

134



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DEL SISTEMA  
COLINÉRGICO EN LA CORTEZA INSULAR, EN EL  
APRENDIZAJE GUSTATIVO.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A :  
**LUIS NÚÑEZ JARAMILLO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**



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.



GOBIERNO NACIONAL  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**Participación diferencial del sistema colinérgico en la corteza insular, en el aprendizaje gustativo.**

realizado por Luis Núñez Jaramillo

con número de cuenta 9537488-8, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Propietario

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

Propietario

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Suplente

Psic. Ranier Gutiérrez Mendoza

Suplente

Mtro. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## **AGRADECIMIENTOS.**

-A mis padres, por haberme apoyado siempre, incluso en mi decisión de dedicarme a la ciencia.

-Al Dr. Federico Bermúdez, por haberme brindado la oportunidad de hacer investigación, y por la confianza que me ha depositado a lo largo de los últimos 2 años, y por sus comentarios a esta tesis.

-A Maribel, por haberme acercado al laboratorio a través del taller, y por su apoyo y enseñanzas dentro del mismo.

-A Lety, por haberme adoptado como estudiante cuando no sabía absolutamente nada, brindándome amistad y conocimientos a lo largo de estos 2 años.

-A la Dra. Martha Escobar, el Dr. Silvestre Alavez, el Psic. Ranier Gutiérrez y el Mtro. Enrique Espinosa por sus valiosos comentarios a esta tesis.

-A Ranier, con quién desarrollé este trabajo, por su apoyo, amistad y consejos.

-A Karina, Vanesa, Enrique, Sergio, Oscar, Gina, Jimena, Israela, Carlos, Marisela, Miriam, y todos mis compañeros que de una u otra forma hicieron más amenas las horas que pasé en el laboratorio.

-A Oreste Carvajal y Yolanda Díaz de Castro, por su amistad y apoyo técnico.

-A CONACYT (MILENIO-Conacyt 2000-2001 35806-N) y DGAPA (DGAPA-UNAM IN-215001), por el apoyo económico.

## ÍNDICE.

Introducción .....	1
Importancia evolutiva del sistema gustativo.....	3
Aprendizajes gustativos y supervivencia.....	5
Clasificación de un sabor como aversivo.....	5
Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).....	5
Clasificación de un sabor como seguro.....	7
Atenuación de la neofobia a los sabores.....	7
Inhibición latente.....	8
Mecanismos independientes para el etiquetamiento de un sabor como aversivo o seguro.....	9
Corteza insular, Acetilcolina (ACh) y aprendizajes gustativos.....	10
ACh y aprendizaje.....	11
Objetivos de la tesis.....	13
Experimento 1.- Efectos sobre el aprendizaje del CAS y la atenuación de la neofobia de la inyección de escopolamina en la corteza insular antes del consumo de sacarina como sabor novedoso.....	14
Metodología.....	15
Resultados.....	20
Experimento 2.- Efectos sobre el aprendizaje del CAS y la atenuación de la neofobia de la inyección de escopolamina en la corteza insular después del consumo de sacarina como sabor novedoso.....	22
Metodología.....	23
Resultados.....	26
Experimento 3.- Participación del sistema colinérgico en la corteza insular en el fenómeno de inhibición latente.....	28
Metodología.....	29
Resultados.....	33
Discusión y conclusiones.....	34
El sistema colinérgico en la corteza insular tiene una participación diferencial en el etiquetamiento de un sabor novedoso como aversivo o seguro.....	34
El consumo de un sabor novedoso desencadena al menos 2 eventos de actividad colinérgica en la corteza insular.....	38
Especulaciones.....	41
Diferentes eventos desencadenados por un solo estímulo; implicaciones evolutivas.....	41
Perspectivas a futuro.....	44
Referencias.....	46

## ***INTRODUCCIÓN.***

La forma en la que aprendemos y recordamos los acontecimientos de la vida diaria ha sido desde hace mucho tiempo un tema de estudio de la psicología, a la cuál debemos el análisis conductual de los procesos de aprendizaje y memoria tanto en humanos como en diferentes modelos animales.

Con base en los estudios realizados por los psicólogos ha sido posible elaborar una descripción conductual de la memoria, así como una clasificación de los diferentes tipos de esta. Una clasificación separa la memoria explícita o declarativa, de la memoria implícita o no declarativa (Fernandez y Bermúdez, 2001). Una diferencia importante entre estas dos clases de memorias es que en el caso de la primera el individuo recuerda "conscientemente", como cuando recordamos un número telefónico, o las respuestas a las preguntas de un examen; mientras que en el segundo caso la experiencia altera inconscientemente la conducta del individuo, como cuando una canción nos pone tristes o contentos, o cuando el olor de cierta comida nos recuerda nuestra casa cuando estamos lejos, etc.

La memoria explícita se clasifica a su vez en memoria de hechos y de eventos, mientras que la implícita se divide en 4 categorías:

-De habilidades y hábitos.- Este tipo de aprendizaje nos sirve para desarrollar, como su nombre lo indica, "habilidades" técnicas como aprender a manejar, o a andar en bicicleta.

**-Priming.-** Cuando la ejecución de una tarea mnemónica se ve afectada por información a la que se ha tenido acceso recientemente, por ejemplo, si acabamos de comer tacos de barbacoa y nos piden que mencionemos 10 animales es más probable que digamos borrego (o perro, según el contexto) a que digamos águila.

**-Aprendizajes asociativos.-** En este tipo de aprendizaje la presencia de un estímulo determinado va a ser capaz de evocar otro estímulo ausente, una vez que se haya establecido una relación entre ambos como en el ejemplo donde un olor nos recuerda un lugar.

**-Aprendizajes no asociativos.-** Un ejemplo de aprendizaje no asociativo es la habituación, en la cuál la presencia de un estímulo es algo tan cotidiano que pasa desapercibido, por ejemplo, al acostumbramos a llevar una gorra en la cabeza ya no nos percatamos más de su presencia (Fernández y Bermúdez, 2001).

En el caso del aprendizaje asociativo, un ejemplo que se debe mencionar es el condicionamiento clásico de Ivan P. Pavlov (Bermúdez et al, 2001). Cuando a un perro se le presenta un trozo de carne comienza a salivar, Pavlov observó que si acostumbraba al perro a oír el sonido de una campana cuando se le presentaba la carne, llegaba un momento en que el perro salivaba como respuesta a la campana, a pesar de que la carne no estuviera presente. En esta caso la carne es un estímulo que provoca siempre una respuesta de salivación en el perro, por lo que lo llamó estímulo incondicionado (EI), la campana en cambio, es un estímulo que va a generar salivación en el perro únicamente después de que el sonido ha sido asociado a la carne, por lo que Pavlov la llamó estímulo condicionado (EC). Estos dos términos serán utilizados posteriormente en esta tesis.

Para llevar a cabo estudios sobre el aprendizaje se han utilizado diversas tareas conductuales que tratan de imitar condiciones con las que un animal puede encontrarse en la naturaleza como es el caso de los laberintos, dado que el conocer perfectamente el área que habita le permite identificar rutas que lo lleven a lugares donde encuentre comida (un reforzador utilizado en muchas ocasiones como premio tras resolver el laberinto) o donde pueda escapar de sus depredadores, así como la ruta a su madriguera, etc. Todas estas situaciones son en realidad un conjunto de estímulos que el animal percibe a través de los sentidos y que adquieren significado en el entorno particular en que se presentan, dependiendo de la relevancia de estos para la sobrevivencia del animal. El animal percibe estos estímulos a través de diferentes sistemas, como son el visual, el olfativo o el gustativo, este último juega un papel fundamental en las conductas estudiadas en esta tesis.

#### **IMPORTANCIA EVOLUTIVA DEL SISTEMA GUSTATIVO.**

Desde organismos relativamente simples como las bacterias o los protozoarios podemos encontrar mecanismos que responden a la presencia de diferentes compuestos en el medio a través de quimiorreceptores. Este mecanismo le permite al organismo conocer diferentes aspectos del medio en el que se encuentra indicándole la presencia de alimento o de sustancias tóxicas y moléculas que participan en procesos de comunicación intracelular. Los organismos unicelulares detectan estos compuestos a través de receptores en su membrana y responden acercándose o alejándose de estos estímulos (Meisami, 1991).

En los animales invertebrados los mecanismos de quimiorrecepción están muy desarrollados, particularmente en insectos, donde se pueden observar diferentes

mecanismos de quimiorrepción que no se limitan únicamente a gusto y olfato, sino que pueden percibir a través de quimiorreceptores en todo el cuerpo, la presencia de sustancias nocivas como el amonio. El sistema gustativo de los insectos puede distinguir una variedad relativamente amplia de estímulos, y tiene una función principalmente alimenticia. Los insectos detectan los sabores a través de estructuras llamadas *sensilias gustativas*, las cuales se encuentran principalmente en la boca, aunque también llegan a encontrarse en las antenas y en otras superficies del cuerpo menos especializadas. La estimulación de estas estructuras por diferentes compuestos genera diferentes *conductas* en los insectos, por ejemplo, cuando se les presenta a las moscas agua endulzada extienden su proboscis para beberla, esta conducta no se observa si se les presenta solamente agua, o agregando quinina a la solución de agua con azúcar. Las orugas hacen un fuerte movimiento de la boca en respuesta a compuestos salados o amargos y las abejas rechazan la miel tratada con quinina (Meisami, 1991).

