

00322

217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Expresión de Factores Transcripcionales en Estructuras Subcorticales durante la Adquisición y Evocación de Condicionamientos Aversivos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

Heidi Miriam Zamorano Rojas

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

2003



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e imp. el contenido de mi trabajo respectivo

NOMBRE: Zamorano Rojas Heidi Miriam

FECHA: 1/04/03

FIRMA: [Signature]

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Expresión de Factores Transcripcionales en Estructuras Subcorticales durante la Adquisición y Evocación de Condicionamientos Aversivos.

realizado por Heidi Miriam Zamorano Rojas

con número de cuenta 9435595-8 , 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. Edith Sánchez Jaramillo.

Propietario Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio.

Suplente Psic. Ranier Gutiérrez Mendoza.

Suplente Dr. Gustavo Pacheco López.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.**

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA**

A mi madre por ayudarme a delinear mis sueños

A mis hermanas por su cariño y su apoyo

A mi adorado Héctor por sus enseñanzas en la biología

**A Federico Bermúdez por darme su confianza y apoyo en la
realización de este trabajo**

**A Gustavo Pacheco y Enrique Espinosa por ser mis guías
espirituales**

A Edith Sánchez y Ranier por ser mis gurus y mis amigos

**A Silvestre Alavés por la revisión de este trabajo, y sus
críticas constructivas**

A mis amigas una para todas y todas para quien se pueda:

Israela, Jimena, Vanesa, Gingin, Diana, Frida

**A la banda del labo Luis, Yolanda, Oreste, Guillaume,
Maribel**

A mi Alfonso, por iluminar mi vida con su amor

| Índice | Pág |
|---|------------|
| Introducción | 1 |
| Importancia biológica de la clasificación de los alimentos. | 1 |
| Aprendizaje. | 1 |
| Condicionamiento clásico. | 2 |
| Condicionamientos aversivos. | 3 |
| Condicionamiento aversivo a los sabores. | 5 |
| Mecanismos involucrados en el procesamiento de sabores. | 6 |
| Estructuras y mecanismos involucrados en la integración del estímulo visceral y el estímulo gustativo en el sistema nervioso central. | 7 |
| Comunicación celular. | 15 |
| Mecanismos involucrados en la memoria de corto y largo plazo. | 16 |
| Expresión de genes tempranos como herramienta en mapeo de actividad sináptica. | 17 |
| Hipótesis. | 19 |
| Justificación. | 19 |
| Objetivos generales. | 20 |
| Metodología y materiales | 21 |
| Fase 1. Activación del sistema nervioso central ante la exposición de estímulos gustativos y viscerales. | 22 |
| Metodología. | 22 |
| Resultados. | 23 |
| Conclusiones | 28 |
| Fase 2. Respuesta de los núcleos del complejo amigdalino y del núcleo paraventricular del hipotálamo después de la adquisición de un apareamiento de estímulos gustativos y viscerales. | 29 |
| Metodología. | 29 |
| Resultados | 29 |
| Conclusiones. | 32 |
| Fase 3. Activación del sistema nervioso central ante la reexposición del estímulo condicionado en el CAS. | 33 |
| Metodología. | 33 |

| | |
|---|----|
| Resultados. | 33 |
| Conclusiones. | 36 |
| Fase 4. Expresión de C-Fos posterior a una exposición repetida de estímulos gustativos y viscerales, en la adquisición y en la evocación del CAS. | 37 |
| Metodología. | 37 |
| Resultados. | 38 |
| Conclusiones. | 45 |
| Discusiones y conclusiones generales. | 46 |
| Anexo 1. | 49 |
| Anexo 2. | 51 |
| Bibliografía. | 53 |

Introducción

Importancia biológica de la clasificación de los alimentos.

La capacidad de etiquetar a los alimentos como seguros o nocivos ha sido un factor importante en la sobrevivencia de los organismos que se ha mantenido a través de la evolución.

La decisión de ingerir o no un alimento es condicionada por los efectos posteriores del consumo, ya sea que haya tenido una retroalimentación positiva o negativa en el organismo, siendo esto de gran importancia en la definición de la dieta.

Utilizando diversos modelos animales se ha propuesto que existe una preferencia innata por el sabor dulce, que podría estar relacionado con la gran cantidad de nutrientes que tienen este sabor; una aversión hacia los sabores amargos, relacionados con efectos de toxicidad y una desconfianza innata por la comida desconocida definida como neofobia^{15, 25, 26}.

La importancia principal de poder etiquetar un sabor como seguro o como tóxico es la sobrevivencia propia y de la especie, este mecanismo cognoscitivo se mantiene a través de la evolución.

Aprendizaje.

A todos los contactos que pueda tener un organismo con su medio y la integración de los mismos reciben el nombre de aprendizaje. La capacidad de aprender, almacenar el conocimiento y recordar experiencias, comenzó en algún nivel filético y se ha desarrollado a través de la evolución, aportando una gran ventaja adaptativa.

El aprendizaje y la memoria son cualidades del sistema nervioso que permiten adquirir, procesar, almacenar y recordar los diferentes contactos físicos, gustativos y visuales que se tienen con el entorno. En condiciones de laboratorio se ha podido estudiar el condicionamiento de respuesta ante la ingestión y las asociaciones que

conllevar a la unión de varios estímulos anteriores o posteriores al consumo de un sabor, el condicionamiento clásico es un ejemplo claro.

Condicionamiento Clásico

Ivan Pavlov estudió los procesos digestivos en perros; su aportación más importante fue el descubrimiento del reflejo condicionado, ahora conocido como condicionamiento clásico.

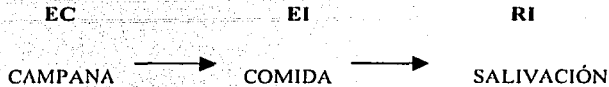
En sus estudios de fisiología de la digestión en perros Pavlov encontró que el olor de la comida (estímulo ambiental) provocaba salivación (respuesta), a la cual la denominó como respuesta incondicionada (RI), de manera similar a la comida se denominó estímulo incondicionado (EI); Al poco tiempo notó que obtenía la misma respuesta desde que entraba la gente que normalmente alimentaba a los animales a la habitación y pensó que podía utilizar otro componente que se asociara con la hora de la alimentación, se le ocurrió que el sonido de una campana podía usarse antes de alimentar a los perros. El resultado de este condicionamiento fue que en efecto al aplicar el estímulo auditivo los perros comenzaban a salivar; el sonido de la campana en los animales había adquirido la capacidad de producir una respuesta *per sé* que antes no provocaba; a este nuevo elemento le llamó estímulo condicionado (EC) y a la respuesta ante el estímulo condicionado le llamó respuesta condicionada (RC).

El siguiente esquema muestra el condicionamiento clásico de Pavlov

Observación Inicial

COMIDA → SALIVACIÓN

1) Apareamiento



2) Respuesta Condicionada



Condicionamientos Aversivos.

A partir de las bases del condicionamiento clásico, se han modificado ciertos elementos para aplicarlos a otros condicionamientos como son los aversivos. Un condicionamiento aversivo se produce cuando un estímulo neutro es pareado con un estímulo aversivo y posteriormente el estímulo neutral adquiere la capacidad de producir aversión por sí mismo.

Un paradigma basado en el condicionamiento clásico que ha recibido atención en la investigación es la aversión condicionada a los sabores introducida a condiciones de laboratorio en 1955, por John García.

Al investigar los efectos de las radiaciones provocadas en la segunda guerra mundial John García estudió los efectos de los rayos X en animales (ratas) a los que se les aplicaban dosis de radiación después de haber ingerido algún alimento o tomado agua con un sabor distintivo, y observó que estos rechazaban el volver a ingerir el alimento o sabor si se les presentaba de nuevo.

También notó que se requería que el punto de radiación se aplicara en un sitio específico para que se pudiera dar esta aversión; si la radiación se aplicaba en el cerebro, los animales no presentaban ninguna aversión, sin embargo si la radiación se

aplicaba directamente en el abdomen los animales si la presentaban. De estos resultados García dedujo que esta aversión probablemente se encontraba asociada al efecto de la radiación en el tracto gástrico.

En 1966 García y Koelling utilizaron como estímulos condicionados un sabor novedoso (sacarina) y un componente audiovisual (luz y chasquido), y los asociaron con un choque eléctrico o con una inyección que produciría un malestar en el tracto digestivo. En estos experimentos encontraron que las ratas que habían recibido la inyección del fármaco habían efectuado un rechazo al momento de presentarles de nuevo el sabor. La aversión de un componente audiovisual y el choque eléctrico no fue tan eficaz en el condicionamiento puesto que el apareamiento de la prueba del sabor y estimulación intraperitoneal por si mismos causaron una aversión fuerte al momento de repetir la exposición al sabor, que no fue de la misma magnitud que cuando presentaron de nuevo el estímulo audiovisual.

Aunque se desarrollaron varios estudios utilizando sustancias que pudieran desarrollar aversión, éstos no tuvieron mucho éxito ya que las dosis o los estímulos eran muy tóxicos. Gelperin en 1975 presentó un sabor novedoso y una exposición de los animales a dosis de CO_2 , y Metaldehído, que resultó ser muy tóxica para los animales y provocaba la muerte de estos.

En 1974 Gustavson realizó estudios de condicionamiento aversivo en coyotes en cautiverio que eran expuestos a la ingestión de carne que contenía pequeñas dosis de Cloruro de Litio (EC), media hora después los animales comenzaban a mostrarse enfermos (EI), y vomitaban (RI). En días posteriores a esta adquisición se les presentaba de nuevo la carne y los animales mostraban una conducta muy interesante, puesto que comenzaban a mostrar reacciones de disgusto, orinando alrededor y dando vueltas como hacen los cánidos que encuentran materia en descomposición.

Condicionamiento Aversivo a los Sabores

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) consta de dos fases, la primera es la adquisición de un estímulo novedoso o gustativo que es apareado con una droga, y la segunda es la evocación del recuerdo de la aversión.

Durante la **adquisición** se presenta la sacarina, (EC) y unos minutos después se presenta un estímulo que produzca malestar gástrico (EI); como radiaciones gama, alguna sustancia, ó drogas que induzcan irritación gástrica o émesis ¹, sulfato de cobre, alcohol etílico y apomorfina entre otros ^{21, 22, 23, 24}. Sin embargo el cloruro de litio, ya sea intraperitoneal o intragástrico, este compuesto es el más usado en condicionamientos aversivos^{6, 21, 22, 23, 24}. este produce síntomas de toxicidad como incremento de peristalsis, diarrea, contracción abdominal, movimientos ventrales, (sus siglas en inglés LOB, que significa lying on their bellies) también disminuyen sus reacciones hacia cualquier estímulo externo.

Cuando se presenta el estímulo novedoso se produce la respuesta innata de la neofobia (disminución en el consumo). Así una de las reacciones del animal que ha tenido un consumo de agua o línea base al presentarle sacarina es una disminución en el consumo. Presentaciones subsecuentes de este sabor sin causar ningún efecto tóxico producen una atenuación gradual a la neofobia llevándola hasta su extinción, lo que conduce a que el sabor sea etiquetado como seguro y familiar; lo contrario pasa si el sabor hedónico del estímulo condicionado cambia de positivo a negativo ya que en la siguiente presentación de este estímulo se da un rechazo a la ingestión.

La **evocación o prueba** (búsqueda de la información almacenada), muestra si el animal tuvo o no una buena adquisición aversiva. Dependiendo de que tan fuerte haya sido el estímulo, éste tendrá una fuerte aversión¹¹. Después de haber dado la

adquisición, se reexpone al animal al sabor presentado el día de la adquisición (sacarina) o estímulo condicionado y el animal rechaza el consumo de ese sabor, puesto que lo asocia al malestar gástrico.

En los experimentos realizados por García, el lapso temporal durante la adquisición, entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado fue de vital importancia. Si el estímulo incondicionado se presentaba varias horas después de haber presentado el primer estímulo (condicionado), el apareamiento no era de forma eficaz.

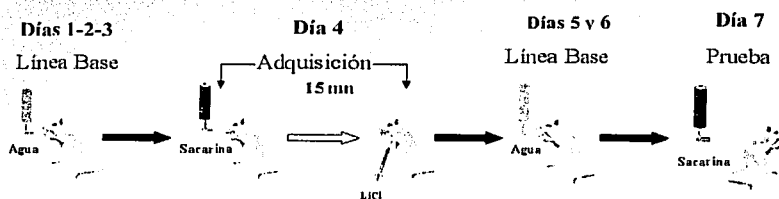


Figura 1 Esquema de la metodología clásica del CAS en un periodo de 7 días

Mecanismos involucrados en el procesamiento de los sabores.

Dentro de la investigación de la aversión a los sabores se describieron inicialmente 4 sabores (dulce, amargo, salado, ácido); en 1909 Ikeda describió el quinto sabor, (umami) que viene del japonés *umai* que significa «delicioso» en referencia a que contiene la sensación de los cuatro sabores en uno; este sabor proviene de la sustancia denominada Glutamato Monosódico. La mayoría de estos sabores son usados en condicionamientos aversivos.

En los mamíferos, los sabores son captados por las papilas gustativas que se encuentran en el epitelio estratificado de la lengua, paladar, faringe, laringe y epiglotis; las papilas linguales se encuentran asociadas exclusivamente con células fungiformes, foliadas y circunvaladas.^{26, 25, 27.}

Cada sabor tiene mecanismos de acción específicos, el sabor salado es mediado por flujo de iones Sodio a través de los canales apicales y basolaterales, mientras que el ácido es captado por el bloqueo de canales de potasio. El Dulce es mediado por la activación de nucleótidos de guanina, unidos a proteína G, el sabor amargo es traducido también por la interacción de proteínas G y es dependiente de mecanismos de liberación de Calcio de reservorios intracelulares. El sabor umami es traducido por un mecanismo similar y es mediado por receptores metabotrópicos de Glutamato. 23, 26, 4. La ocurrencia de las asociaciones entre el estímulo gustativo y visceral no se presentan en una sola vía o un solo grupo neuronal; existe la evidencia de que los procesos de información neural se originan en diferentes niveles y que la proyección del estímulo incondicionado y el visceral, se encuentran en núcleos distintos que trabajan conjuntamente para procesar la información adquirida y la forma en que esta será almacenada. 11, 13, 17, 30, 40, 48, 50, 52.

Estructuras y mecanismos involucrados en la integración del estímulo visceral y el estímulo gustativo en el sistema nervioso central.

Por más de 20 años los estudios electrofisiológicos, conductuales y la farmacológicos, han provisto de información esencial acerca de los mecanismos neurales, fisiológicos y moleculares involucrados en el condicionamiento aversivo a los sabores 11, 30, 39, 49, 50, 52.

El primer paso para que se ocurra esta cascada de eventos es la estimulación de las células receptoras de sabor en las papilas gustativas fungiformes de la parte anterior de la lengua, por medio de iones o moléculas incluidas en las sustancias ingeridas; esta estimulación genera un potencial de acción que induce descargas en los nervios gustativos. Los nervios craneales que reciben esta estimulación son el corda timpani (VII), nervio glosofaríngeo (IX), y el nervio superior laríngeo (X) o nervio vago, que

en el estria terminalis, formando la vía descendente, y enviando información gustativa hacia la Corteza Insular ^{51, 52, 56, 4K.}

El NTS es una estructura muy importante, puesto que recibe diferentes aferencias, tanto gustativas como viscerales, en esta última el área postrema juega un papel importante en la traducción de señales tóxicas, siendo el estímulo incondicionado el causante de un efecto relevante de toxicosis. Como efecto patológico del veneno de la sustancia, la señal tiene que ser traducida de tal forma que pueda dar el efecto deseado en el condicionamiento. Muchos de los estímulos incondicionados usados en el condicionamiento aversivo a los sabores activan el área postrema y el NTS, siendo el NTS catalogado como el primer relevo gustativo y visceral en el CAS.

El NTS recibe entradas desde diferentes ramas, desde nervio vago, área postrema y sistema vestibular, implicado en el reflejo de náusea (que las ratas no presentan); También recibe las aferencias gustativas primarias de la lengua, vía los nervios faciales VII y IX, del paladar, del nervio VII, de la laringe y faringe, y del nervio X (vago); el NTS a su vez proyecta hacia el PBN, el segundo núcleo involucrado en la vía gustativa de la rata

El área postrema (AP) es una estructura circunventricular que se encuentra limitada con la barrera hematoencefálica, localizada en la parte inferior caudal del cuarto ventrículo; el AP juega un papel importante en el reconocimiento de la sustancia tóxica por dos vías, una por medio de las aferencias vagales que recibe señalización de toxinas gastroirritantes y dos por la vía sanguínea; si hay una sustancia tóxica en la sangre, ésta es detectada por medio del AP, la cual proyecta al NTS.

Otra estructura relacionada con el procesamiento del estímulo visceral y gustativo es el núcleo parabraquial (PBN)^{60, 61}. Se ha demostrado que las neuronas en el PBN lateral de rata responden a estímulos viscerales y gustativos. El PBN está descrito como el

segundo núcleo de relevo en el procesamiento de información del CAS₆; axones del PBN en el área gustativa en la parte rostral del NTS ascienden ipsilateralmente a través de la formación reticular al PBN en la región caudal del puente. La mayoría de las neuronas de las aferencias viscerales del NTS proyectan al núcleo lateral del PBN mientras que las aferencias gustativas del NTS proyectan al subnúcleo medial del PBN. El PBN también recibe aferencias del AP₆.

La región medial del PBN responde a eventos gustativos, esta región a su vez proyecta la información hacia el tálamo ventroposteromedial (VPM), núcleo del tálamo ventroposterolateral (VPL) e hipotálamo lateral; todas estas regiones a su vez proyectan hacia la corteza gustativa o corteza insular₃.

El subnúcleo lateral el cual se encuentra involucrado en recibir y proyectar estímulos gustativos por sus eferencias del nervio vago, proyecta a su vez a la parte parvocelular del núcleo posterior del tálamo, hacia el hipotálamo lateral. Estos relevos a su vez proyectan a la corteza insular, amígdala e hipotálamo. El subnúcleo lateral del PBN alcanza al núcleo central de la amígdala y a la amígdala basolateral, proyectando hacia la corteza insular₆.

La **amígdala** juega un papel crucial en el paso de información, tanto visceral como gustativa, y en condicionamientos aversivos, se ha reportado que lesiones en la amígdala destruyen el condicionamiento aversivo_{1, 52, 1, 6, 11, 48}. La amígdala se encuentra relacionada con algunas de las funciones más complejas en el cerebro, incluidas la memoria y las emociones, esta asociación neuronal tiene aferencias de la corteza frontal, insular, prepiriforme, orbital, tálamo e hipotálamo convergen en la amígdala que a su vez también proyecta hacia la corteza insular, hipotálamo y tallo cerebral₆.

La amígdala es un cúmulo de neuronas que se encuentra dividido en subnúcleos primitivos asociados al sistema olfativo; mediante estudios de neuroanatomía

comparada se ha descrito la existencia de un subnúcleo que es compartido filogenéticamente por muchos vertebrados, a este se le llamó núcleo primitivo y se compone por los núcleos central, medial, cortical y un núcleo nuevo basal y lateral, el cual se cree que emigró de la corteza piriforme. Los vertebrados comparten características similares, Jonhson en 1923 observó que la amígdala es una continuación del núcleo piriforme, los núcleos anterior, medial y central, la región caudal constituida por la corteza olfativa, y una extensión ventromedial del claustrum, lateral, posterior y basal.⁶⁶

Basándose en estudios de lesiones farmacológicas en la amígdala se ha podido saber el papel de los subnúcleos en distintas tareas, como son los condicionamientos de miedo, y los condicionamientos aversivos a sabores y a olores. Esta estructura se ha señalado como uno de los sitios de convergencia del estímulo condicionado y el incondicionado en condicionamientos aversivos.^{4, 38, 41, 66}

La amígdala también ha sido asociada con aspectos de ingestión de agua y alimento, se ha demostrado que la estimulación en la amígdala produce cambios en el consumo; la estimulación del núcleo dorso medial incrementa el consumo mientras que la estimulación del baso lateral y del corticomedial inhibe el consumo.^{34, 36} La estimulación farmacológica de la amígdala con agonistas adrenérgicos incrementa el consumo de alimento pero el consumo de agua se ve reducido, y lo contrario sucede con la estimulación colinérgica.³⁶

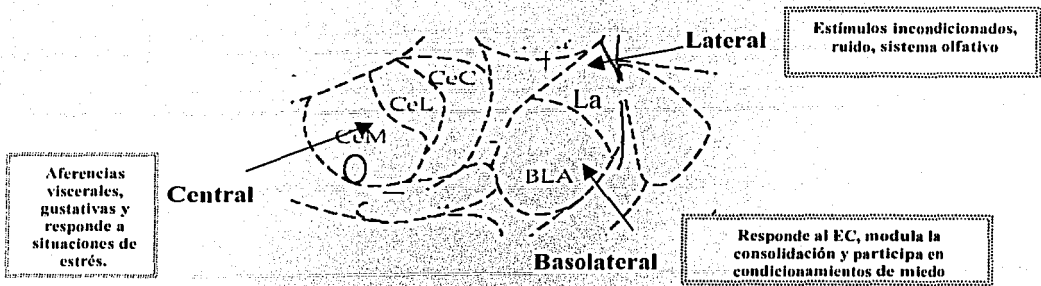


Figura 3. Subnúcleos que conforman el complejo amigdalino: el núcleo central de la amígdala está representado por tres subnúcleos denominados: CeM (central medial), CeL (central lateral), y CeC (central cortical), BLA (el núcleo basolateral) y La (el lateral) Modificado de Paxinos»

Existen evidencias que sugieren que los subnúcleos del complejo amigdalino participan de diferente manera tanto en el condicionamiento, como en la adquisición, la consolidación de la memoria, y el recuerdo. Los subnúcleos tienen distintas aferencias y eferencias; la **amígdala central** tiene aferencias del núcleo dorsal del nervio vago, PBN, NTS, corteza insular, tálamo y puente. Se ha demostrado que la estimulación eléctrica en los núcleos que conforman la amígdala en humanos produce alucinaciones olfativas y gustativas, por lo que se deduce que la amígdala es una estructura donde ocurre la integración del olor, el gusto y la toxicosis.

La **amígdala lateral** como punto de asociación en estímulos auditivos y estímulos incondicionados (como puede ser el choque eléctrico en condicionamientos de aversiones olfativas, con lesiones previas) los animales no presentan aversión, en comparación con grupos que no han sido lesionados en la zona lateral. La **amígdala basolateral** se ha inactivado después de un entrenamiento, y se ha visto claramente el decremento en respuesta a condicionamientos de miedo; esta región se ha declarado como el modulador del almacenamiento de condicionamientos de miedo; tanto la

amígdala basolateral como la lateral se encuentran conectadas con el sistema olfativo, la corteza insular y la corteza frontal.»

Con experimentos de expresión de genes tempranos como marcadores de actividad neural, se ha encontrado que la amígdala central responde fuertemente ante el estímulo incondicionado», las lesiones en amígdala también demuestran que afectan el aprendizaje en prevención pasiva y en el condicionamiento aversivo a los sabores.

Las estructuras antes mencionadas proyectan de una forma directa o indirecta hacia la corteza insular o corteza gustativa, las neuronas de este lugar tienen la cualidad de codificar y de procesar el aspecto hedónico de un sabor (preferirlo o rechazarlo).

En función al patrón de conectividad se ha sugerido que la corteza insular se encuentra involucrada con la integración y el almacenamiento de la información visceral. El Tálamo proyecta hacia la corteza insular y otras estructuras subcorticales, (la corteza prefrontal y la amígdala central). Se sabe que está relacionada con situaciones de stress, y que lesiones en la corteza insular afectan el aprendizaje.

El tálamo es otro de los núcleos importantes en este procesamiento de información; se sabe que existen relaciones entre las hormonas y situaciones de estrés, y en procesos de aprendizaje y memoria», el eje hipofisario adrenal participa activamente en condicionamientos aversivos ^{17, 57}.

Dentro de los núcleos que están inmersos en este tipo de respuestas está el **núcleo paraventricular del hipotálamo**, un sitio que responde a situaciones de estrés^{57, 9, 18} y ante eventos de osmoregulación. Pocos estudios se han realizado respecto a su participación en el condicionamiento aversivo a los sabores pero se sabe que participa activamente y que responde principalmente al EI₁₈.

El NPV cuenta principalmente con dos poblaciones celulares, la población magnocelular y la población parvocelular; la magnocelular se divide en anterior,

media y posterior, mientras que las neuronas parvocelulares se dividen en anterior, media, dorsal, lateral y periventricular^{19,76}.

El NPV proyecta hacia diferentes sitios diana, mientras que la población celular que proyecta a la eminencia media es principalmente del tipo endocrino y la que proyecta a medula ósea responde de forma autónoma^{17,76}.

El NPV se caracteriza por su respuesta al EI en el condicionamiento aversivo a los sabores. El estímulo causa un malestar general en el animal cuando es aplicado intraperitonealmente, el nervio vago carga con esta información, respondiendo a la cadena de eventos fisiológicos descritos anteriormente, el NPV responde de forma inmediata al estímulo que causa daño al animal. Las células del NPV sintetizan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la liberan a la sangre portal; la unión de esta hormona con su receptor en la adenohipófisis estimula la síntesis y la liberación de corticotropina (ACTH) hacia la circulación en general, la cual estimula a su vez la síntesis de corticosteroides en la corteza adrenal.

La liberación de corticosteroides a la sangre periférica alerta a los sistemas para que el organismo genere una respuesta inmediata hacia el estímulo negativo.

Dentro de las áreas que proyectan hacia todo el NPV son el hipotálamo (anterior, lateral), núcleo supraquiasmático, ventromedial, dorsomedial, premamilar, supramamilar, preóptico mediano, periventricular preóptico, área preóptica media, lateral, hipotálamo anterior, núcleo del lecho, NTS, quiasma óptico, hipotálamo lateral.

Otro de los núcleos inmersos en este engranaje es el núcleo supraóptico que se encuentra relacionado con cambios osmóticos en el organismo; neuronas en el núcleo supraóptico y en el NPV proyectan hacia el lado posterior de la glándula pituitaria y están involucradas en el balance de agua¹⁷.

Comunicación celular

Todas las conexiones involucran mecanismos de comunicación; los estímulos externos generan potenciales de acción en las neuronas que desencadenan diversos procesos de comunicación».

Las neuronas se componen de un cuerpo celular con ramificaciones llamadas dendritas, también una extensión larga llamada axón, el cuál se extiende de una parte a otra en el sistema nervioso; las terminaciones celulares se les denomina botones sinápticos.

Los axones se conectan con otras neuronas por medio de pequeñas ramificaciones situadas en sus extremos y el punto de contacto próximo es conocido como espacio sináptico. El axón de una neurona se comunica con otra por medio de las sinapsis al liberar sustancias llamadas neurotransmisores, cuando estos llegan a la otra neurona cambian el potencial eléctrico de su membrana.

Fuera de la neurona existe una concentración elevada de iones sodio positivos y iones cloro negativos, dentro hay una alta concentración de iones de potasio positivos y proteínas con una carga negativa. La comunicación neuronal depende de cambios rápidos en el potencial eléctrico a través de la membrana de la célula nerviosa.

Estos cambios rápidos son posibles gracias a los canales iónicos, una clase de proteínas integrales que atraviesan la membrana celular que se encuentran en todas las células del organismo. Estos canales tienen tres propiedades: conducen iones, reconocen y seleccionan iones específicos y se abren y cierran en respuesta a señales específicas eléctricas, mecánicas o químicas».

Los canales iónicos regulan el flujo de iones a través de la membrana en todas las células, estos son asociados con los cambios en membrana que general el potencial de acción y los potenciales postsinápticos de las células diana. La entrada de iones calcio

controlada por los canales puede alterar mucho los procesos metabólicos intracelulares, al activar varios enzimas y otras proteínas.

Mecanismos involucrados en la memoria de corto y largo plazo.

Cuando un animal tiene contacto con un estímulo nocivo, aprende a responder de una manera diferente a cualquier otro estímulo que no le hubiera causado ningún daño, más alerta hacia la huida o defensa. Hay dos formas de almacenar este suceso, una memoria que tiene una forma a corto plazo que dura minutos, y otra a largo plazo que dura días o semanas.

Eric R. Kandel realizó experimentos de sensibilización con la aplysia (memoria a corto plazo), en estos modelos encontró una secuencia de pasos bioquímicos de la sensibilización de una vía monosináptica. La serotonina y otros neurotransmisores, activan receptores acoplados a proteína G, que a la vez incrementa la actividad de adenil ciclasa que incrementa la concentración de AMPc en las neuronas sensoriales. El AMP cíclico activa a su vez a la proteína quinasa dependiente de AMPc, que fosforila un número de proteínas sustrato, y la fosforilación puede conducir al aumento y disminución de la actividad de una proteína mediante el cambio en su conformación. En la sensibilización la quinasa fosforila y cierra dos tipos de canales de potasio, lo que hace que se prolongue el potencial de acción y ocasiona que los canales de Calcio tipo N se activen durante un periodo de tiempo; a mayor entrada de Calcio en los terminales se produce un aumento adicional de transmisor liberado. La quinasa también actúa aumentando la movilización de las vesículas de transmisor y la eficacia del aparato liberador del transmisor por un mecanismo independiente del calcio⁷⁴.

En la memoria a largo plazo se necesita la síntesis de nuevas proteínas y el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas. Estudios recientes^{2,7,12,14}, indican que por

entrenamientos repetidos, la proteína quinasa dependiente de AMPc se traslada al núcleo de las neuronas sensoriales para fosforilar a una o más proteínas reguladoras transcripcionales dependientes de AMPc tales como la proteína CREB, que une al elemento de respuesta al AMPc, éstos reguladores transcripcionales activan genes que producen proteínas a largo plazo^{17,65}.

Expresión de genes tempranos como herramienta en mapeo de actividad sináptica.

Para entender los mecanismos neurales en el condicionamiento aversivo a los sabores y sus vías de procesamiento, la proteína Fos y antígenos relacionados han sido de gran ayuda, puesto que esta puede ser visualizada en cualquiera de las etapas, la proteína es nuclear, lo que facilita su identificación, se puede encontrar a partir de los 30-60 minutos después de haber dado la estimulación, el RNAm de Fos se incrementa en los 5-10 min después de la estimulación⁷; está reportado el uso de esta herramienta en activación por efectos de estrés, y por estímulos novedosos^{17,21,31}.

La distribución de Fos ha sido examinada en el cerebro de la rata después de inyecciones intra peritoneales de cloruro de litio³⁸. Las neuronas que mostraron mayor actividad se encontraron en el núcleo reticular lateral, área postrema, núcleo parabraquial, núcleo paraventricular del tálamo, núcleo del tracto solitario, locus coeruleus, hipotálamo, posterior y lateral y áreas del núcleo preóptico, corteza piriforme, corteza insular y neocorteza^{21,31,35,37,46}.

Los productos de la expresión de genes tempranos inmediatos han sido usados como una herramienta de mapeo de activación neural, en respuesta a estímulos distintos, uno de los más usados es el oncogen Fos. Cuatro de los miembros de la familia Fos han sido identificados; Fos, FosB, Fra-1, y Fra-2⁶⁶; estas proteínas son codificadas por

genes que contienen 4 exónes y tres intrónes y poseen leucina que promueve la heterodimerización con que los miembros de la familia Jun (c-jun, JunB y D).

El gen Fos se transcribe para formar la proteína Fos la cual dimeriza con proteínas nucleares codificadas por miembros de la familia c-Jun para interactuar con secuencias específicas en el DNA de genes blanco conocidas como sitios AP-1 para regular su transcripción que a su vez activa otros genes de expresión tardía. La fosforilación de los miembros de Fos y Jun se encuentra mediada por quinasas, recientemente se ha demostrado que la expresión de Fos depende de la calidad de los potenciales de acción, el incremento de los niveles de calcio es uno de los factores que están relacionados de una manera proporcional con la expresión de Fos, otros de los mecanismos de inducción pueden ser Factores Neurotróficos, neurotransmisores, despolarización, Incremento de influjo de Calcio e incremento de las concentraciones de Calcio intracelulares. El Gen Fos, posee dos sensores de Calcio funcionales, estos son canales de tipo L. de influjo de Calcio, y los dependientes de voltaje, que inducen la fosforilación de CREB vía Cam cinasa e induce la expresión de Fos vía CRE son elementos de respuesta a calcio/AMPC, mientras que las señalizaciones a través del ligando de apertura de Calcio (receptores de NMDA) resultan en activación de las señales de transducción vía MAP cinasa y elementos que responden en el suero (SRE) Serum Response Elements.

En la figura siguiente se pueden observar los mecanismos que se presentan ante la exposición al cloruro de litio por medio de los canales o por el receptor a proteína G se da la fosforilación que conlleva a la dimerización de la proteína Fos y Jun para la síntesis de otras proteínas.

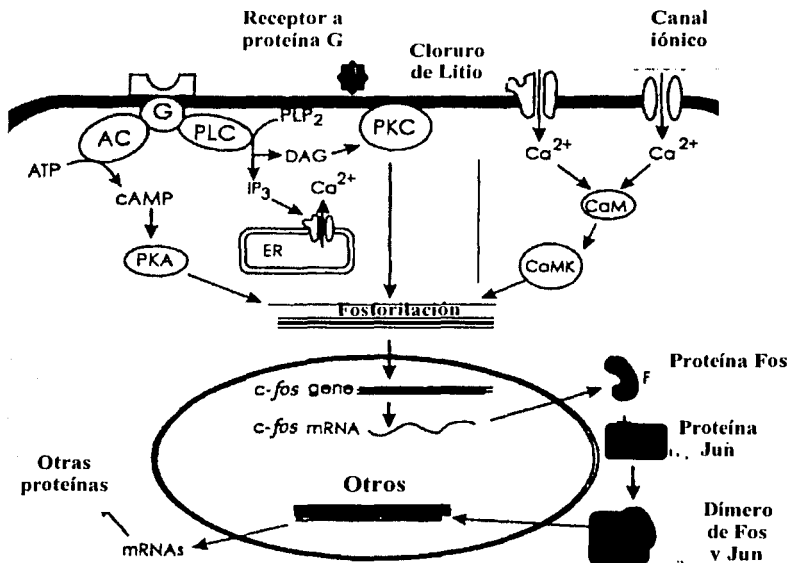


Figura 4. Activación del Gen Fos por LiCl. Modificada de Bures 1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Hipótesis

Los núcleos con aferencias viscerales tendrán un incremento en la activación de Fos, mientras que los núcleos que se tengan aferencias gustativas, tendrán una activación mayor por la estimulación del EC.

Es probable que los núcleos que participan en la adquisición no se activen de manera similar en la evocación puesto que ambos núcleos, el NPV y la amígdala participan como centros de relevo de la información adquirida y no en el almacenamiento.

Justificación

Actualmente el paradigma del CAS es una tarea conductual muy usada para la realización de estudios de memoria y aprendizaje.

Se han realizado diversos estudios sobre las estructuras que se encuentran involucradas con el procesamiento y la proyección de los estímulos que participan en

esta tarea^{11, 13, 21, 30, 31, 32, 33}. Aunque actualmente se tienen modelos que explican como es el arreglo de estos procesos, todavía hay huecos en la información.

La metodología seguida en el presente trabajo facilita la observación de la activación, el procesamiento y la proyección de dos estructuras que juegan un papel muy importante en el CAS por sus aferencias tanto gustativas y viscerales, la amígdala y el NPV⁴¹.

Es importante denotar cuáles subnúcleos dentro de estas estructuras responden al estímulo condicionado y cuáles al estímulo incondicionado; de esta forma se podrá contribuir al esquema actual de vías de procesamiento en el aprendizaje y la memoria del CAS.

Objetivos generales

El objetivo consistió en observar la activación del sistema nervioso central ante un estímulo gustativo EC, ante un estímulo visceral EI y ante la unión de ambos estímulos en la adquisición y en la evocación del CAS.

De ello se pretende identificar si los estímulos gustativos y viscerales activan a diferentes cúmulos neurales en la amígdala y en el NPV; o si ambos estimulan a las mismas neuronas, en estos núcleos.

Comparar si núcleos del NPV y del complejo amigdalino que responden en la adquisición participan nuevamente en la evocación de la tarea.

Cuantificar la activación de Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo y en la amígdala en respuesta a novedad y a la familiaridad.

Metodología y materiales.

El desarrollo del presente trabajo se dividió en 4 fases, llevando a cabo el protocolo siguiente:

Tabla 1. Protocolo general

| N=5 | Grupos | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 |
|-------------------------------|------------------------|----|----|----|----|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| Estímulos gustativos | Sac | Lb | Lb | Lb | Lb | E y S | | | | | |
| | H2O | Lb | Lb | Lb | Lb | E y S | | | | | |
| Estímulos viscerales | LiCl | Lb | Lb | Lb | Lb | E y S | | | | | |
| | NaCl | Lb | Lb | Lb | Lb | E y S | | | | | |
| gustativo + visceral | Sac-NaCl Sac-LiCl | Lb | Lb | Lb | Lb | E y S* | Lb | Lb | E y S | | |
| Gustativo exposición repetida | Sac Fam | Lb | Lb | Lb | Lb | E | E | E | E | E y S | |
| Gustativo + visceral repetido | 3Sac-NaCl 3Sac-LiCl | Lb | Lb | Lb | Lb | E | E | E y S* | Lb | Lb | E y S |

(Sac) Sacarina, (LiCl) Cloruro de Litio, (NaCl) Cloruro de Sodio, (Sac Fam) Sacarina Familiar, (3Sac-NaCl) tres adquisiciones sacarina-cloruro de sodio, (E) estimulación, (S) sacrificio, (*) se sacrifica la mitad del grupo, (Lb) línea base de consumo de agua.

Sujetos: Se utilizaron ratas wistar entre 250 y 300 grs., los animales se colocaron en cajas individuales sometidos a las mismas condiciones de temperatura y humedad, con periodos de 12/12 hrs. (7:00am hora a la que inicia la luz) de luz obscuridad, durante todo el experimento.

Fase 1. Activación del sistema nervioso central ante la exposición de estímulos gustativos y viscerales.

Metodología y materiales.

Prueba conductual: Durante 24 horas se les retiró el agua y se comenzó a hacer el registro de consumo de agua o línea base; diariamente por la mañana durante 15 minutos se les presentó el bebedero con 40 ml de agua, posterior a su retiro se les manipuló ventralmente 15 minutos después durante 30 segundos a cada animal; Al quinto día se realizó la presentación de los estímulos gustativos y viscerales.

Tabla2. Protocolo de la fase 1.

| Grupos n=5 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|
| Agua (H ₂ O) Sacarina (Sac) Cloruro de Litio (LiCl) Cloruro de Sodio (NaCl) | Lb | Lb | Lb | Lb | Estimulación y Sacrificio. |

Los bebederos fueron llenados con 15 ml de acuerdo al grupo, se les presentó el bebedero por 15 minutos, la sacarina a una concentración de 0.1 M. A los grupos de estimulación visceral, se les aplicó una inyección intraperitoneal de su respectivo tratamiento, a 0.15M (7.5 ml/Kg.), todos los reactivos usados fueron SIGMA, dos horas después de la estimulación los animales fueron sacrificados.

Para el sacrificio se les anestesió con 1 ml de anestesia (Zpizar) y se efectuó la perfusión con buffer de perfusión y paraformaldehído (se pueden revisar en el anexo).

Histología: Los cerebros se mantuvieron en paraformaldehído por 12 horas y posteriormente se colocaron en una solución de Sacarosa al 30% durante tres días.

Se obtuvieron cortes de 40 en un criotomo manual a -15°C, los cortes fueron seleccionados con alturas específicas una anterior y una posterior de acuerdo al atlas de Paxinos.; interaural 7.60 mm, bregma -1.40 mm y la posterior fue interaural

Estímulo gustativo

En el caso del estímulo gustativo en amígdala se realizó una prueba de ANOVA obteniendo lo siguiente: en la amígdala lateral ($F_{1,8} = 30.713$; $p < 0.001$), para basolateral ($F_{1,8} = 1.298$; $p > 0.05$) y para la central ($F_{1,8} = 6.941$; $p > 0.01$), el análisis post-hoc mostró diferencias significativas con respecto al control de consumo, en los subnúcleos lateral y central del complejo amigdalino con la sacarina.

Gráfica 1. Número de células inmunoreactivas para Fos en el complejo amigdalino con estímulos gustativos.

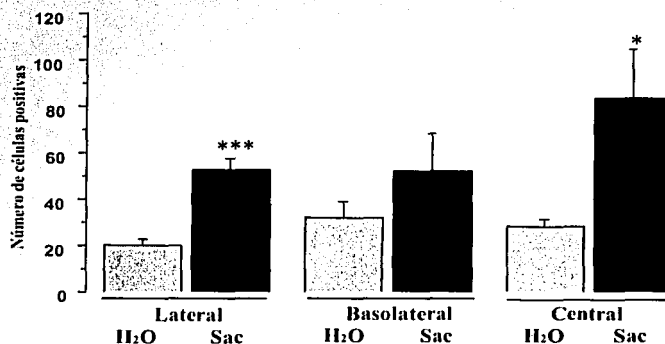
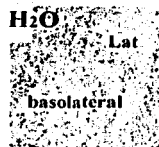


Figura 6. Células positivas a Fos en amígdala lateral y basolateral con agua y sacarina.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Podemos observar un incremento en la amígdala central por la sacarina, la amígdala lateral también denota un incremento significativo con respecto a su control.

Gráfica 2. Número de células positivas a Fos ante un estímulo gustativo en el NPV.

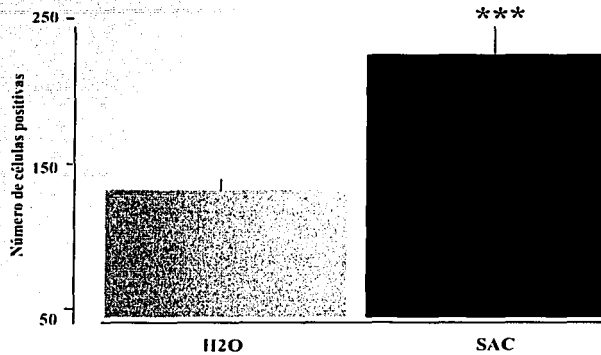


Figura 7. Células positivas a Fos en el NPV con agua y sacarina.



Para el núcleo paraventricular del hipotálamo se utilizaron las mismas pruebas obteniendo lo siguiente: ($F_{1,8} = 32.110$; $p < 0.001$), siendo estadísticamente significativo el grupo de sacarina con respecto a su control.

Estímulo visceral.

En el ANOVA para el complejo amigdalino se obtuvo lo siguiente; para amígdala lateral ($F_{1,8} = .847$; $p > 0.05$), basolateral ($F_{1,8} = .597$; $p > 0.05$) y para la central ($F_{1,8} = 272.971$; $p < 0.001$), siendo solo estadísticamente significativa la central con respecto a su control.

El núcleo central de la amígdala responde con un notable incremento al LiCl a diferencia de los demás núcleos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3. Número de células inmunoreactivas para Fos en el complejo amigdalino con estímulos viscerales.

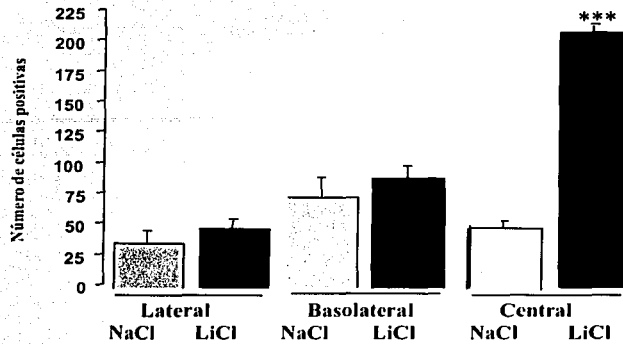
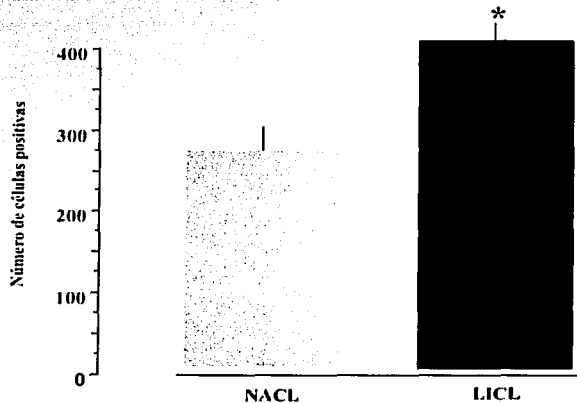


Figura 7. Células positivas a Fos en la amígdala central en la estimulación visceral.



Para el núcleo paraventricular del hipotálamo se obtuvo ($F_{1,8} = 14.476$; $p < 0.0001$) habiendo diferencias significativas con respecto a su control.

Gráfica 4. Número de células inmunoreactivas para Fos en el NPV ante estímulos viscerales.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El número de células con respecto al consumo de sacarina aumenta significativamente, para la sacarina se obtuvo una media de 250 células, mientras que para el LiCl se obtuvo una media de 400 células.

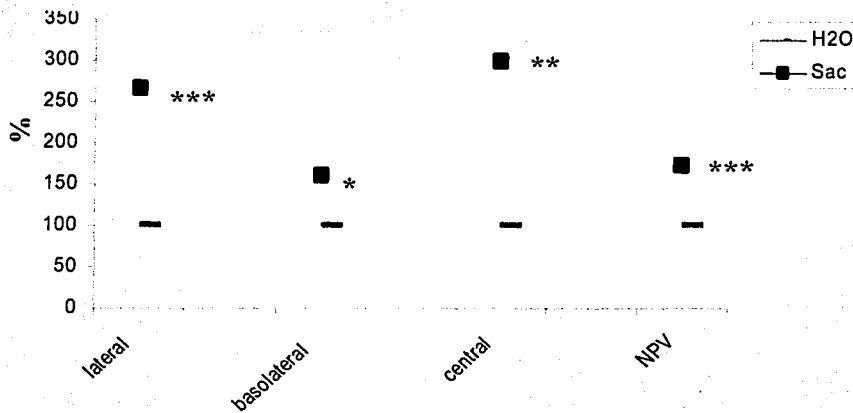
Figura 7. Células positivas a Fos en el NPV por estimulación visceral.



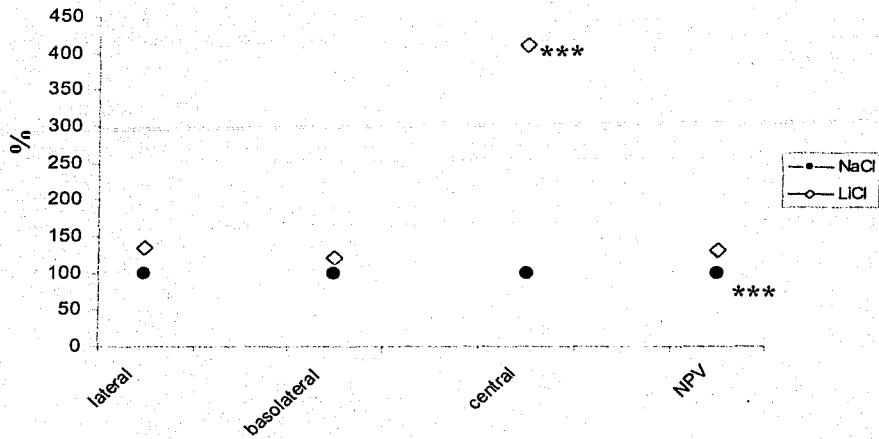
Por medio del conteo de células se observa que estructura se activa de acuerdo al estímulo aplicado, si revisamos los porcentajes se pueden realizar comparaciones por estructura de cuánto se incrementa un grupo con respecto al otro; los porcentajes se calcularon tomando como control absoluto el grupo de agua.

Gráfica 5. Porcentajes fase 1.

Estímulo gustativo



Estímulo visceral



Conclusiones fase I.

La amígdala central responde fuertemente al estímulo incondicionado, más que los otros núcleos, probablemente por las aferencias vagales con las que la amígdala central cuenta, la amígdala basolateral responde de manera fuerte ante el estímulo condicionado, corroborando un poco a las hipótesis existentes de las conexiones de la basolateral con la corteza insular.

El NPV responde fuertemente al estímulo de inyección más que a la novedad gustativa, con una diferencia muy pequeña entre la estimulación intraperitoneal de litio con respecto a su control respondiendo ante la estimulación intraperitoneal *per sé*, el NPV es un núcleo que se encuentra envuelto en eventos osmóticos, lo cual se puede observar en el incremento de células positivas por la estimulación de consumo, y aunado a ello, en la estimulación visceral también es un núcleo que responde a eventos de estrés, el LiCl produce un malestar suficiente para producir estrés en el animal.

Fase 2. Respuesta de los núcleos del complejo amigdalino y del núcleo paraventricular del hipotálamo posterior a la adquisición de un apareamiento de estímulo gustativo y visceral.

Metodología

Prueba Conductual: Los animales se habituaron de la misma forma que en la fase 1 hasta el quinto día, el día de la adquisición se presentó el bebedero con 15 ml de sacarina 0.1% durante 15 minutos, posteriormente de retirar el bebedero se espero 15 minutos más y se les presento una inyección intraperitoneal respectiva a su grupo, 2 horas más tarde los animales fueron sacrificados.

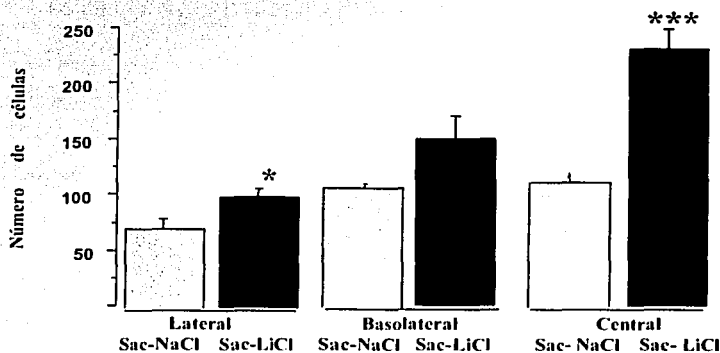
Tabla 3. Protocolo

| Grupos n=5 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 |
|--|-------|-------|-------|-------|---------------------------------|
| Sac-Cloruro de Litio (LiCl) Sac-Cloruro de Sodio (NaCl) | Lb | Lb | Lb | Lb | Adquisición y Sacrificio. |

Resultados

Se obtuvo para el complejo amigdalino en el subnúcleo lateral ($F_{1,8} = .847$; $p > 0.05$), para el basolateral ($F_{1,8} = .597$; $p > 0.05$), para el central ($F_{1,8} = 272.691$; $p > 0.001$), siendo este el único estadísticamente significativo.

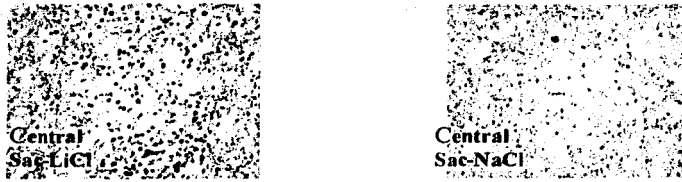
Gráfica 6. Número de células inmunoreactivas para C-Fos en el complejo amigdalino con estímulos gustativos y viscerales.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

29

Figura 8. Células positivas a Fos en la amígdala central en la adquisición.



Para comenzar a analizar el complejo amigdalino es necesario analizar cada uno de los núcleos con los estímulos solos y la unión de ambos, con sus respectivos controles.

El núcleo central es el que muestra el incremento mayor en la expresión de células positivas por la asociación del EC y el EI aunque se nota una disminución con respecto a la expresión obtenida por el EI *per sé*; se vuelve a observar el incremento de la activación de c-fos por el LiCl en la amígdala central.

En la amígdala basolateral no se observa una suma en los porcentajes ni en el número de células reactivas del EC y el EI, sin embargo se observan diferencias entre la basolateral y la central.

En la lateral sucede lo contrario que en los demás núcleo, se observa cierto sinergismo del EC y del EI; puesto que la suma de la sac y el litio dan un valor aproximado que se obtiene ante la exposición de ambos estímulos; esto se corrobora en porcentaje y en número de células.

El NPV tiene un incremento no significativo con respecto a su control, con una ($F_{1,8}=.974$; $p>0.05$).

Gráfica 7. Número de células inmunoreactivas para Fos en el NPV con estímulos gustativos y viscerales.

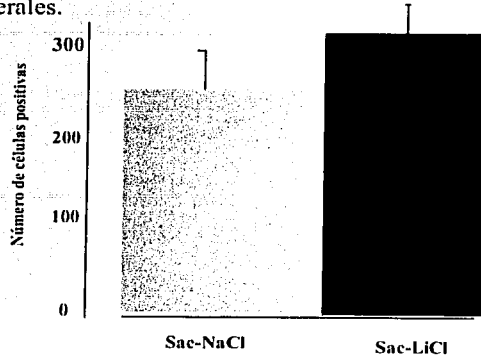
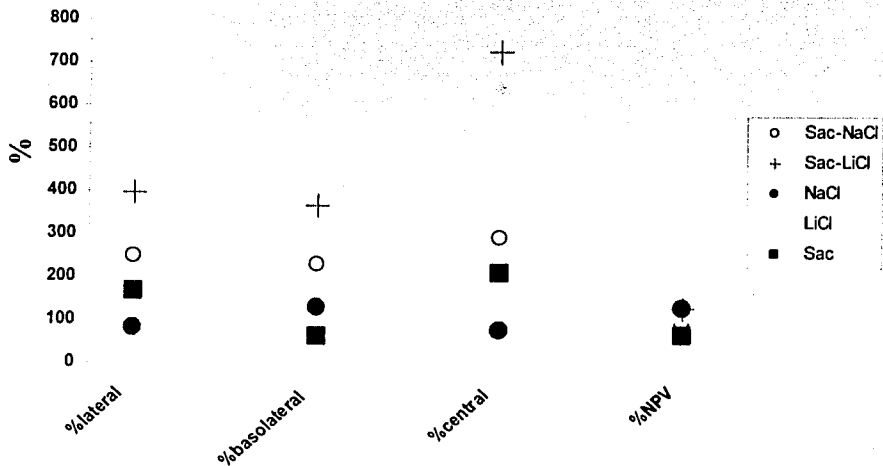


Figura 9. Células positivas a Fos en el NPV en la adquisición.



No se distinguen sinergismos en los estímulos; se nota un decremento con respecto al LiCl per sé, con respecto a la unión de la sacarina y el litio, aunque no es significativo.

Gráfica 8. Porcentajes fase 2.



Los porcentajes no salieron tan altos como los estímulos solos; el resultado más alto fue obtenido en la asociación de sacarina y litio en la amígdala central.

Conclusiones de la fase 2.

Se puede observar que el procesamiento de un estímulo pareado, (visceral-gustativo) tiene una fuerte recepción en el núcleo central de la amígdala, el cuál como se había mencionado previamente tiene ambas aferencias, por lo que la unión de estos estímulos es factible que se de en este núcleo.

El núcleo lateral se había descrito como un centro de asociación para el EC y el EI en la adquisición, pero por la forma de respuesta en este núcleo, la suma de los datos obtenidos en cada estímulo se acerca mucho al resultado de la asociación de ambos estímulos, tal parece que en el núcleo hay dos cúmulos neuronales que responden de manera autónoma al estímulo condicionado y al estímulo incondicionado, y procesa ambos estímulos, quizás no funciona como se había propuesto, como centro de asociación.

El núcleo paraventricular más parece responder al estrés que causa el cloruro de litio y la inyección que como centro de asociación; los niveles de incremento en los porcentajes con respecto al control de agua se parecen mucho en la inyección de NaCl que a la unión de sac-LiCl, lo que también aparenta estar respondiendo a evento osmótico, por la estimulación de consumo y la de inyección.

Fase 3. Activación del sistema nervioso central ante la reexposición del estímulo condicionado en el CAS (Evocación).

Metodología y materiales.

Sujetos: Se mantuvieron las mismas condiciones que en los experimentos pasados.

Prueba conductual: Hasta el quinto día se presentó la línea base y la manipulación de la misma forma que en el experimento 1, las ratas fueron adquiridas igual que en el experimento dos en el quinto día, durante los dos días siguientes se les tomó línea base de nuevo, bajo las mismas condiciones y al octavo día se presentó sacarina en vez de agua, el bebedero fue llenado con 15ml de nuevo, para controlar el consumo, posteriormente se procedió con el sacrificio y perfusión bajo las mismas condiciones que en los experimentos pasados.

Tabla 4. Protocolo

| Grupos n=5 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día6 | Día 7 | Día 8 |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|------|-------|------------------------|
| Sac- LiCl / Sac Sac- NaCl / Sac | Lb | Lb | Lb | Lb | Adquisición | Lb | Lb | Evocación y Sacrificio |

Resultados. Con el análisis estadístico de ANOVA se obtuvieron los siguientes resultados: para la amígdala lateral ($F_{1,8} = 5.875$; $p < 0.05$), para la basolateral ($F_{1,8} = 4.082$; $p > 0.05$), y para la central ($F_{1,8} = 6.444$; $p > 0.01$), siendo estadísticamente significativo con respecto a su control los núcleos lateral y central.

Con respecto a su adquisición la amígdala central fue la única estadísticamente significativa, los demás núcleos se mantuvieron con valores similares a los obtenidos en la adquisición, con una pequeña disminución.

Gráfica 9. Número de células positivas a C-Fos ante la evocación del CAS en el complejo amigdalino.

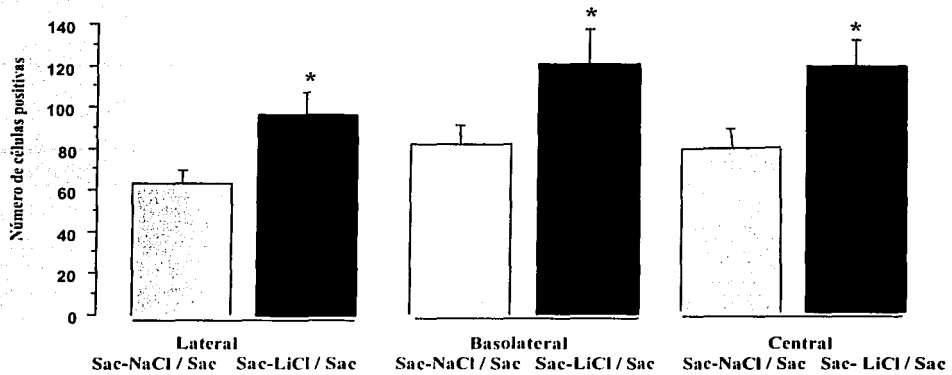
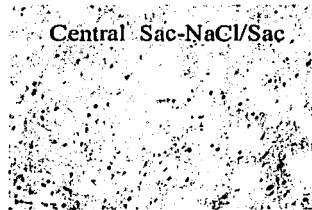
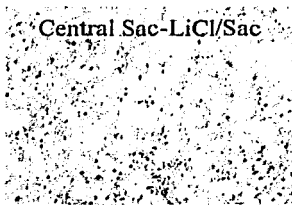
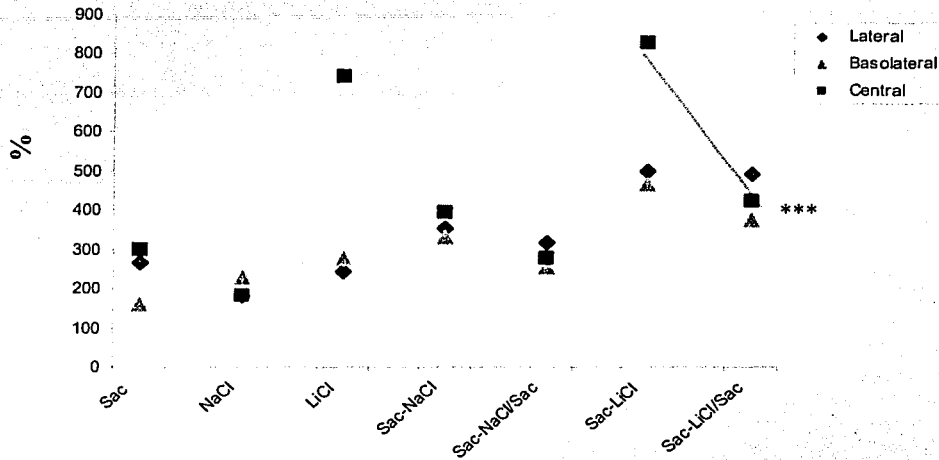


Figura 10. Células positivas a Fos en el complejo amigdalino durante la evocación.



En cuanto a los porcentajes se obtuvieron siguientes resultados: en la amígdala lateral se nota un decremento en los grupos evocados con respecto a sus adquisiciones, no son estadísticamente significativos, al igual que el basolateral, los valores son similares o tienen un ligero decremento, en la amígdala central si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la adquisición y la evocación.

Gráfica 10. Porcentajes de estímulos (gustativos y viscerales) solos, pareados y su evocaciones.



Para el núcleo paraventricular del hipotálamo las pruebas estadísticas dieron los siguientes resultados: ($F_{1,8} = 0.309$; $p > 0.05$), no hubo diferencias significativas entre grupos. Se notó un decremento en el porcentaje de células por área, con respecto al grupo control, pero con respecto a su adquisición se obtuvo: ($F_{1,8} = 1.297$; $p > 0.05$), siendo solo estadísticamente significativo el grupo control; para el experimental no hubo diferencias.

Gráfica 11. Número de células positivas a Fos ante la evocación en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

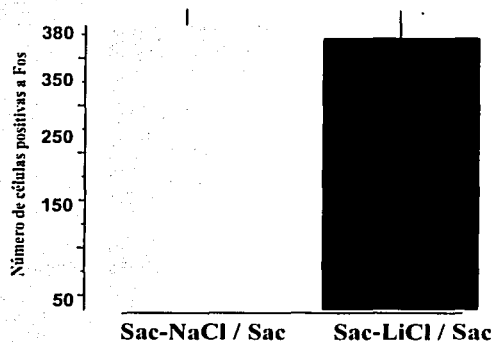
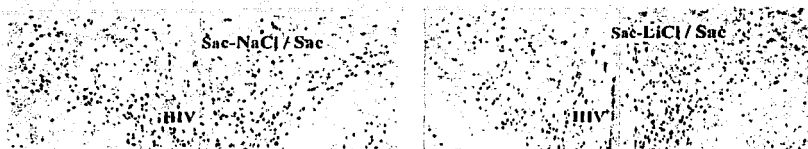
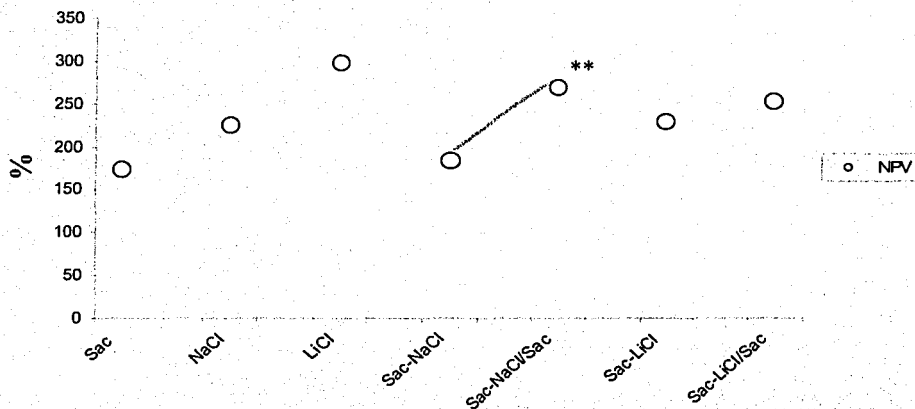


Figura 11. Células positivas a Fos en el NPV durante la evocación.



Gráfica 12. Porcentajes del NPV.



El NPV responde de manera contraria a la amígdala, su respuesta en la evocación siempre tiende a ser mayor que en su adquisición, aunque el incremento resultó estadísticamente significativo solo para los grupos controles.

Conclusiones de la fase 3.

Con este experimento se pudo definir si los núcleos que participan en la adquisición participan nuevamente en la evocación, al parecer aunque hay una pequeña disminución con respecto a la adquisición en el núcleo amigdalino los mismos núcleos se ven involucrados en la reexposición al estímulo condicionado, no parece

haber una discriminación entre el apareamiento de un estímulo positivo con respecto a uno negativo, los núcleos responden de una manera similar ante el recuerdo de un evento aversivo como de un evento positivo sin dar ninguna etiqueta a la exposición previa. El NPV respondió de manera diferente a la amígdala, teniendo un pequeño incremento en el evocado con respecto a su adquirido para los grupos control.

Experimento 4. Expresión de Fos posterior a una exposición repetida de estímulos gustativos y viscerales, en la adquisición y en la evocación del CAS.

Metodología.

Prueba conductual.: La línea base se realizó de la misma manera que en los experimentos pasados, para el quinto día se realizó el siguiente protocolo:

Tabla 5. Protocolo

| Grupos n=5 | D 1 | D 2 | D 3 | D 4 | D 5 | D 6 | D 7 | D 8 | D 9 | D 10 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|------------------|-----|-----|-------------------|
| 3Sac-NaCl | Lb | Lb | Lb | Lb | Adq | Adq | Adq y Sacrificio | | | |
| 3Sac-LiCl | Lb | Lb | Lb | Lb | Adq | Adq | Adq y Sacrificio | | | |
| 3Sac-NaCl / Sac | Lb | Lb | Lb | Lb | Adq | Adq | Adq | Lb | Lb | Evoc y Sacrificio |
| 3Sac-LiCl / Sac | Lb | Lb | Lb | Lb | Adq | Adq | Adq | Lb | Lb | Evoc y Sacrificio |
| Sac | Lb | Lb | Lb | Lb | Adq y Sacrificio | | Adq | | | |
| * Sac-Sac | Lb | Lb | Lb | Lb | Adq | Adq | Adq | Adq | Adq | Adq y Sacrificio |

Para el grupo de 3Sac-LiCl y 3Sac-NaCl, el quinto día se presentó la primer adquisición bajo las mismas condiciones que en los experimentos pasados, pero durante dos días más se dio la misma presentación, en el tercer día de adquisición los animales fueron sacrificados y perfundidos.

Para los grupos de 3Sac-LiCl/Sac y 3Sac-NaCl/Sac se realizó el mismo protocolo para las adquisiciones solo que durante los dos días consecutivos de la tercera adquisición a los animales se les presentó su línea base de agua bajo la misma

condición y el día de prueba se presentó el estímulo condicionado llenando el bebedero a 15 ml con Sacarina, dos horas después se siguió el mismo procedimiento que en los experimentos anteriores, para el grupo de Sac-Sac, se presentó la línea base durante 4 días y a partir del quinto día se expuso a los animales a una línea base de sacarina, durante 5 días consecutivos, los animales después de las 5 reexposiciones de sacarina fueron sacrificados de la misma forma que en los experimentos anteriores.

Resultados. Se realizó la prueba estadística de ANOVA con un análisis Post Hoc de Fisher obteniendo que para los grupos de tres exposiciones en adquisición y en evocación en amígdala lateral ($F_{5,20} = 2.540$; $p > 0.05$) no encontrando diferencias significativas entre grupos, para amígdala basolateral ($F_{5,20} = 2.397$; $p > 0.01$), con diferencias significativas entre grupos posterior a la última adquisición, y en el núcleo central ($F_{5,20} = 2.125$; $p < 0.001$) estadísticamente significativo.

Gráfica 13. Número de células positivas a Fos ante la exposición repetida de adquisiciones.

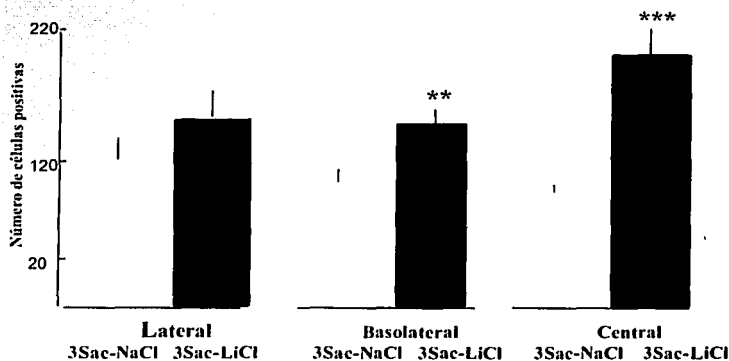


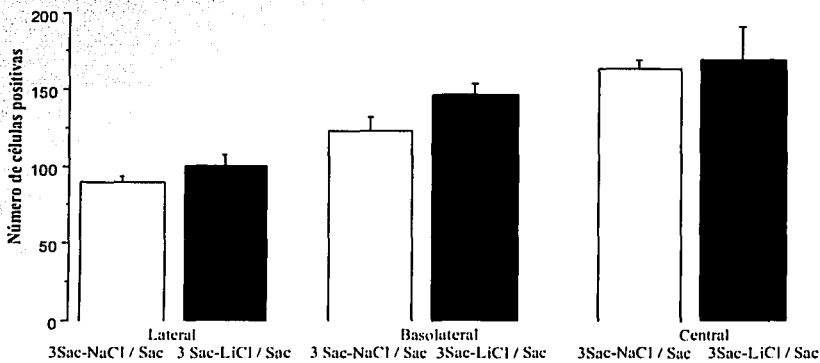
Figura 12. Células positivas a Fos en el complejo amigdalino en una exposición continua de adquisiciones.



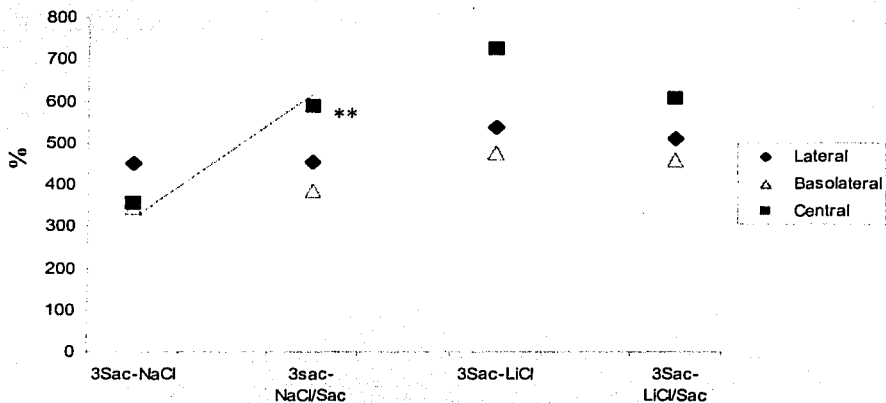
Para la evocación se obtuvo lo siguiente: ($F_{5,20} = 2.540$; $p < 0.05$), para el núcleo central se encontraron diferencias significativas en los grupos de adquisición y evocación control obteniendo que ($F_{4,20} = 2.415$; $p < 0.05$).

Para las evocaciones no se encontraron diferencias significativas con respecto a sus controles.

Gráfica 14. Número de células positivas a Fos ante la evocación de la exposición repetida de adquisiciones.



Gráfica 15. Porcentaje de células positivas a Fos ante la exposición repetida de adquisiciones.



Solo el núcleo central resultó estadísticamente significativo en su incremento el la evocación, los demás núcleos aunque tuvieron ligeros incrementos y pequeños decrementos no resultaron estadísticamente significativos.

Núcleo paraventricular

La gráfica siguiente muestra los resultados obtenidos para NPV en la exposición repetida de adquisiciones y sus evocaciones, se obtuvo que hubo diferencias significativas entre el grupo de adquisición con respecto a su control $F_{1,8} = 6.203$ $p > 0.01$; para las evocaciones se obtuvo $F_{3,16} = 10.501$ $p > 0.01$ con diferencias estadísticamente significativas.

Entre los grupos adquiridos y evocados se encontraron diferencias estadísticamente significativas solo en el grupo de 3Sac- LiCl vs 3Sac-LiCl/Sac, $F_{3,16} = 10.501$ $p > 0.01$.

Gráfica 16. Número de células positivas a Fos ante 3 adquisiciones repetidas del estímulo condicionado y el incondicionado en el NPV.

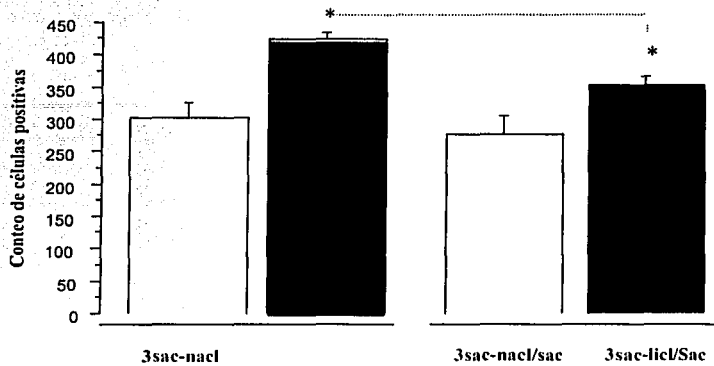
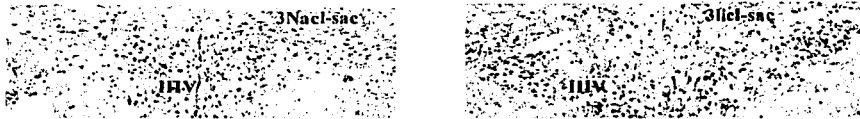
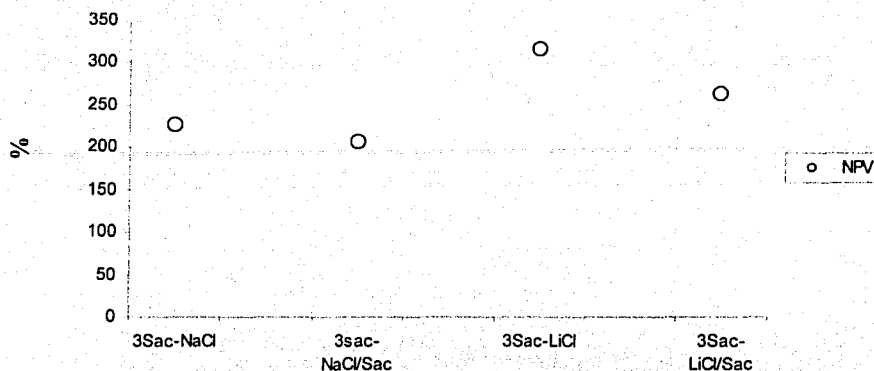


Figura 13. Exposiciones repetidas de adquisiciones en el NPV.



Para los grupos de tres exposiciones se encontraron diferencias significativas ($F_{3,13} = 7.782$; $p > 0.001$) con respecto a su control, y también en la fase de evocación ($F_{3,13} = 7.782$; $p < 0.05$) se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Gráfica 17. Porcentaje de 3 exposiciones y sus respectivas evocaciones en el NPV.



En el NPV en porcentajes se obtuvo que en ambos grupos; en el control y en el experimental; se encontró un ligero decremento en la evocación, no estadísticamente significativo, con respecto a la adquisición, respondiendo en mayor forma el LiCl tanto en adquisición, como su evocado, con respecto a su control.

Novedad-Familiaridad

Se obtuvieron diferencias significativas en la amígdala lateral ($F_{1,8}=6.054$; $p<0.05$) y en la basolateral ($F_{1,8}= 10.789$; $p>0.01$), para la central no se encontraron diferencias significativas, con respecto a sus controles.

Gráfica 18. Número de células positivas a Fos ante 5 exposiciones de Sacarina y una sola estimulación en el núcleo amigdalino.

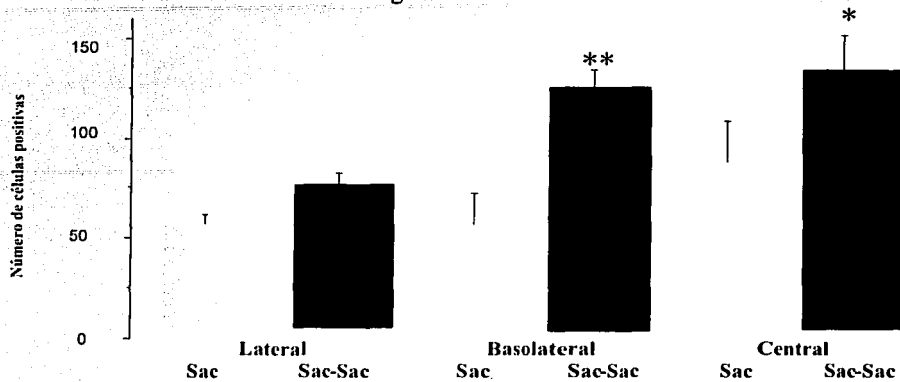


Figura 14. Células positivas a Fos en la amígdala ante la novedad y la familiaridad de un estímulo gustativo.

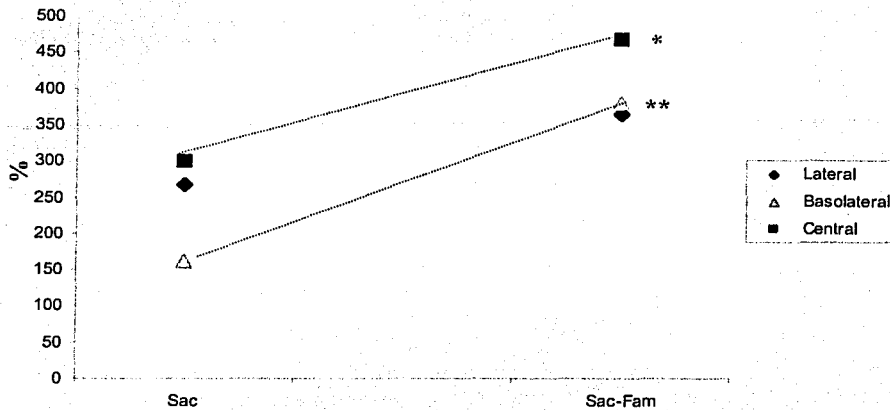


Para realizar las comparaciones entre grupos se analizaron todos aquellos que hayan tenido una exposición de sacarina con y su evocado o varias exposiciones de sacarina y sus evocaciones.

En cuanto a los porcentajes se analizaron para el complejo amigdalino ante la exposición novedosa y familiar, en la siguiente gráfica.

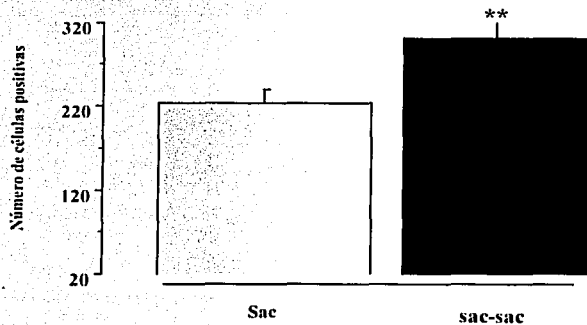
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 19. Porcentajes en el complejo amigdalino ante la novedad y ante la familiaridad.



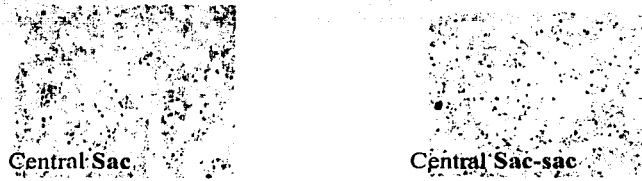
Para las pruebas estadísticas de una sola exposición de sacarina y el grupo de exposiciones repetidas en el núcleo paraventricular del hipotálamo se obtuvo lo siguiente: ($F_{1,10} = 8.432$; $p > 0.01$) con una significancia estadística.

Gráfica 20. Número de células positivas a Fos ante adquisiciones repetidas y una sola exposición del estímulo condicionado en el NPV.



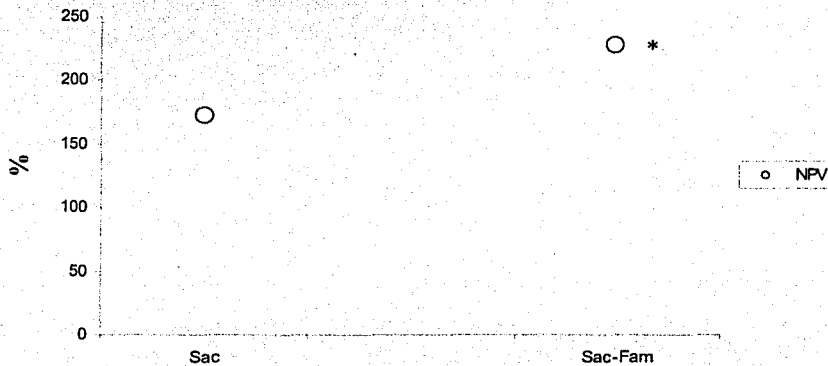
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 15. Activación de la amígdala central ante la novedad y la familiaridad.



Se realizó el mismo análisis de comparaciones para el NPV.

Gráfica 21. Porcentaje de células en NPV.



En el NPV podemos observar una respuesta patrón en de un estímulo novedoso vs. un estímulo familiar, no importa que asociación tenga, el NPV responde siempre de la misma forma, con un incremento en la evocación.

Conclusiones del experimento 4.

El núcleo paraventricular responde positivamente ante cualquier evento, ya sea que haya tenido un apareamiento con un estímulo positivo o con uno negativo, no hay discriminación de eventos en esta estructura, sin embargo los núcleos basolateral y

central se encuentran más involucrados en la percepción de que tan familiar seguro es un evento, más que las otras estructuras analizadas.

Discusiones y conclusiones generales.

Muchos estudios involucran a la amígdala central en el procesamiento de estímulos gustativos y viscerales^{16,18,23,39}, los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran los resultados de varios grupos de trabajo, en donde se demuestra que la amígdala central y el núcleo paraventricular del hipotálamo son activados por la estimulación con LiCl, en la mayoría de los estudios se concluye que esta activación se da como efecto causado por el estrés que provoca en el organismo el malestar que ocasiona el LiCl¹⁶.

La estimulación de las neuronas por LiCl se propone que se da por dos vías, mediadas por la ruta vagal (parasimpático), y por la vía esplénica (simpático), las aferencias con las que cuenta la amígdala central son tanto gustativas como viscerales, se puede observar eso en los resultados, puesto que con ambos estímulos la amígdala central se activó¹⁶. El NPV se encuentra también involucrado en la respuesta ante el malestar y el estrés, el NPV se encuadra conectado también por vía vagal al peritoneo, donde entra el estímulo incondicionado, diversos estudios han descrito la conexión entre el NPV y la amígdala central, mediante la secreción de hormonas glucocorticoides^{38, 41} aunque no se han descrito con claridad los neuropeptidos secretados por la central a partir de estímulos que causen estrés en el organismo¹⁸.

Lo que puede concluirse es que tanto la amígdala central como el NPV responden ante estímulos de estrés y ante estímulos novedosos¹¹, como el consumo de la sacarina; en estudios realizados por Sutherland y Donald 1990 se atenúa la neofobia con lesiones en la amígdala¹¹, al parecer la activación de estos dos núcleo y su interacción para la

secreción de hormonas regula el organismo para prepararlo ante cualquier evento que podría ocasionar el estímulo nuevo, o en el caso del LiCl, a responder ante el malestar que este provoca.

El núcleo basolateral se ha reportado que no se encuentra involucrado en la respuesta al estímulo incondicionado», sin embargo se activó más que los otros núcleos con el LiCl, aunque concuerda con los resultados obtenidos por Navarro» donde se puede observar la participación del núcleo basolateral, este al parecer responde ante la inyección con respecto a su control; sin embargo, en el consumo sucedió lo mismo, no se encontró un incremento considerable por algún estímulo, lo que puede llevarnos a la conclusión de que el núcleo basolateral también participa activamente en el procesamiento de ambos estímulos, esto concuerda con estudios anteriores» donde se muestra que lesiones en la amígdala basolateral evita el apareamiento del EC y el EI en el CAS.

De acuerdo a los datos obtenidos en los experimentos realizados, se comprueba que no hay sinergismos, se esperaba que los datos de la unión de los estímulos gustativos y viscerales se sumaran y dieran un resultado aproximado, en la amígdala se obtuvieron resultados que se acercaban a esta hipótesis, pero en el PVN no se encontró tal resultado, al parecer las neuronas involucradas en la respuesta al estímulo gustativo son las mismas que responden al estímulo visceral y no sucede que dentro de los núcleos existan grupos de neuronas que respondan ante cada estímulo de manera distinta.

En el experimento de una sola exposición de sacarina versus varias exposiciones al parecer solo responde per sé; de igual manera que si se inyecta NaCl que muestra que de alguna manera inhibe la expresión.

La evocación responde al recuerdo de eventos gustativos, mas no de eventos aversivos, sino que el recuerdo solo es la etiqueta al sabor familiar, como es el caso de la sacarina y el grupo de Sac-NaCl responde en la evocación, de tal forma que muestra que el grupo aprendió a etiquetar el sabor y no a etiquetar el estímulo como aversivo.

Como una conclusión general se puede distinguir a la amígdala central en su respuesta ante el estímulo condicionado y el incondicionado en mayor número de células positivas a Fos, la amígdala basolateral como un núcleo de procesamiento de ambos estímulos, y la central en eventos de familiaridad más que otros núcleos.

Todos los núcleos se ven involucrados en la evocación aunque parece que no responden autónomamente, sino que solo son centros de relevo, donde la información solo pasa en la adquisición y en la evocación debe estar almacenada en otros núcleos, el núcleo paraventricular es clara su respuesta ante eventos de estrés.

Diversos estudios de lesiones en la amígdala muestran que los animales pierden la capacidad de adquirir el CAS, lo que nos habla también de que la amígdala puede estar envuelta en los procesamientos de los estímulos condicionados y los incondicionados pero no en su almacenamiento, solo en la recepción de la información.

Pudimos responder las preguntas planteadas inicialmente en los objetivos, concluyendo de esta forma el presente trabajo.

Anexo1. