son sensibles a la lesión con NMDA, no podemos adjudicar por completo, el efecto conductual encontrado en el CAS, a la destrucción de las neuronas colinérgicas del NBM que proyectan a la corteza. Los resultados del primer experimento de esta tesis demuestran que el deterioro conductual en el CAS inducido por la lesión del NBM con NMDA, no puede ser atribuido a la disminución del sistema colinérgico en la corteza cerebral, por lo que, probablemente la destrucción de células GABAérgicas puedan contribuir en la pérdida de dicho aprendizaje, pero, desafortunadamente aún no sabemos cual pueda ser el papel de las neuronas GABAérgicas en el aprendizaje del CAS.

2. La lesión con NMDA afecta el aprendizaje del CAS, porque lesiona a los dos grupos de neuronas colinérgicas del NBM y por ende, porque disminuye la actividad colinérgica tanto en corteza como en la ABL.

En el primer experimento se encontró que la lesión con NMDA o con 192 IgG saporina disminuyen la actividad de ChAT y de AChE en la corteza insular (55%, 86% respectivamente), mientras que la lesión con NMDA fue la única que disminuyó la actividad de ChAT en el complejo amigdalino (ver figura 2 B) y de AChE en la ABL (ver figura 3 F), y también fue la única que afectó el aprendizaje del CAS.

Debido a que en la única condición en que se afectó el aprendizaje del CAS fue cuando estaba comprometida la integridad anatómica y funcional de ambas proyecciones colinérgicas (NBM-corteza y NBM-ABL, es factible, proponer que el NMDA puede afectar el aprendizaje del CAS con tan solo destruir única y exclusivamente, cierta cantidad de la actividad colinérgica en la proyección NBM-corteza y otro tanto en la proyección NBM-ABL.

¿Por qué la lesión del NBM con 192 IgG saporina no afecta el aprendizaje del CAS?

Podemos inferir al menos tres motivos:

1. Porque no lesiona a células no colinérgicas<sup>72</sup>. Debido a su especificidad para lesionar neuronas colinérgicas del NBM, esta lesión deja intacta la actividad de prácticamente todas las neuronas no colinérgicas que se encuentran entremezcladas con las colinérgicas.
2. Porque solamente deaferenta la proyección colinérgica NBM-corteza<sup>44</sup>. Con base en las características del anticuerpo monoclonal que solamente reconoce a neuronas colinérgicas que presentan el receptor de baja afinidad p75, las cuales, proyectan únicamente a la corteza, esta inmunolesión, deja casi intacta la actividad colinérgica de ChAT en el complejo amigdalino (ver figura 2B) y de AChE en la ABL (figura 3 E). En este sentido, en el segundo experimento se encontró que si a un animal con inmunolesión (sin la proyección NBM-corteza), se le aplica escopolamina en la ABL, éste no puede aprender el CAS.

### 3. Porque no destruye por completo la actividad colinérgica en corteza<sup>40</sup>.

No obstante, a la disminución tan severa en la actividad y cantidad de marcadores colinérgicos en corteza que se ha reportado<sup>40, 69</sup>, no podemos afirmar con toda certeza que la ACh cortical no participe en procesos de aprendizaje y memoria, ya que probablemente la actividad colinérgica residual sea suficiente para mantener el aprendizaje. En apoyo a esta posibilidad la aplicación de fármacos que son antagonistas de los receptores muscarínicos, como escopolamina, atropina y AFDX en corteza insular afecta el aprendizaje del CAS<sup>59</sup>. En principio estos resultados contradicen lo que se encontró en esta tesis con la inmunolesión del NBM con 192 IgG saporina, ya que ambos tratamientos reducen la cantidad de ACh que reciben las neuronas colinoceptivas (que presentan receptores para ACh) en la CI. Sin embargo, la escopolamina pero no la inmunolesión afecta el aprendizaje del CAS. Una alternativa que puede explicar esta contradicción es que la escopolamina bloqueé más eficientemente a la ACh que proviene de las neuronas colinérgicas del NBM, con respecto a la disminución en la ACh inducida por la inmunolesión. Sin embargo, en contra de esta posibilidad, se encuentra una creciente evidencia que soporta la fuerte disminución que induce la lesión del NBM con 192 IgG saporina única y específicamente al sistema colinérgico cortical<sup>144; 69; 72; 74</sup>. En este trabajo encontramos una clara disminución en el nivel de tinción para AChE, así como, una reducción del 86 % en la actividad enzimática de ChAT de la CI, adicionalmente recientemente reportamos<sup>40</sup> que también se disminuye la liberación de ACh en CI en un 97 % con respecto al grupo control.

### *¿ Participa el NBM en procesos de aprendizaje y memoria?*

En base a los resultados encontrados en los dos experimentos de esta tesis, podemos responder que el sistema colinérgico del NBM si participa al menos en el aprendizaje del CAS. En resumen podemos afirmar que al lesionar parcialmente a ambas proyecciones colinérgicas del NBM, las ratas no aprenderán el condicionamiento aversivo a los sabores. Pero, ¿cómo podría participar el NBM en los procesos de aprendizaje y memoria?

Estudios electrofisiológicos han revelado que las células del nbM son altamente responsivas a los eventos que preceden a la entrega del reforzador. P. ej., trabajos con macacos (*M.mulata* y *M.Fascicularis*), encontraron que cierta población de neuronas del NBM tiene la habilidad de responder a estímulos visuales que predicen la ocurrencia del reforzador, utilizando una tarea de discriminación visual en donde un lengüetazo a un bebedero negro daba acceso a solución salina hipertónica (castigo), mientras que un lengüetazo en un bebedero blanco permitía la entrega de jugo de fruta (reforzador).

Los registros unitarios de actividad eléctrica demostraron que ciertas neuronas del NBM incrementaban su respuesta eléctrica cuando se presentaba el bebedero blanco y la disminuía con el bebedero negro. En la segunda fase de esta tarea las condiciones de reforzamiento eran revertidas, es decir, el bebedero negro era seguido por jugo de fruta y el blanco por solución salina hipertónica. En esta nueva condición las mismas neuronas registradas anteriormente ajustaban su respuesta eléctrica para responder ante el bebedero negro y no así al blanco<sup>76</sup>.

Por otra parte, trabajos realizados en ratas utilizando métodos de microdiálisis y cromatografía para medir la liberación de ACh cortical (medida indirecta de la actividad del NBM), en animales en libre movimiento, han encontrado que estímulos novedosos o muy salientes, inducen liberación cortical de ACh, p. ej., se ha reportado que la estimulación con un tono o una luz por primera vez induce liberación cortical de ACh, que desaparece cuando se vuelve a estimular por segunda ocasión (habitación). Adicionalmente, encontraron que esos estímulos novedosos podían seguir induciendo liberación si eran apareados con un choque eléctrico<sup>2</sup>.

Recientemente se reportó que el consumo de un sabor novedoso (sacarina o quinina) induce la liberación de ACh en corteza insular, la cual, disminuye cuando la rata consume el sabor por segunda ocasión (estímulo familiar)<sup>54</sup>. Es conveniente resaltar que en el aprendizaje del CAS, la novedad del sabor es uno de los requisitos indispensables para que las ratas muestren una clara aversión al sabor. Si el animal ha tenido algún encuentro previo con el sabor, en ausencia de malestar, esto retarda el aprendizaje del CAS (inhibición latente).

De estos datos se puede extraer la siguiente hipótesis: Si la activación del NBM, medida por el incremento extracelular de ACh en CI señala la novedad de los sabores y esta novedad es necesaria para aprender el CAS, entonces, la disminución de ACh en CI debería afectar el aprendizaje de esta tarea. Sin embargo, la inmunolesión del NBM con 192 IgG Saporina reduce casi por completo (97%) la liberación de ACh en CI<sup>40</sup>, pero, no afecta el aprendizaje del CAS. Si partimos del hecho de que la ACh es la molécula que desencadena los eventos celulares responsables de codificar la novedad de los estímulos, podemos decir que en un cerebro con inmunolesión del NBM, no necesita el incremento extracelular de ACh en CI para "codificar la novedad del sabor" y por ende para aprender el CAS, esto presupone, la existencia de otros posibles eventos moleculares no dependientes de ACh en CI que participen en la señalización de la novedad de los sabores. Esto abre una serie de preguntas como p. ej., que eventos están involucrados, por lo que es necesario generar estudios en donde se muestre que sucede con otros neurotransmisores como con GABA o glutamato en CI cuando los animales consumen un sabor por primera vez.

### *Comentario final*

Hasta el momento existe una clara evidencia que relaciona la actividad de las neuronas del NBM con el aprendizaje del CAS, p. ej., si se inactivan a todas las neuronas del NBM con TTX<sup>53</sup> o se les lesiona con excitotoxinas, los animales no aprenden el CAS. En un principio, se había propuesto que las neuronas colinérgicas del NBM que proyectan a la corteza eran mayormente responsables de los procesos de aprendizaje y memoria, ciertamente los resultados de esta tesis, demuestran que en ausencia de las neuronas colinérgicas del NBM, que proyectan a la corteza, las ratas pueden seguir aprendiendo una

tarea que es de gran relevancia para su sobrevivencia, como lo es el CAS. Adicionalmente en el segundo experimento se demuestra la participación de un segundo grupo colinérgico del NBM, que proyecta a la ABL, ya que cuando se lesiona la proyección colinérgica NBM-corteza y al mismo tiempo se bloquea la recepción colinérgica en la ABL proveniente de la proyección NBM-ABL, las ratas no aprenden el CAS. Adicionalmente, queda abierta la posibilidad de que las neuronas restantes del NBM que no son colinérgicas participen en la formación de la memoria del CAS, a las cuales no se les ha prestado mucha atención por lo que sería interesante realizar nuevos experimentos en donde se demuestre su participación en el CAS. Ciertamente, la creación de 192 IgG saporina no solamente nos brinda una herramienta para estudiar al sistema colinérgico de proyección cortical, sino también al destruirlo nos deja un campo abierto para poder estudiar, en ausencia de ACh, la participación de otros tipos de neurotransmisores, como al sistema GABAérgico del NBM, el cual también presenta proyecciones corticales, o al sistema glutamatérgico. Al mismo tiempo nos permite conocer cual puede ser la interacción de estos tres neurotransmisores en procesos tan complejos como lo son el aprendizaje y la memoria.

## Bibliografía

- 1 Aarsland, D., Larsen, J.P., Reinvang, I. and Aasland, A.M., Effects of cholinergic blockade on language in healthy young women. Implications for the cholinergic hypothesis in dementia of the Alzheimer type, *Brain*, 117 (1994) 1377-1384.
- 2 Acuas, E., Wilson, C. and Fibiger, H.C., Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear., *J Neurosci*, 16 (1996) 3089-3096.
- 3 Ammasari-Teule, M., Amoroso, D., Forloni, G.L., Rossini-Arnaud, C. and Consolo, S., Mechanical differentiation of basal forebrain-cortical pathway and neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: comparative effect on spatial learning and cortical acetylcholine release in vivo, *Behavioural Brain Research*, 54 (1993) 145-152.
- 4 Åke Seiger, Norberg, A., Holst, H., V. Bäckman, L., Ebendal, T., Alafuzoff, I., Amberla, K., Hartvig, P., Herlitz, A., Lilja, A., Lunsqvist, H., Långström, B., Meyerson, B., Persson, A., Viitanen, M., Winblad, B. and Olson, L., Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy, *Behavioural Brain Research*, 57 (1993) 255-261., *Behavioural Brain Research*, 57 (1993) 255-261.
- 5 Bannon, A.W., Curzon, P., Gunther, K.L. and Decker, M.W., Effects of intraseptal injection of 192-IgG-saporin in mature and aged Long-Evans rats, *Brain Research*, 718 (1996) 25-36.
- 6 Bartus, R.T., Reginal L. Dean III, Beer, B. and Lippa, A.S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *SCIENCE*, 217 (1982) 408-417.
- 7 Baxter, G.M., Buccu, D.J., Sobel, J.T., Williams, J.M., Gorman, K.L. and Gallagher, M., Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons, *NeuroReport*, 7 (1996) 1417-1420.
- 8 Baxter, G.M., Buccui, J. B., Wiley G. R., Gorman, K.L. and Gallagher, M., Selective immunotoxic lesion of basal forebrain cholinergic cell: effects of learning and memory in rats, *Behavioural Neuroscience*, 109 (1995) 714-722.
- 9 Beninger, R.J., Kühnemann, S., Ingles, J.L., Jhamandas, K. and Boegman, R.J., Mnemonic Deficits in the Double Y-Maze Are Related to the Effects of Nucleus Basalis injections of Ibotenic and Quisqualic Acid on Choline Acetyltransferase in the Rat Amygdala, *Brain Research Bulletin*, 35 (1994) 147-152.
- 10 Bermúdez-Rattoni, F., Escobar-Rodríguez and Piña-Hernández, El condicionamiento aversivo a los sabores: Un modelo del desarrollo anatomofuncional del gusto. In M. Salas (Ed.) *ONTOGENIA NEURAL. Aspectos Comparativos y Mecanismos de Regulación*, Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas. México. 1991, pp. 261-280.
- 11 Bermúdez-Rattoni, F. and McLaugh, J.L., Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion, *Brain Research*, 549 (1991) 165-170.

- 12 Bermúdez-Rattoni, F. and Yamamoto, T., Neuroanatomy of CTA: lesion studies. In: Conditioned Taste Aversion. Memory of a special kind. (Bures J. Bermúdez-Rattoni F. and Yamamoto T. eds), *New York: Oxford UP.* (1998) 28-44.
- 13 Bettler, B. and Mulle, C., Review: Neurotransmitter Receptors II AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology*, 34 (1995) 123-139.
- 14 Boegman, R.J., Cockhill, J., Jhamandas, K. and Beninger, R.J., Excitotoxic lesions of rat basal forebrain: differential effects on choline acetyltransferase in the cortex and amygdala, *Neuroscience*, 51 (1992) 129-135.
- 15 Bolles, C.R., Introduction: Associative Processes in the Formation of Conditioned Food Aversions-An Emerging Functionalism?, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443 (1985) 1-7.
- 16 Bower, B., Forbidden Flavors scientists consider how disgusting tastes can linger surreptitiously in memory, *Science News*, Vol. 151 March 29, 1997. *Science News*, 151 (1997)
- 17 Braun, J., Laseter, P. and Kiefer, S., The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, 10 (1982) 13-45.
- 18 Braun, J., Sliok, T.B. and Lorden, J.F., Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions, *Physiology and behavior*, 9 (1972) 637-641.
- 19 Brower, L.P. and Fink, L., A natural toxic defense system: cardinolides in butterflies versus birds, *Annals of the New York Academy of Sciences*, (1983) 171-188.
- 20 Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. and Yamamoto, T., *Conditioned Taste Aversion. Memory of a special kind.*, 1998,
- 21 Connor, D.J., Langlais, P.J. and Thal, L.J., Behavioural impairment after lesions of the nucleus basalis by ibotenic acid and quisqualic acid. *Brain Research*, 555 (1991) 84-90
- 22 Coyle, J.T., Price, D.L. and DeLong, M.R., Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation., *SCIENCE*, 219 (1983) 1184-1190.
- 23 Davis, M., Rainnie, D. and Cassel, M., Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety, *TINS*, 17 (1994) 208-214.
- 24 Domjan, M., Cue consequence Specificity and Long-delay Learning Revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443 (1985) 55-66.
- 25 Dornan, A.W., McCampbell, A.R., Tinkler, G.P., Hickman, L.J., Bannon, A.W., Decker, M.W. and Gunther, K.L., Comparisons of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin, *Behavioural Brain Research*, 86 (1997) 181-189.
- 26 Dougherty, K.D., Salat, D. and Walsh, T.J., Intraseptal injection of the cholinergic immunotoxin 192-IgG saporin fails to disrupt latent inhibition in a conditioned taste aversion paradigm. *Brain Research*, 736 (1996) 260-269.
- 27 Dunn, L.T. and Everitt, B.J., Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxic ibotenic acid, *Behavioural Neuroscience*, 102 (1988) 3-22.

- 28 Dunnett, S.B., Everitt, B.J. and Robbins, T.W., The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions, *Trends Neurosci.*, 14 (1991) 494-501.
- 29 Dunnett, S.B., Whishaw, G.H., Jones, G.H. and Bunch, S.T., Behavioral, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats, *Neuroscience*, 20 (1987) 653-669.
- 30 Eriksdotter, J.M., Nordberg, A., Amberla, K., Backman, L., Ebendal, T., Meyerson, B., Olson, L., Seiger, S.N., Theodorsson, E., Vitanen, M., Winblad, B. and Wahlund, L.O., Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease, *Dement-Geriatr-Cogn-Disord*, 9 (1998) 246-257.
- 31 Everitt, B.J. and Robbins, T.W., Central cholinergic systems and cognition, *Annu.Rev.Psychol.* 48 (1997) 649-684.
- 32 Fischer, W., Victorin, K., Björklund, A., Williams, R.A., Varon, S. and Gage, F.H., Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rat by nerve growth factor, *Nature*, 329 (1987)
- 33 Flynn, G., F. Benson, D.F. and Ardilas, A., Anatomy of the insula-functional and clinical correlates, *Aphasiology*, 13 (1999) 55-78.
- 34 Frey, S., Morris, R. and Petrides, M., A neuroanatomical method to assess the integrity of fibers of passage following ibotenate-induced damage to the central nervous system, *Neuroscience Research*, 28 (1997) 285-288.
- 35 Gallo, M., Marquez, S.L., Ballesteros, M.A. and Maldonado, A., Functional blockade of the parabrachial area by tetrodotoxin disrupts the acquisition of conditioned taste aversion induced by motion-sickness in rats, *Neuroscience letters*, 265 (1999) 57-60.
- 36 Gallo, M., Roldan, G. and Bures, J., Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats, *Behavioural Brain Research*, 52 (1992) 91-97.
- 37 Garcia, J., Kimmeldorf, D.J. and Koelling, R.A., Conditioned taste aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation, *SCIENCE*, 5 (1955) 121-122.
- 38 Garcia, J., Lasiter, P., Bermúdez-Rattoni, F. and Deems A, D., A General Theory of Aversion Learning, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443 (1985) 8-21.
- 39 Gutiérrez, H., Gutiérrez, R., Ramirez-Trejo, L., Silva-Gandarias, R., Ormsby, C.E., Miranda, M., I and Bermúdez-Rattoni, F., Redundant basal forebrain modulation in taste aversion memory formation, *The Journal of Neuroscience*, 19 (1999) 7661-7669.
- 40 Gutiérrez, H., Gutiérrez, R., Silva-Gandarias, R., Estrada, J. and Miranda, M., I, Differential effects of 192IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation, *Brain Research*, 834 (1999) 136-141.
- 41 Gutiérrez, H., Hernández-Echegaray, Ramirez-Amaya, V. and Bermúdez-Rattoni, F., Blockade of N-Methyl-D-Aspartate receptor in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation, *Neuroscience*, 89 (1999) 751-758.

- 42 Haroutunian, V., Greig, N., Pei, X.F., Utsuki, T., Gluck, R., Accvedo, L.D., Davis, K.L. and Wallace, W.C., Pharmacological modulation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein levels in the CFS of rats with forebrain cholinergic system lesions, *Brain-Res-Mol*, 46 (1997) 161-168.
- 43 Heckers, S. and Mesulam, M.M., Two types of cholinergic projections to the rat amygdala, *Neuroscience*, 60 (1994) 383-397.
- 44 Heckers, S., Ohtake, T., Wiley R, G., Lappi, D.A., Geula, C. and Mesulam, M.M., Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by and immunotoxin against the p75 NGF receptor, *The journal of Neuroscience*, 14 (1994) 1271-1289.
- 45 Kiefer, S., Neural mediation of conditioned food aversions, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443 (1985) 100-109.
- 46 Kodama, S., Pathologisch-anatomische Untersuchungen mit Bezug auf die sogenannten Basalganglien und ihre adnexe. In: the Nucleus Basalis Magnocellularis Cholinergic System: One Hundred Years of Progress. *Neurobiology of learning and memory* 67, 85-95 (1997), *Schweizer Archiv Für Neurologie und Psychiatrie*, 23 (1929) 179-265.
- 47 Lasiter, P., Glanzman, D. and Mensah, P., Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat, *Brain Research*, 234 (1982) 111-121.
- 48 Leanza, G., Wiley R, G. and Björklund, A., Selective Lesioning of the Basal Forebrain Cholinergic System by Intraventricular 192 IgG-saporin: Behavioural, Biochemical and Stereological Studies in the Rat, Vol. 7, pp. 329-343., *European Journal of Neuroscience*, 7 (1995) 329-343.
- 49 López-García, J.C., Fernández-Ruiz, J., Escobar, L.M., Bermúdez-Rattoni, F. and Tapia, R., Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45 (1993) 1-6.
- 50 Mallet, P.E., Beninger, R.J., Flesher, S.N., Jhamandas, K. and Boegman, R.J., Nucleus basalis lesions: implication of basoamygdaloid cholinergic pathways in memory, *Brain Research Bulletin*, 34 (1995) 51-56.
- 51 Manfrini, A. and Mancía, M., Desynchronized (REM) sleep inhibition induced by carbachol microinjections into the nucleus basalis of Meynert is mediated by the glutamatergic system, *Exp Brain Res*, 109 (1996) 174-178.
- 52 McIntyre, C.K., Ragozzino, M.E. and Gold, P.E., Intra-amygdala infusions of scopolamine impair performance on a conditioned place preference task but not a spatial radial maze task, *Behavioural Brain Research*, 95 (1998) 219-226.
- 53 Miranda, M., I and Bermúdez-Rattoni, F., Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 6478-6482.
- 54 Miranda, M., I, Ramírez-Lugo, L. and Bermúdez-Rattoni, F., Cortical cholinergic activity is related with the novelty of the stimulus, *in press*, (1999)
- 55 Morris, R., Frey, S.K.T. and Petrides, M., Ibotenic Acid Lesions of the Basolateral, But not the central, Amygdala interfere with Conditioned Taste Aversion: Evidence From a Combined Behavioral and Anatomical Tract-Tracing Investigation, *Behavioural Neuroscience*, 113 (1999) 291-302.

- 56 Muir J. L., Acetylcholine, Aging, and Alzheimer's Disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56 (1997) 687-696.
- 57 Muir J. L., Page, K.J., Sirinathsinghji, D.J.S., Robbins, T.W. and Everitt, B.J., Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention, *Behavioural Brain Research*, 57 (1993) 123-134.
- 58 Murray, C.L. and Fibiger, H.C., Learning and memory deficits after lesions of the nucleus basalis magnocellularis: reversal by physostigmine, *Neuroscience*, 14 (1985) 1025-1032.
- 59 Naor, C. and Dudai, Y., Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion, *Brain Research*, 79 (1996) 61-67.
- 60 Noback, C.R., *Sistema nervioso humano fundamentos de neurobiologia*, edit McGraw Hill, (1986) 263-264.
- 61 Olney, J.W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D.F., Price, M.T. and Sesma, M.A., NMDA Antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention, *SCIENCE*, 254 (1991) 1515-1517.
- 62 Papaj, D.R., *Optimizing Learning and Its Effect on Evolutionary Change in Behavior*, (Behavioral mechanisms in evolutionary ecology edited Leslie A. Real), *The university of Chicago Press Chicago and London*, (1993)
- 63 Paxinos, G. and Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*, *San Diego: Academic.*, (1986)
- 64 Penfield, W. and Faulk, M.E., The insula: Further observations on its function, *Brain*, 78 (1955) 445-470.
- 65 Schafe, G.E. and Bernstein, L.L., Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion II. Insular (gustatory) cortex, *Brain Research*, 800 (1998) 40-47.
- 66 Semba, K., Reiner, P.B., McGeer, E.G. and Fibiger, H.C., Morphology of cortically projecting basal forebrain neurons in the rat as revealed by intracellular iotophoresis of horseradish peroxidase, *Neuroscience*, 20 (1987) 637-651.
- 67 Shute, C.C.D. and Lewis, P.R., The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. In: *the Nucleus Basalis Magnocellularis Cholinergic System: One Hundred Years of Progress. Neurobiology of learning and memory* 67, 85-95 (1997), *Brain*, XC (1967) 497-520.
- 68 Swanson, L.W. and Petrovich, G.D., What is the amygdala?, *Trends Neurosci.*, 21 (1998) 323-331.
- 69 Torres, E.M., Perry, T.A., Blokjan, A., Wilkinson, L.S., Wiley R, G., Lappi, D.A. and Dunnett, S.B., Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system, *Neuroscience*, 63 (1994) 95-122.
- 70 Waite, J.J., Chen, A.D., Wardlow, M.L. and Thal, L.J., Behavioral and biochemical consequences of combined lesions of the medial septum/diagonal band and nucleus basalis in the rat when ibotenic acid, Quisqualic acid, and AMPA are used, *Experimental neurobiology*, 130 (1994) 214-229.
- 71 Waite, J.J. and Thal, L.J., Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin, *Life Science*, 58 (1996) 1947-1953.

- 72 Walsh, T.J., Kelly, R.M., Dougherty K, D., Stackman, R.W., Wiley R, G. and Kutscher, C.L., Behavioural and neurobiological alterations induced by the immunotoxin 192-IgG-saporin: cholinergic and non-cholinergic effects following i.c.v. injection, *Brain Research*, 702 (1995) 245
- 73 Wenk, G.L., Review The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: One hundred years of progress, *Neurobiology of learning and memory*, 67 (1997) 85-95.
- 74 Wenk, G.L., Stoehr, J.D., Quintana, G., Mobley, S. and Wiley, R.G., Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192 IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats, *J Neurosci*, 14 (1994) 5986-5995.
- 75 Wiley R, G., Neural lesioning with ribosome-inactivating proteins: suicide transport and immunolesioning, *Trends Neurosci.*, 15 (1992) 290
- 76 Wilson, F.A. and Rolls, E.T., Learning and memory is reflected in the responses of reinforcement-related neurons in the primate basal forebrain., *J Neurosci*, 1990 (1990) 4-1254.
- 77 Woolf, N.J. and Butcher, L.L., Cholinergic Projections to the Basolateral Amygdala: A Combined Evans Blue and Acetylcholinesterase Analysis, *Brain Research Bulletin*, 8 (1982) 751-763.
- 78 Yamamoto, T., Matsuo, R. and Kawamura, Y., Localisation of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J Neurophysiol* 44: 440-454., *Neurophysiol*, 44 (1999) 440-454.
- 79 Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y. and Sakai, N., Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat, *Behavioural Brain Research*, 65 (1994) 123-137.
- 80 Yong Hc, Janseen, G.M.W. and Morrison, J.H., Differential synaptic distribution of the AMPA-GluR2 subunit on GABAergic and non-GABAergic neurons in the basolateral amygdala, *Brain Research*, 827 (1999) 51-62.