Las células del cuerpo de los vertebrados tienen diferentes quimiorreceptores en su membrana que les permiten responder a una gran variedad de estímulos químicos. Los vertebrados tienen cuatro tipos básicos de sistemas quimiorreceptores: un sentido químico general que detecta sustancias dañinas y cuyos receptores se encuentran en la piel y en las mucosas de la boca y del sistema respiratorio, un sistema quimiorreceptor interno que participa en la regulación de funciones viscerales, y los sentidos especializados del olfato y del gusto (Meisami, 1991).

Los receptores gustativos de los vertebrados se encuentran en la cavidad bucal y participan en la detección, selección y rechazo de los compuestos químicos asociados con los alimentos (Meisami, 1991).

Como ya se mencionó, la detección de las características químicas de un alimento puede generar diferentes conductas en los animales, conductas que le permiten sobrevivir al evitarle consumir sustancias tóxicas.

#### **APRENDIZAJES GUSTATIVOS Y SOBREVIVENCIA.**

Una vez que el animal detecta las características del alimento con base en su sabor, determina su conducta futura de consumo hacia este con base en las consecuencias que su ingestión le haya traído. De manera general, el animal divide los alimentos que prueba en dos categorías principales: seguro y aversivo.

Se han diseñado tareas que nos permiten estudiar estos aprendizajes en el laboratorio.

#### ***CLASIFICACIÓN DE UN SABOR COMO AVERSIVO.***

##### ***Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).***

Una de las conductas más observadas e importantes en muchas especies es la de evitar la ingestión de alimentos que le resultan nocivos o venenosos. Aprender a evitar alimentos nocivos implica una ventaja adaptativa, dado que el animal que consume de manera

reiterada alimentos que le produzcan algún daño tiene pocas probabilidades de sobrevivir. Los animales detectan un alimento dañino mediante las consecuencias de su ingestión, estas consecuencias pueden ser desde un ligero malestar gástrico hasta fiebre severa, o inclusive la muerte; si el animal sobrevive asociará el malestar con el sabor del alimento ingerido, de manera que la próxima vez que lo encuentre no lo comerá.

Esta conducta de rechazo a los alimentos previamente asociados con intoxicación es una conducta que se ha encontrado en organismos tan diversos como caracoles, insectos, aves y mamíferos (García et al, 1985).

El CAS recrea experimentalmente estas condiciones. El entrenamiento en el CAS consiste en presentar al animal un estímulo gustativo novedoso que se emplea como estímulo condicionado (EC), el cuál será seguido de un estímulo aversivo que le causará al animal un efecto dañino, el más comúnmente utilizado es una inyección intraperitoneal (i.p.) de cloruro de litio (LiCl) que se ocupa como estímulo incondicionado (EI), el cuál asociará con el estímulo gustativo novedoso. A esta etapa del CAS se le conoce como *adquisición*, ya que el animal adquiere una aversión hacia el sabor utilizado debido al malestar provocado por el LiCl. La siguiente vez que el animal tiene acceso al sabor utilizado para la asociación tiende a rechazarlo debido a que recuerda que la última vez que lo probó le ocasionó algún tipo de malestar, a esta etapa del CAS se le conoce como *prueba* ya que es en esta etapa cuando se puede observar si el animal desarrolló o no una aversión al sabor, aversión que se detecta como una disminución en el consumo del sabor en comparación a lo que consumió la última vez que lo probó (adquisición).

## *CLASIFICACIÓN DE UN SABOR COMO SEGURO.*

### *Atenuación de la neofobia a los sabores.*

En la naturaleza los organismos se encuentran con una gran cantidad de alimentos potenciales, muchos de los cuales jamás probarán. Los animales tienen la tendencia a consumir sólo aquellos alimentos que conocen asegurándose de este modo de consumir únicamente alimentos que no les han causado problemas (Rozin, 1977). La selección de estos alimentos se puede hacer por transferencia social al comer lo que otros miembros de su especie comen (Gales, 1977), o por experiencia propia de cada animal. En el último caso el animal determina si el alimento es seguro o no, pero es necesario que tome sus precauciones dado que si no conoce el alimento, no conoce las consecuencias que su ingestión le pueda traer, por lo que consumirlo abiertamente podría ser peligroso, lo que provoca su preferencia por alimentos conocidos.

Sin embargo, el tener una mayor variedad de alimentos potenciales aumenta sus posibilidades de sobrevivir, ya que no depende forzosamente de la disponibilidad de un alimento que puede agotarse o ser inaccesible por algún motivo (Rozin, 1977). Como ya se mencionó, consumir abiertamente un alimento nuevo puede ser peligroso, de modo que lo que hace el organismo es consumirlo en cantidades pequeñas. Esta conducta de precaución hacia los alimentos nuevos es conocida como *neofobia* (temor a lo nuevo) a los sabores (Domjan, 1976). Si el consumo del nuevo alimento no le provocó ningún tipo de intoxicación, la siguiente vez que el animal lo encuentra consumirá un poco más. Esta conducta indica que el animal *recuerda* que la última vez que lo probó no le provocó

ningún daño, a este proceso se le conoce como atenuación de la neofobia (Domjan, 1976) y es una conducta que indica que el animal etiqueta como *seguro* un alimento (Siegel, 1974).

Durante la atenuación de la neofobia, como ya se mencionó, el animal aprende que un cierto sabor no representa ningún peligro, por lo que se puede observar un aumento en su consumo en presentaciones posteriores. Esta tarea puede ser utilizada en el laboratorio para determinar los mecanismos involucrados tanto en la detección de la novedad, como en el establecimiento de una memoria de lo *seguro* (Siegel, 1976).

Se ha determinado que esta conducta depende del número y duración de las exposiciones que tenga el animal al estímulo gustativo (Domjan, 1976). Usando siempre el mismo tiempo de exposición al sabor, el número de presentaciones necesarias para atenuar la neofobia depende de la intensidad del mismo, es decir, de su concentración (Miller y Holzman, 1981).

#### *Inhibición latente.*

La inhibición latente (IL) en el CAS fue reportada por primera vez por Revusky y Bedarf (Revusky y Bedarf, 1967), quienes demostraron que una rata tendrá un CAS preferentemente hacia sabores nuevos y no hacia sabores familiares. Esto se debe, según los autores, a que el animal ha etiquetado el sabor como seguro, lo cuál interfiere con el aprendizaje del CAS. Esto obedece a que en un ambiente natural, el animal necesita ser capaz de reconocer aquellos alimentos que no le son dañinos y mantener una preferencia por estos, de lo contrario, un evento casual que le produjera malestar después de comer su

alimento habitual, o el comer este junto con otro que le produzca malestar, le haría tener aversión a su principal fuente de nutrientes, lo cuál podría limitar enormemente su probabilidad de sobrevivir en ambientes con poca diversidad de alimentos.

La IL se puede inducir con una sola preexposición al sabor que se ocupará para el entrenamiento en el CAS (Siegel, 1974) y también es bloqueada por la aplicación de escopolamina en CI antes de que el animal pruebe el nuevo sabor (Naor y Dudai, 1997).

### **MECANISMOS INDEPENDIENTES PARA EL ETIQUETAMIENTO DE UN SABOR COMO AVERSIVO O SEGURO.**

Los aprendizajes mencionados pueden ser desencadenados por el mismo estímulo gustativo dependiendo de las consecuencias que el consumo del mismo tenga para el animal. Existen reportes en la literatura donde se propone que el aprendizaje de lo seguro y de lo aversivo emplean diferentes mecanismos.

Buresova y Bures (1980) demostraron que durante la primera hora posterior al consumo de un sabor novedoso (jugo de manzana) podían impedir la atenuación de la neofobia con tratamientos como choques electroconvulsivos, hipotermia, así como el anestesiarse al animal con éter o con pentobarbital sódico, tratamientos que no tienen efectos sobre el CAS cuando son aplicados entre el EC y el EI (Rozin y Ree, 1972). Más recientemente, Gutiérrez y colaboradores (Gutiérrez et al, 2001), demostraron que el bloqueo temporal de los receptores muscarínicos en la corteza insular impide la atenuación de la neofobia aún cuando este bloqueo se induce de 0 a 2 horas después de que el animal consume por

primera vez el sabor novedoso. Este tratamiento no tiene efecto alguno en el CAS (Naor y Dudai, 1996) por lo que este dato podría estar aportando un mecanismo neuroquímico que participe en el fenómeno estudiado por Buresova (Buresova y Bures, 1980).

El trabajo de Gutiérrez et al, sugiere que el sistema colinérgico en la corteza insular tiene una participación importante en el etiquetamiento de un sabor nuevo como aversivo o como seguro.

### **CORTEZA INSULAR, ACETILCOLINA (ACh) Y APRENDIZAJES GUSTATIVOS.**

La CI es el área del cerebro en la que se han observado más procesos asociados a aprendizajes dependientes de estímulos gustativos, la mayoría de ellos dependientes de la actividad colinérgica, por lo que serán precisamente estos dos factores en los que se centra la presente tesis.

La corteza insular (CI) es una región de la corteza temporal de la rata. La corteza gustativa se encuentra en la corteza insular agranular y ha sido caracterizada principalmente con base en estudios electrofisiológicos, los cuales demostraron que esta corteza respondía a la estimulación de la lengua con sabores, y no con cambios de temperatura o estimulación táctil (Braun, 1990).

La corteza gustativa presenta conexiones recíprocas con la amígdala (Yamamoto et al, 1994), y con el núcleo parabraquial (Yamamoto et al, 1994; Reilly, 1999) eferencias

provenientes del Nucleo Basal Magnocelular (NBM) (López-García et al, 1993; Bičlavská y Roldán, 1996; Gutiérrez et al, 1997; Gutiérrez et al, 1999b; Gutiérrez et al, 1999c; Zaborszky y Duque, 2000) y el tálamo (Yamamoto et al, 1994; Smith y St John, 1999; Reilly, 1999), y aferencias hacia el núcleo del tracto solitario (Schafe et al, 1998\*).

Varios autores han involucrado a la corteza insular en el aprendizaje del CAS (Bermúdez-Rattoni et al, 1987; López-García et al, 1990; Bermúdez-Rattoni y McCaugh, 1991; Gallo et al, 1992; Yamamoto et al, 1994; Rosenblum et al, 1995; Yamamoto et al, 1995; Naor y Dudai, 1996; Nerad et al, 1996; Gutiérrez et al, 1997; Miranda et al, 1997; Rosenblum et al, 1997; Escobar et al, 1998a; Escobar et al, 1998b; Ormsby et al, 1998; Schafe et al, 1998; Cubero et al, 1999; Gutiérrez et al, 1999<sup>a</sup>; Gutiérrez et al 1999b; Gutiérrez et al 1999c; Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). Recientemente también se ha visto implicada con la atenuación de la neofobia a los sabores (Gutiérrez et al, 2001; Swank y Sweatt, 2001).

#### **ACh y Aprendizaje.**

Se ha reportado un incremento en la liberación de acetilcolina en la corteza en tareas de condicionamiento operante<sup>1</sup>, cuando el animal lleva a cabo la asociación (Orsetti et al, 1996), liberación que no se presenta cuando el animal realiza la misma acción de palanqueo una vez que ha sido entrenado, lo cual sugiere una participación importante del sistema colinérgico en las primeras etapas del aprendizaje.

---

<sup>1</sup> En las tareas de condicionamiento operante los animales son entrenados a activar una palanca para recibir algún tipo de recompensa como comida o agua.

Se ha demostrado además una relación directa entre las habilidades cognitivas de un animal y la actividad de la Colin-Acetil Transferasa (ChAT) (la enzima encargada de sintetizar ACh), usando para este fin ratas criadas en ambientes con una mayor cantidad de estímulos como rampas y juegos (ambientes enriquecidos), y comparándolas con ratas criadas en ambientes con pocos estímulos (ambientes pobres), teniendo las primeras una mayor actividad de ChAT en el núcleo caudado y un mejor desempeño en tareas cognitivas (Park et al, 1992).

Existe también un incremento en la síntesis de ChAT en la corteza auditiva como repuesta a un condicionamiento Pavloviano, incremento que además es afectado por la cualidad predictiva del estímulo, incrementándose cuando el estímulo (en este caso auditivo) señala la proximidad de un estímulo aversivo. Este aumento en la síntesis de ChAT va acompañado de una conducta de acecho, conducta que refleja una actitud de atención (Oh et al, 1996). Este descubrimiento confirma la idea de algunos autores de la participación del sistema colinérgico en procesos de atención (Baxter y Chiba, 1999).

En el caso de la memoria gustativa, también se ha observado un incremento considerable en la liberación de ACh en la CI asociada a la presentación de un estímulo gustativo novedoso, el cual desaparece una vez que la novedad del estímulo se pierde por medio de presentaciones consecutivas (Miranda et al, 2000).

Lo anterior concuerda con trabajos anteriores que indican una participación importante de la ACh en la CI para la adquisición del CAS, así como la importancia de la novedad del estímulo gustativo, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos en CI impide el aprendizaje de esta tarea (Naor y Dudai, 1996). Este efecto sólo se ve al aplicar el fármaco en la CI e impide la señalización del sabor novedoso, efecto que se ve al probarlo en la tarea de inhibición latente ya que también se ve afectada por la inyección del antagonista muscarínico escopolamina en la CI antes de la presentación del estímulo gustativo, indicando que la ACh en la CI participa en el reconocimiento del sabor novedoso y la formación de la memoria gustativa (Naor y Dudai, 1996). Como ya se mencionó, también se ha demostrado la participación del sistema colinérgico en la CI en la atenuación de la neofobia a los sabores (Gutiérrez et al, 2001).

#### **OBJETIVOS DE LA TESIS.**

Los datos anteriores sugieren lo siguiente:

- a) El consumo de un sabor novedoso genera en la corteza insular diferentes procesos involucrados en el etiquetamiento del sabor como aversivo o como seguro.
- b) El sistema colinérgico en la corteza insular participa en ambos procesos.
- c) El sistema colinérgico en la corteza insular puede estar participando de forma diferente en el aprendizaje de aversión o seguridad de un sabor.

Por lo tanto, esta tesis tiene por objetivo determinar el papel del sistema colinérgico en la corteza insular en el proceso de etiquetamiento de un sabor novedoso como seguro o aversivo.

**EXPERIMENTO 1.- Efectos sobre el aprendizaje del CAS y la atenuación de la neofobia de la inyección de escopolamina en la corteza insular antes del consumo de sacarina como sabor novedoso.**

En los experimentos de Gutiérrez (Gutiérrez et al, 2001) y de Naor (Naor y Dudai, 1997) se utilizan diferentes concentraciones de sacarina (0.5 % y 0.1 % respectivamente) lo cuál podría estar generando diferentes mecanismos en la corteza insular que responden a alguna(s) cualidad(es) del estímulo gustativo, por lo cuál es necesario descartar la posibilidad de efectos en la participación del sistema colinérgico debidos a estas variables.

Debido a lo anterior, el objetivo del primer experimento es establecer la posibilidad de inducir un CAS detectable con sacarina al 0.5%, así como determinar si el cambio en la concentración de la sacarina (de 0.1% utilizado por Naor y Dudai, al 0.5% utilizado por Gutiérrez) tiene algún efecto sobre la sensibilidad del CAS a manipulaciones del sistema colinérgico, generando de este modo diferencias en la participación de este neurotransmisor. Para estos se estandarizará el CAS con sacarina 0.5 %, y el tiempo entre la primera y la segunda exposición al sabor se recorrerá a 3 días para ajustarla al protocolo del CAS, en lugar de un solo día como en el protocolo de atenuación de la neofobia, homogeneizando de este modo las variables involucradas en los aprendizajes gustativos que se utilizarán, y se intentará reproducir el resultado obtenido por Naor y Dudai con sacarina

al 0.1 %, es decir, bloquear el aprendizaje del CAS con la aplicación de escopolamina en CI antes de que el animal consuma el sabor (Naor y Dudai, 1997), y compararlo con el obtenido por Gutiérrez en neofobia.

## **METODOLOGIA.**

### ***Sujetos.***

Se utilizaron 43 ratas de la cepa Wistar del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con un peso de 280-310 g al inicio del experimento. Se mantuvieron en cajas individuales en un ciclo normal de 12 h luz 12 h oscuridad. Todas las manipulaciones y procedimientos conductuales se llevaron a cabo durante la fase de luz. Las ratas tuvieron agua y comida *ad libitum* excepto durante los procedimientos conductuales.

### ***Implantación de cánulas.***

Para la implantación de cánulas las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso). Una vez bajo los efectos de la anestesia se les implantaron cánulas bilaterales 2.5 milímetros arriba de la corteza insular con base en las coordenadas de Paxinos (Paxinos y Watson, 1986) AP=+1.2, LAT=±5.5, DV=3 con respecto a Bregma. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con cemento dental y 2 tornillos.

### *Fármacos.*

Se utilizó como vehículo una solución artificial de líquido cefaloraquídeo (Ringer) (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  19 mM y Glucosa 3.3 mM). Como bloqueador de los receptores muscarínicos se utilizó hidrobromuro de escopolamina(SIGMA) 156 mM en ringer.

### *Procedimiento conductual*

#### *Condicionamiento Aversivo a los Sabores.*

Se les retiró el bebedero a las ratas y se les sometió a un régimen de privación de agua de 23 h 45 min con 15 minutos de acceso al agua al día. Su consumo se registró todos los días durante 3 días. El cuarto día el agua fue sustituida por una solución de sacarina al 0.5 %, 15 minutos después de que se les retiró la sacarina, las ratas recibieron una inyección de LiCl 0.4 M (7.5 ml/Kg de peso). Los días 5 y 6 las ratas tuvieron nuevamente acceso al agua por 15 minutos. Del día 6 al 9 se les presentó sacarina nuevamente, seguida por 15 minutos de acceso al agua para evitar deshidratación. Este proceso se repitió durante 2 días más después de la prueba.

#### *Atenuación de la neofobia.*

El procedimiento conductual para la atenuación de la neofobia fue esencialmente igual al del CAS, con la diferencia de que estas ratas no recibieron inyección de LiCl, y tuvieron

acceso a 15 minutos de agua después de la sacarina para evitar la deshidratación. Este proceso se repite durante 2 días más después del día de la prueba del CAS (pru1/neo2).

### ***Microinyecciones.***

Las ratas recibieron una inyección bilateral de vehículo o escopolamina (dependiendo el grupo) 20 minutos antes de consumir la sacarina. Las inyecciones se hicieron a través de una aguja dental que bajó hasta la coordenada de corteza insular (DV=5.5), la aguja se encontraba conectada a una bomba de microinfusión a través de una tubería de polietileno. Se les inyectó un volumen de 0.5  $\mu$ l por lado en un tiempo total de 1 minuto, se dejaron pasar 2 minutos adicionales antes de retirar la aguja para permitir una mejor difusión del fármaco.

Las ratas quedaron divididas en 6 grupos de la siguiente manera:

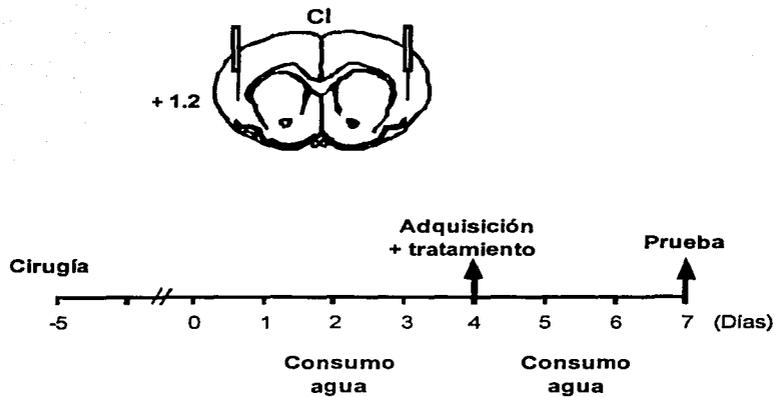
<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>No. DE RATAS</b>
Escop-Neo	Neofobia con escopoloamina 20 minutos antes de la sacarina.	7
Escop-CAS	CAS con escopolamina 20 minutos antes de la sacarina.	7
Vehículo-CAS	CAS con inyección de vehículo 20 minutos antes de	7

	la sacarina.	
Vehículo-Neo	Neofobia con inyección de vehículo 20 minutos antes de la sacarina.	9
Ctrl Neo	Neofobia intacto	5
Ctrl CAS	CAS intacto	8

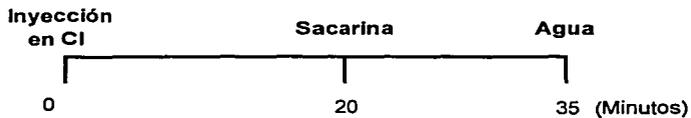
### *Histología.*

Para confirmar la posición de las cánulas y por lo tanto el lugar de la inyección, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital y posteriormente perfundidas a través de la aorta ascendente con solución salina (NaCl 0.15 M) seguida de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M. Posteriormente los cerebros se dejaron en paraformaldehído durante 24 h a 4 °C, después de las cuáles fueron cambiados a una solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfatos 0.2 M y fueron almacenados a una temperatura de 4 °C un mínimo de 3 días hasta que fueron cortados.

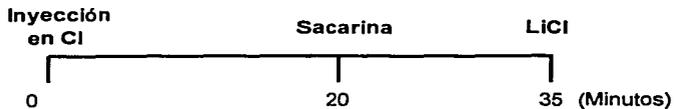
Después de cortados, los cerebros se montaron en portaobjetos con gelatina y se tiñeron con la técnica de Nissl (violeta de crecilo).



### Neofobia



### CAS



**Figura 1. Protocolo del experimento 1.**

## RESULTADOS.

### *Histología.*

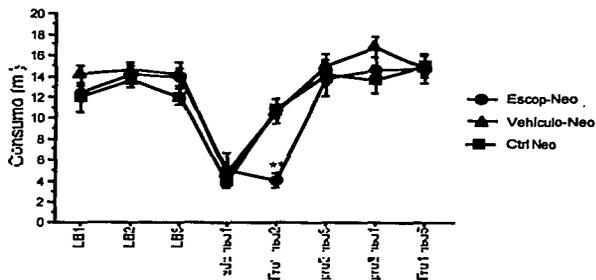
Ningún animal fue retirado del análisis por cánulas mal colocadas.

*Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en la CI antes del consumo de un sabor novedoso, en la atenuación de la neofobia y el CAS.*

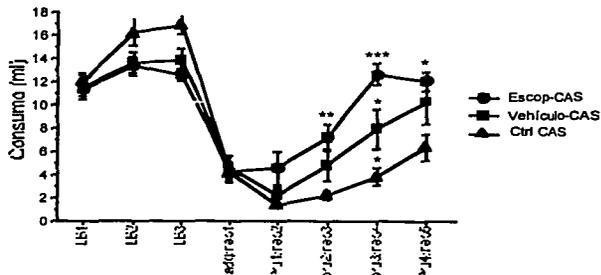
En todos los casos se utilizó una prueba estadística ANOVA de una vía y un análisis Post Hoc de Fisher para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos.

El análisis estadístico se realizó por separado para los grupos de CAS y de Atenuación de la Neofobia.

La inyección de escopolamina en la CI 20 minutos antes del consumo de un sabor novedoso provoca, como ya se había reportado, un recorrimiento en la atenuación de la neofobia existiendo diferencias significativas debidas al grupo ( $F_{2,19}=13.348$ ,  $p<0.01$ ), entre el grupo intacto o vehículo y el grupo experimental en el siguiente consumo de sacarina (pru1/neo2) ( $p<0.01$ ), sin embargo este efecto, se perdió en el tercer día de consumo de sacarina, donde no hay diferencias significativas entre el grupo experimental y el control, a partir de ese día se comportó igual que estos grupos (Gráfica 1).



Gráfica 1. Efecto de la inyección de escopolamina en CI 20 minutos antes del consumo de sacarina en la atenuación de la neofobia (promedio  $\pm$  error estándar) (\*\*\*)= $P < 0.01$ ).



Gráfica 2. Efecto de la inyección de escopolamina en CI 20 minutos antes del consumo de sacarina en el CAS (promedio  $\pm$  error estándar) (\*= $P < 0.05$ , \*\*= $P < 0.01$ , \*\*\*= $P < 0.0001$ ).

Comparando el grupo experimental de CAS contra los controles intacto y vehículo de este aprendizaje, el día pru1/neo2 hubo diferencias significativas debidas al grupo el día pru2/neo3 ( $F_{2,19}=7.29$ ,  $p<0.01$ ) sólo contra el control intacto ( $p<0.01$ ) (Gráfica 2), mientras que el día pru3/neo4 ( $F_{2,19}=14.11$ ) sí hubo diferencias contra el control intacto y el control vehículo ( $p<0.0001$  y  $p<0.05$ ), y el día pru4/neo5 ( $F_{2,19}=4.67$ ,  $p<0.05$ ) sólo hubo diferencias con respecto al control intacto ( $p<0.01$ ) (Gráfica 2).

**EXPERIMENTO 2.- Efectos sobre el aprendizaje del CAS y la atenuación de la neofobia de la inyección de escopolamina en la corteza insular después del consumo de sacarina como sabor novedoso.**

En el experimento uno se caracterizó el CAS con sacarina al 0.5 % y se comprobó la participación de los receptores muscarínicos en CI en el aprendizaje de esta tarea al igual que en la atenuación de la neofobia al mismo estímulo gustativo. El objetivo del experimento 2 es comprobar la posible participación diferencial del sistema colinérgico en la CI en el etiquetamiento de un sabor novedoso como seguro o como aversivo. Para esto se inyectará escopolamina en la CI inmediatamente después de la exposición al estímulo gustativo, tratamiento que ya se sabe bloquea la atenuación de la neofobia, pero cuyo efecto en el CAS con sacarina al 0.5% se desconoce. Sin embargo, con base en los resultados del experimento 1 se espera no tenga efectos sobre este aprendizaje.

## **METODOLOGÍA.**

### ***Sujetos.***

Se utilizaron para este experimento 41 ratas macho de la cepa wistar del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Las ratas se mantuvieron en las mismas condiciones que en el experimento I

Las metodologías utilizadas fueron exactamente las mismas utilizadas en el experimento I, siendo la única diferencia el momento de la inyección intracerebral, que en este caso se dio inmediatamente después de los 15 minutos de acceso a la sacarina.

Las ratas quedaron divididas en 6 grupos de la siguiente manera:

<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>No. DE RATAS</b>
Neo-Escop	Neofobia con escopolamina inmediatamente después de la sacarina.	6
CAS-Escop	CAS con escopolamina inmediatamente después de la sacarina.	8
Cas-Vehículo	CAS con inyección de	6

	vehículo inmediatamente después de la sacarina.	
Neo-Vehículo	Neofobia con inyección de vehículo inmediatamente después de la sacarina.	7
Ctrl Neo	Neofobia intacto	5
Ctrl CAS	CAS intacto	8

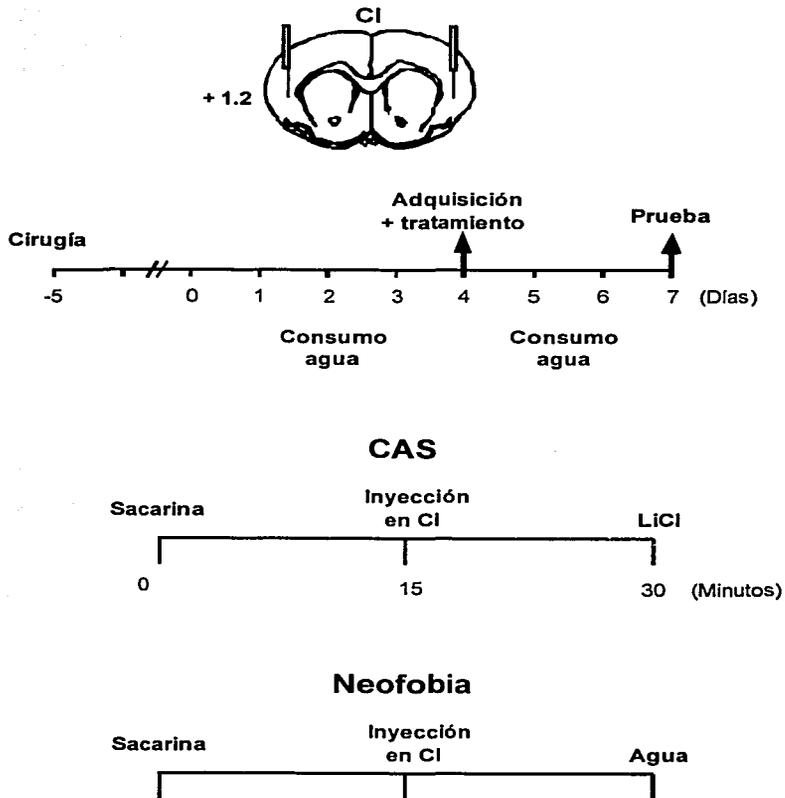


Figura 2. Protocolo del experimento 2.

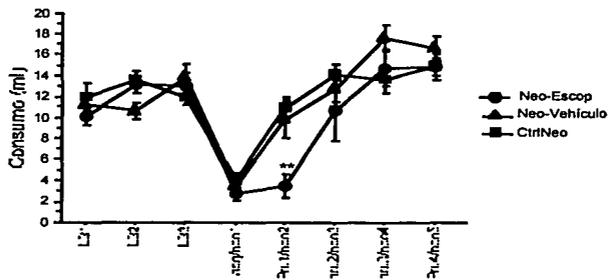
## **RESULTADOS.**

### ***Histología.***

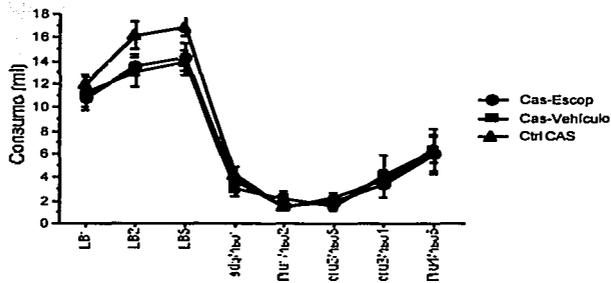
Ningún animal fue retirado del análisis por mala colocación de cánulas.

***Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en la CI después del consumo de un sabor novedoso, en la atenuación de la neofobia y el CAS.***

La inyección de escopolamina en la CI inmediatamente después del consumo de un sabor novedoso provoca un recorrimiento en la atenuación de la neofobia, es decir, el primer aumento en el consumo de sacarina se observó un día después de que el animal probó la sacarina y no recibió inyección de escopolamina (Gráfica 3), teniendo diferencias significativas debidas al grupo ( $F_{2,17}=8.26$ ,  $p<0.01$ ) con los controles intacto y vehículo de neofobia el día pru1/neo2 ( $p<0.01$  para ambos), perdiendo la significancia el día siguiente.



**Gráfica 3. Efectos de la inyección de escopolamina en CI inmediatamente después del consumo de sacarina sobre la atenuación de la neofobia (promedio  $\pm$  error estándar) (\*\*P<0.01).**



**Gráfica 4. Efectos de la inyección de escopolamina en CI inmediatamente después del consumo de sacarina sobre el CAS (promedio  $\pm$  error estándar).**

En el caso del CAS, la inyección de escopolamina inmediatamente después del consumo del sabor novedoso no tuvo ningún efecto en la eficiencia de este aprendizaje, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en los consumos del grupo experimental y los controles intacto y vehículo en ninguno de los días probados (Gráfica 4).

### **EXPERIMENTO 3.- Participación del sistema colinérgico en la corteza insular en el fenómeno de inhibición latente.**

Los resultados anteriores apoyan la idea de una participación diferencial del sistema colinérgico en el etiquetamiento de un sabor novedoso. Sin embargo, esta participación diferencial puede deberse a diferencias únicamente inherentes a la tarea, y no representar una diferencia real entre el aprendizaje de lo seguro y lo aversivo, es decir, una diferencia real en la forma en que el animal procesa los estímulos que se etiquetan como seguros o aversivos.

Por lo tanto, el objetivo del tercer experimento es resolver este problema mediante el estudio del efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular sobre la inhibición latente, otra tarea en la cuál el animal etiqueta un sabor como seguro.

Resultados preliminares del laboratorio demostraron que la concentración utilizada para los dos experimentos anteriores (sacarina 0.5 %) es tan alta que requiere de varias preexposiciones para inducir una inhibición latente observable (datos no presentados), por lo que se utilizó la reportada por Naor (0.1 %)(Naor y Dudai, 1997), ya que los 2 experimentos anteriores sugieren que este cambio en la concentración no afecta el papel de

la actividad colinérgica en la CI en aprendizajes gustativos, que es precisamente lo que se va a estudiar.

## **METODOLOGÍA.**

### ***Sujetos.***

Se utilizaron para este experimento 26 ratas macho en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores.

### ***Implantación de cánulas.***

La implantación de cánulas se hizo del mismo modo que en los experimentos anteriores.

### ***Fármacos.***

El vehículo y el fármaco ocupados en este experimento fueron los mismos que en los experimentos pasados.

### ***Procedimiento conductual.***

### ***Inhibición latente.***

Se les retiró el bebedero a las ratas y se les sometió a un régimen de privación de agua de 23 h 45 min con 15 minutos de acceso al agua al día. Su consumo se registró todos los días durante 3 días. El cuarto día, a los animales se les sustituyó el agua por una solución de sacarina al 0.1 % (todos menos los controles de CAS). El quinto día todos los animales recibieron sacarina al 0.1 %, seguida 15 minutos después por una inyección i.p. de LiCl 0.4 M (7.5 ml/Kg de peso). Los días 6 y 7 a las ratas se les dió agua durante 15 minutos. El día 8 (prueba) se les presentó nuevamente sacarina al 0.1 %.

#### *Microinyecciones.*

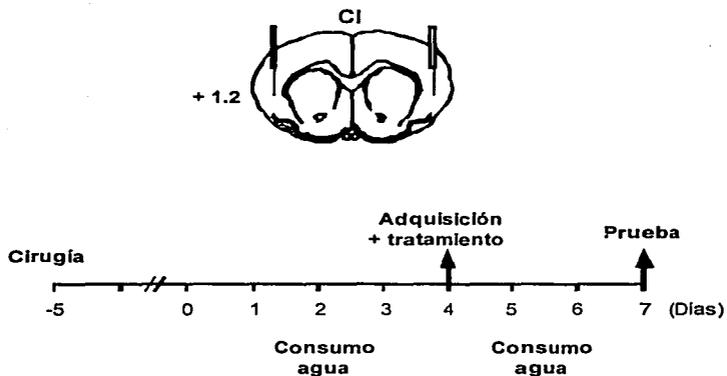
Las microinyecciones fueron realizadas el día de la preexposición al sabor, de la misma forma que en los experimentos pasados, pero esta vez, dependiendo el grupo, se les inyectó vehículo o escopolamina 20 minutos antes de probar la sacarina, o inmediatamente después de tomarla.

Dado que en los experimentos anteriores se demostró que la inyección del vehículo tenía el mismo efecto en el aprendizaje (seguro o aversivo) si se inyectaba antes o después del sabor, en esta ocasión se inyectó únicamente antes, quedando los grupos de la siguiente manera:

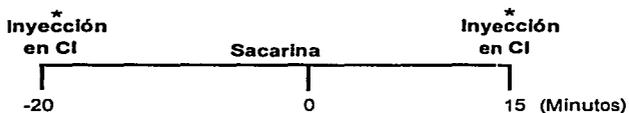
GRUPO	TRATAMIENTO	No. DE RATAS
Escop antes	Escopolamina en CI 20 minutos antes del consumo de sacarina.	9
Escop después	Escopolamina en CI inmediatamente después del consumo de sacarina.	8
Vehículo antes	Inyección de vehículo en CI 20 minutos antes del consumo de sacarina.	9

### *Histología.*

La histología se llevó a cabo del mismo modo que en los experimentos anteriores.



### **PREEXPOSICIÓN**



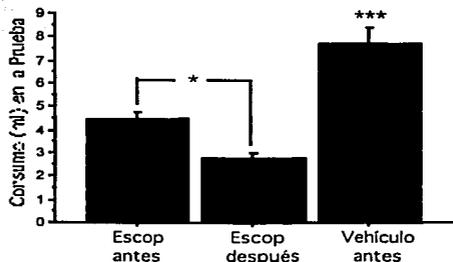
### **CAS**

Figura 3. Protocolo del experimento 3. \*Sólo se dio la inyección en uno de los 2 tiempos (-20 ó 15).

## RESULTADOS

La inyección de escopolamina en la corteza insular tuvo en la inhibición latente efectos similares a los obtenidos en la atenuación de la neofobia.

Una prueba de ANOVA de una vía reveló un efecto del grupo en el día de la prueba ( $F_{2,23}=23.844$ ,  $p<0.0001$ ). Una prueba Post Hoc de Fisher reveló que la inyección de escopolamina en la corteza insular aumentó el consumo de sacarina durante la prueba en comparación con el grupo vehículo, tanto en la inyección antes ( $p<0.001$ ) como después ( $p<0.0001$ ) (Gráfica 5). Hubo efecto también del tiempo de inyección de escopolamina, existiendo diferencia entre el grupo inyectado antes y el grupo inyectado después ( $p<0.05$ ) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Consumo de sacarina durante la prueba (promedio + error estándar) (\*= $P<0.05$ ).

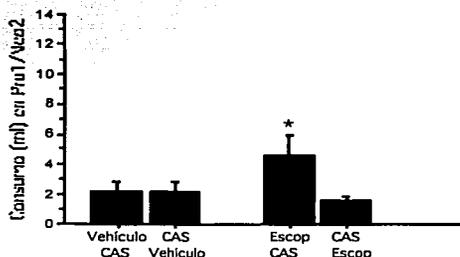
## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

*El sistema colinérgico en la corteza insular tiene una participación diferencial en el etiquetamiento de un sabor novedoso como aversivo o seguro.*

El etiquetamiento de un sabor novedoso presenta una sensibilidad diferente al bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular dependiendo de si este se etiqueta como aversivo o como seguro, lo que sugiere que *el sistema colinérgico en la corteza insular tiene una diferente temporalidad en su participación para el etiquetamiento de un sabor nuevo como aversivo o como seguro.*

En el experimento 1 puede observarse que no hay diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo vehículo de CAS, a excepción del día pru3/neo4 (Gráfica 2). Esto puede deberse a que el efecto de la escopolamina sobre el CAS nunca es del 100%, aunque se observa una pérdida significativa (Berman et al, 2000); en este caso el bajo consumo inducido por la alta concentración de la sacarina pudo haber potenciado este aprendizaje residual. Sin embargo, con las inyecciones después del consumo del estímulo gustativo, la diferencia entre ambos tipos de aprendizaje se hace muy obvia en los experimentos 2 y 3 (Gráficas 3-5), donde se puede observar que tras el tiempo de consumo de sacarina (15 minutos después de que empieza a beber) el aprendizaje del CAS no se ve afectado por el bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular, a diferencia de la atenuación de la neofobia y la inhibición latente.

Además, una prueba de t no pareada revela la existencia de una diferencia significativa en el consumo de sacarina en la segunda presentación (pru1/neo2) entre los animales entrenados en CAS y que fueron inyectados con escopolamina antes de la sacarina, y los que recibieron la inyección de este fármaco después del consumo de sacarina ( $P=0.0461$ ), efecto que no se encuentra al comparar los animales con inyección de vehículo antes o después de la sacarina ( $p=0.9604$ ) (Gráfica 6). Esto indica que los efectos sobre el CAS de la inyección de escopolamina en la corteza insular son diferentes dependiendo de si esta se inyecta antes o después del consumo del sabor novedoso, teniendo efectos en el consumo de sacarina durante la prueba únicamente cuando la inyección se realiza antes del consumo de sacarina.



Gráfica 6.- Consumo de sacarina en el día Pru1/Neo2 en los grupos entrenados en CAS y que recibieron inyecciones de vehículo o escopolamina en la corteza insular antes o después del primer consumo de sacarina (Adq/Neo1) (promedio + error estándar) (\*= $P<0.05$ ).

En el caso de la inhibición latente (experimento 3) podemos observar que el efecto sobre esta tarea de la inyección de escopolamina en corteza insular antes de probar el sabor novedoso es menor al obtenido al realizar la inyección después de que el animal acaba de beber, ya que si bien el bloqueo de los receptores muscarínicos en la CI tiene efectos sobre este aprendizaje tanto si se inyecta antes como después del sabor, la inyección de escopolamina en la CI después de que el animal tomó la sacarina tiene un efecto notablemente mayor (Gráfica 5).

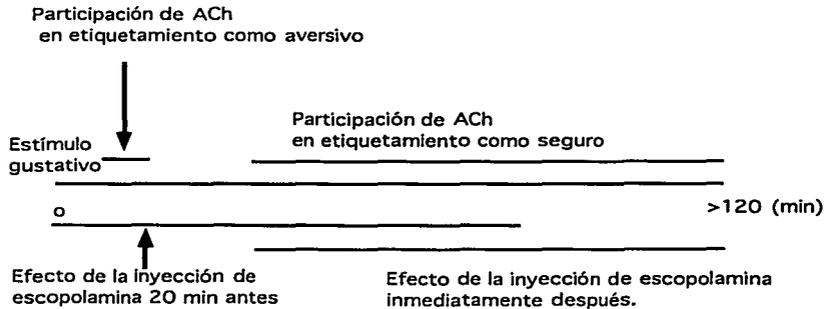
Gutiérrez y colaboradores reportaron que la atenuación de la neofobia era afectada por la inyección de escopolamina en la CI hasta 2 horas después del consumo del sabor (Gutiérrez et al, 2001). Tomando en conjunto los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados anteriormente por Gutiérrez, sugieren que el periodo de actividad colinérgica necesario para el etiquetamiento de un sabor como seguro tiene una temporalidad muy diferente a la del establecimiento de una memoria aversiva, teniendo una longitud mayor y ubicándose de minutos a horas después del consumo del sabor novedoso.

Con base en estos resultados, se puede proponer que los efectos encontrados en el etiquetamiento como seguro de un sabor con el uso de escopolamina antes del consumo del mismo, se deben a un efecto parcial sobre el periodo posterior de actividad colinérgica, no alcanzando a cubrirlo completamente, por lo cuál el efecto sobre este tipo de aprendizaje es

menor

(Figura

4).



**Figura 4. Modelo de la participación de la ACh en la CI en el etiquetamiento de un sabor como aversivo o como seguro.**

Dado que el tratamiento fue aplicado inmediatamente después de que el animal consumió el sabor, podemos concluir que los procesos activos en la corteza insular en ese momento fueron desencadenados por el estímulo gustativo mucho antes de conocer las consecuencias que este le traería al organismo, y sin embargo, se pueden afectar diferencialmente el aprendizaje de lo seguro o de lo aversivo con el mismo tratamiento. Lo cual indica que un estímulo gustativo nuevo desencadena en el animal diferentes mecanismos que lo preparan para formar una memoria eficiente de ese evento, dado que es de vital importancia que recuerde exactamente las consecuencias del consumo de este sabor.

Lo anterior quiere decir que el consumo de un sabor novedoso induce, entre otras cosas, mecanismos que participan en el etiquetamiento del sabor, tanto aversivo como seguro, mucho antes sean determinadas las consecuencias postingestionales de este alimento.

Esto ya había sido observado con los tratamientos ocupados por Buresova (Buresova y Bures, 1980). Con base en los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir que el sistema colinérgico en la corteza insular es un mecanismo específico a nivel cerebral que diferencia el aprendizaje aversivo del aprendizaje de seguridad.

Como ya se mencionó en la introducción, las ratas pueden aprender un CAS a pesar de encontrarse inconscientes cuando se induce el malestar gástrico, mientras que el mismo tratamiento impide el aprendizaje de lo seguro (Buresova y Bures, 1980). Esto, según propuso Bures (Bures y Buresova, 1982-1983), quiere decir que para un animal es mucho más vital recordar que un alimento le hizo daño, a recordar que algo no tuvo consecuencias en su salud, dado que si no recuerda que un alimento es tóxico, está arriesgándose a morir la próxima vez que lo consuma, mientras que el olvidar que un alimento es seguro simplemente le hace tener nuevamente precaución hacia este.

*El consumo de un sabor novedoso desencadena al menos 2 eventos de actividad colinérgica en la CI.*

Con base en los resultados de esta tesis se puede proponer que el consumo de un sabor novedoso desencadena al menos 2 eventos de actividad colinérgica, uno temprano (inmediatamente al consumir el sabor) que probablemente está relacionado con el

establecimiento de una memoria de aversión a ese sabor; y uno tardío (después de 15 minutos y al menos hasta 2 horas después del consumo del sabor (Gutiérrez et al, 2001)) que está relacionado con el etiquetamiento de este como "seguro".

La activación de los receptores muscarínicos en la corteza insular desencadena una serie de eventos intracelulares cuya participación en el etiquetamiento de un sabor novedoso están por determinarse. Desafortunadamente, los tratamientos reportados hasta la fecha no permiten discernir su participación en el aprendizaje gustativo (aversivo o seguro).

Los receptores muscarínicos traducen la señal recibida a través de proteínas G, y pueden activar diferentes efectores simultáneamente incluyendo las fosfolipasas A2, C y D, así como tirosinas cinasas (PTK) y un tipo de canal de calcio no sensible a voltaje (Felder, 1995).

Algunos de los efectos que pueden tener los mecanismos anteriores pueden ser la activación de PKC (Sweatt, 2001), que puede entre otras cosas fosforilar la subunidad NR2B del receptor glutamatérgico de tipo NMDA potenciando su actividad (Liao et al, 2001; Grosshans y Browning, 2001). La importancia de la subunidad NR2B en procesos cognitivos fue demostrada ya por Tang y sus colaboradores (Tang et al, 1999) quienes aumentaron genéticamente la expresión de esta subunidad en ratones, y observaron una mayor eficiencia del receptor, así como un mejor desempeño en diferentes tareas de aprendizaje (Tang et al, 1999). Recientemente, otro grupo reportó que el bloqueo específico

de esta subunidad en la amígdala lateral, impide el aprendizaje del condicionamiento de miedo<sup>2</sup> (Rodrigues et al, 2001).

Otro efecto de la activación de PKC es la activación de MAPK, que a su vez induce la activación de CREB (Sweatt, 2001; Roberson et al, 1999), involucrándose de este modo en la expresión génica, proceso asociado al establecimiento de memoria a largo plazo (Jodar y Kaneto, 1995).

Algo que hay que recalcar es que tanto la fosforilación de NR2B (Rosenblum et al, 1997), como la activación de MAPK (Berman et al, 1998; Swank, 2000b; Swank y Sweatt, 2001), y la activación de CREB (Swank y Sweatt, 2001), son eventos que ya han sido relacionados a la detección de un estímulo gustativo novedoso en la corteza insular; además de que se ha reportado que la actividad de PKC en la corteza insular es necesaria para el aprendizaje del CAS (Yasoshima y Yamamoto, 1997).

La relevancia de todos estos eventos de señalización intracelular en el contexto de esta tesis radica en que la consecuencia final de la activación de los receptores muscarínicos estudiada en los experimentos arriba descritos, es la activación de cascadas de señalización intracelular. Estos eventos intracelulares están finamente regulados entre sí, de manera que se ven influenciados por eventos desencadenados por otros estímulos, por ejemplo, otros neurotransmisores. En el caso del aprendizaje gustativo, se ha detectado la participación de

---

<sup>2</sup> En la tarea de condicionamiento de miedo el animal es colocado en una caja donde, tras escuchar un sonido, recibe una descarga eléctrica en los pies. Durante la prueba el animal es expuesto nuevamente al tono, lo que le induce "respuestas de miedo", la respuesta más utilizada para medir el miedo es el congelamiento. El porcentaje del tiempo que el animal se mantenga "congelado" durante la prueba es tomado como indicador de aprendizaje.

glutamato, noradrenalina, etc, en la corteza insular en este tipo de aprendizajes, dado que su bloqueo impide el aprendizaje del CAS, así como el aprendizaje de la inhibición latente (Berman et al, 2000). Por lo tanto, el efecto diferencial que tiene la manipulación colinérgica en la corteza insular sobre el etiquetamiento de un sabor como seguro o como aversivo, puede deberse a el favorecimiento de ciertas cascadas de señalización intracelular desencadenadas por la activación de los receptores muscarínicos bajo la influencia de la activación previa de otros tipos de receptores.

#### **ESPECULACIONES.**

##### *Diferentes eventos desencadenados por un solo estímulo; implicaciones evolutivas.*

Otro punto interesante de este trabajo es la evidencia de que un solo estímulo puede desencadenar más de un mecanismo neuronal que, si bien comparten algunos elementos, difieren en otros. Esto ya había sido observado también por Berman (Berman y Dudai, 2001), quien encontró que durante la evocación del CAS actuaban simultáneamente 2 mecanismos hasta cierto punto independientes: la evocación del CAS y el inicio del proceso de extinción, mismo que podía ser inhibido sin afectar el primero. Esto quiere decir que dentro de una tarea se pueden estar llevando a cabo 2 procesos independientes al mismo tiempo, mientras que generalmente los estudios se enfocan a un solo proceso a la vez.

Las posibilidades que ofrece esta teoría son amplias, ya que está siendo demostrado que un estímulo es mucho más complejo de lo que se había pensado, e implica diferentes procesos

cognitivos que pueden tener diferentes finalidades, haciendo del aprendizaje un fenómeno más dinámico y de la memoria establecida una entidad menos rígida.

Una posibilidad es la demostrada en este trabajo, es decir, que un estímulo desencadene eventos relacionados con diferentes procesos cognitivos, que pueden ir desde el simple reconocimiento del estímulo como nuevo, el establecimiento de diferentes memorias, o en el caso de ser familiar, debe de traer consigo recuerdos asociados a las veces anteriores que el estímulo fue presentado.

El punto anterior nos lleva a una posibilidad interesante, aunque poco discutida: la interacción entre memorias. La memoria no necesariamente es estática, y lo que aprendemos puede no crear una memoria independiente en el cerebro, sino más bien integrarse a otras memorias relacionadas formando memorias complejas más fácilmente evocables.

Lo anterior implica 2 ventajas evolutivas inmediatas: ahorro de recursos y tener una memoria dinámica que le permita ir integrando la información del medio ambiente y de diferentes estímulos relacionados con un solo evento, por ejemplo, saber que puede consumir un alimento cuando está sobre o debajo de un arbusto, pero no cuando está cerca de una trampa, a pesar de que los estímulos que perciba del alimento (olor, forma, etc.) sean exactamente los mismos; saber que un lugar es seguro solo cuando no detecta el olor de algún depredador; aprender por ejemplo, que puede encontrar el mismo fruto en un arbusto o en determinada canasta, aprendiendo también que no en todas las canastas encontrará el mismo fruto, etc.

Otro efecto de un aprendizaje que implica interacción con otras memorias es su influencia en las capacidades cognitivas del animal, como se ha demostrado en el caso del laberinto de agua. Se sabe que el receptor NMDA participa en el aprendizaje de esta tarea (Bannerman et al, 1995; Gutiérrez et al, 1999a), sin embargo, ha sido reportado que si los animales son entrenados previamente en un laberinto de agua en otro laboratorio y con claves diferentes, son capaces de aprender el nuevo laberinto a pesar de estar bajo los efectos de AP5 (bloqueador de los receptores NMDA) (Bannerman et al, 1995). Saucier por otra parte, encuentra que al entrenar previamente a las ratas en una tarea no espacial que familiariza a los animales con los requerimientos básicos de la tarea, logra que estos aprendan bajo la influencia de un fármaco que bloquea los receptores NMDA (Saucier y Cain, 1995), ellos demuestran además, que este entrenamiento previo no era capaz de recuperar la potenciación a largo plazo (LTP<sup>3</sup> por sus siglas en inglés) bajo el efecto del bloqueador de NMDA, por lo que tenemos un aprendizaje independiente de NMDA y LTP.

Otro ejemplo de interacción entre memorias es el fenómeno conocido como "reconsolidación" de la memoria. Con base en esta teoría, cuando una memoria es evocada vuelve a un estado lábil para integrar información nueva y posteriormente tiene que ser "guardada" de nuevo. Este fenómeno ya ha sido encontrado en el laberinto radial (Przybyslawski y Sara, 1997), y en el condicionamiento de miedo (Nader et al, 2000).

---

<sup>3</sup> La potenciación a largo plazo es un aumento en la eficiencia de la transmisión sináptica en una vía, expresada como un cambio en la respuesta de esta vía a una estimulación de baja frecuencia, que antes de la inducción de LTP generaba una menor respuesta. Dado que los efectos de la inducción de LTP tienen una duración de hasta semanas después de que se dio la inducción, se ha propuesto como un mecanismo

## PERSPECTIVAS A FUTURO

Está demostrado que el mismo estímulo gustativo desencadena eventos relacionados con al menos 2 aprendizajes diferentes. Actualmente se sabe de diferentes fenómenos que ocurren en la CI tras el consumo de un sabor novedoso, la identificación del proceso en el cuál participan estos eventos nos permitirá, por un lado, determinar la cantidad de procesos en los que está involucrado un estímulo gustativo; y por el otro, nos permitirá reconocer los mecanismos moleculares involucrados en cada una de ellos reconociendo de este modo puntos de convergencia y divergencia. En la tabla 1 se presentan los eventos desencadenados en CI por el consumo de un sabor novedoso hasta ahora descritos.

<b>EVENTO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>	<b>REFERENCIA</b>
Aumento en la liberación de ACh.	Va disminuyendo en sucesivas presentaciones conforme el estímulo se vuelve familiar. Es complicado establecer el papel exacto que juega, dado la dificultad de bloquear este pico de actividad colinérgica sin bloquear por completo la actividad de ACh en esa zona.	Miranda et al, 2000
Activación de ERK1/II (MAP cinasas)	Se sabe que su bloqueo impide el aprendizaje del CAS, aunque bien puede estar involucrado en más de un tipo de memoria, dado que es punto de convergencia de varias cascadas de eventos intracelulares (Sweatt, 2001).	(Berman et al, 1998; Swank, 2000b; Swank y Sweatt, 2001),
Activación de CREB	Se ha reportado una correlación entre la atenuación de la neofobia y la posible activación de CREB (se detectó la activación de la proteína que activa a CREB). Esta	Swank y Sewatt, 2001

involucrado en procesos de aprendizaje y memoria (Jodar y Kaneto, 1995), y ha sido asociado al CAS (Escobar et al, 1998a; Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000).

	<p>proteína es un factor de transcripción que induce la expresión de diferentes genes, por lo que se ha asociado al establecimiento de memoria a largo plazo (Jodar y Kaneto, 1995). Puede estar involucrada en diferentes aprendizajes gustativos, aunque probablemente el convergencia de estímulo incondicionado en el caso del CAS cambie un poco su mecanismo de activación o induzca la expresión de diferentes genes.</p>	
<p>Fosforilación de la subunidad NR2B del receptor a glutamato de tipo NMDA.</p>	<p>La fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B aumenta eficiencia del mismo, (Grosshans y Browning, 2001). El fenómeno se ha observado también en el hipocampo, relacionado con la inducción de LTP (Rosenblum et al, 1996; Rostas et al, 1996). Su participación en la atenuación de la neofobia es poco probable debido a que esta es independiente de la actividad del receptor NMDA en la corteza insular (Gutiérrez et al, 2001)</p>	<p>Rosenblum et al, 1997</p>

**Tabla 1. Eventos observados en la corteza insular tras el consumo de un sabor novedoso.**

## REFERENCIAS.

- Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RGM, (1995) Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378 (182-186).
- Baxter MG, Chiba A, (1999) Cognitive functions of the basal forebrain. *Current Opinion in Neurobiology* 9:178-183.
- Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y, (1998) Specific and differential Activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J. Neurosci* 18(23):10037-10044.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y, (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of memory trace. *J. Neurosci* 20(18):7017-7023.
- Berman DE, Dudai Y, (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2419.
- Bermúdez-Rattoni F, Fernández J, Sánchez MA, Aguilar-Robledo R, Drucker-Colín R, (1987) Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Research* 416:147-152.
- Bermúdez-Rattoni F, McGaugh JL, (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research* 549:165-170.
- Bermúdez F, Quirarte G, Prado R, (2001) Pavlov y sus perros. en *Memoria. Donde reside y cómo se forma*. Trillas, México, pp71-84.

- Bielavska E, Roldan G, (1996) Ipsilateral connections between the gustatory cortex, amygdala and parabrachial nucleus are necessary for acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research* 81:25-31.
- Braun JJ, (1990) Gustatory cortex: definition and function. en *The cerebral cortex of the rat*. MIT press, USA, pp 407-430.
- Bures J, Buresova O, (1982-1983) Ethological models in research into the neural mechanisms of short term memory. *J Physiology, Paris* 78:870-871.
- Buresova O, Bures J, (1980) Post-ingestional interference with brain functions prevents attenuation of neophobia in rats. *Behavioural Brain Research* 1:299-312
- Cubero I, Thiele TE, Bernstein IL, (1999) Insular cortex lesions and taste aversion learning: effects of conditioning method and timing of lesion. *Brain Research* 839:323-330.
- Domjan M, (1976) Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *Journal of Experimental Psychology* 2(1):17-27.
- Escobar ML, Alcocer I, Chao V, (1998a) The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Research* 812:246-251.
- Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F, (1998b) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research* 779:314-319.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F, (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research* 208-212.
- Felder CC, (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *The FASEB Journal* 9:(619-625)
- Fernández J, Bermúdez F, (2001) Clasificación de la memoria. en *Memoria. Donde reside y cómo se forma*. Trillas, México, pp 11-25.

- Freund TF, Meskenaite V, (1992)  $\gamma$ -Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:738-742.
- Galef B, (1977) Mechanisms for the social transmission of acquired food preferences from adult to weanling rats, en *Learning mechanisms in food selection* Baylor University Press, USA, pp 123-148.
- Gallo M, Roldan G, Bures J, (1992) Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research* 52:91-97.
- García J, Lasiter PA, Bermúdez-Rattoni F, Deems DA, (1985) A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 443:8-21.
- Grosshans DR, Browning MD, (2001) Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *Journal of Neurochemistry* 76:737-744.
- Gutiérrez H, Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F, (1997) Learning Impairment and Cholinergic Deafferentation after Cortical Nerve Growth Factor Deprivation. *J. Neurosci.* 17(10):3796-3803.
- Gutiérrez H, Hernández-Echegaray E, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F, (1999a) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* 89(3):751-758.
- Gutiérrez H, Gutiérrez R, Silva-Gandarias R, Estrada J, Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F, (1999b) Differential effects of 192 IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation. *Brain Research* 834:136-141.

- Gutiérrez H, Gutiérrez R, Ramírez-Trejo L, Silva-Gañdarias R, Ormsby CE, Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F, (1999c) Redundant basal forebrain modulation in taste aversion memory formation. *J. Neurosci* 19(17):7661-7669.
- Gutiérrez R, Tellez L, Bermúdez-Rattoni F, (2001) Attenuation of taste neophobia depends on activation of muscarinic receptors in the insular cortex. *Society for Neuroscience Abstracts* 31:854.6
- Jodar L, Kaneto H, (1995) Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn. J. Pharmacol.* 68:359-387.
- Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP, (2001) Evidende for direct protein kinase-C mediated modulation of N-metyl-D-aspartate receptor current. *Molecular Pharmacology* 59:960-964.
- López-García JC, Bermúdez-Rattoni F, Tapia R, (1990) Release of acetylcholine,  $\gamma$ -aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in the rat gustatory neocortex. *Brain Research* 523:100-104.
- López-García JC, Fernández-Rufz J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F, Tapia R, (1993) Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 45:147-152.
- Meisami, M, (1991) Chemoreception. en *Neural and integrative animal physiology*. Wiley-Lyss, USA, pp 335-434.
- Miller RR, Holzman AD, (1981) Neophobia: generality and function. *Behavioral and Neural Biology* 33:17-44.

- Miranda MI, López-Colomé AM, Bermúdez-Rattoni F, (1997) Recovery of taste aversion learning induced by fetal neocortex grafts: correlation with in vivo extracellular acetylcholine. *Brain Research* 759:141-148.
- Miranda MI, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F, (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research* 882:230-235.
- Naor C, Dudai Y, (1996) Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioral Brain Research* 79:61-67.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE, (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after its reactivation. *Nature* 406:722-726.
- Nerad L, Ramírez-Amaya V, Ormsby CE, Bermúdez-Rattoni F, (1996) Differential Effects of Anterior and Posterior Insular Cortex Lesions on the Acquisition of Conditioned Taste Aversion and Spatial Learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 66:44-50.
- Oh JD, Edwards RH, Woolf N, (1996) Choline acetyltransferase mRNA plasticity with Pavlovian conditioning. *Experimental Neurology* 140:95-99.
- Ormsby CE, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F, (1998) Long-Term Memory Retrieval Deficits of Learned Taste Aversions Are Ameliorated by Cortical Fetal Brain Implants. *Behavioral Neuroscience* 112(1):172-182.
- Orsetti M, Casamenti F, Pepeu G, (1996) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Research* 724:89-96.
- Park GAS, Pappas BA, Murtha SM, Ally A, (1992) Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neuroscience letters* 143:259-262.

- Paxinos G, Watson G, (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Orlando: Academic Press.
- Przybylski J, Sara SJ, (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research* 84:241-246.
- Reilly S, (1999) The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Research Bulletin* 48(3):239-254.
- Revusky SH, Bedarf EW, (1967) Association of illness with prior ingestion of novel foods. *Science* 155:219-220.
- Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieff C, Sweatt JD, (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* 19(11):4337-4348.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE, (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts acquisition but not expression of fear conditioning. *J. Neurosci* 21(17):6889-6896.
- Rosenblum K, Schul R, Meiri N, Hadari Y, Zick Y, Dudai Y, (1995) Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1157-1161.
- Rosenblum K, Dudai Y, Richter-Levin G, (1996a) Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in the rat dentate gyrus in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10457-10460.
- Rosenblum K, Berman D, Hazvi S, Dudai Y, (1996b) Carbacol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *Neuroreport* 7:1401-1404.

- Rosenblum K, Berman D, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y, (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J. Neurosci.* 17(13):5129-5135.
- Rostas JAP, Brent VA, Voss K, Errington ML, Bliss TVP, Gurd JW, (1996) Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-Methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10452-10456.
- Rozin P, Ree P, (1972) Long extension of effective CS-US intervals by anesthesia between CS and US. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 80(1):43-48.
- Rozin P, (1977) The significance of learning mechanisms in food selection: some biology, psychology, and sociology of science. en *Learning mechanisms in food selection* Baylor University Press, USA, pp 557-589.
- Saucier D, Cain DP, (1995) Spatial learning without NMDA receptor-dependent long term potentiation. *Nature* 378:186-189.
- Schafe G, Bernstein IL, (1998) Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion II. Insular ( gustatory ) cortex. *Brain Research* 800:40-47.
- Siegel S, (1974) Flavor preexposure and "learned safety". *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 87(6):1073-1082.
- Smith DV, St John SJ, (1999) Neural coding of gustatory information. *Current opinion in neurobiology* 9:427-435. - Wenk GL, (1997) The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiology of Learning and Memory* 67:85-95.
- Swank MW, (2000b), Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning. *Neuroreport* 11:1625-1630.

- Swank MW, Sweatt JD, (2001) Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J. Neurosci.* 21(10):3383-3391.
- Sweatt JD, (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving learning and memory. *Journal of neurochemistry* 76:1-10.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ, (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.
- Woolf NJ, (1996) The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory* 66:258-266.
- Woolf NJ, (1998) A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology* 55:59-77.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N, (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Research* 65:123-137.
- Yamamoto T, Fujimoto Y, Shimura T, Sakai N, (1995) Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neuroscience Research* 22:31-49.
- Yasoshima Y, Yamamoto T, (1997) Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. *Neuroreport* 8:1363-1367.
- Zaborszky L, Duque A, (2000) Local synaptic connections of basal forebrain neurons. *Behavioral Brain Research* 115:143-158.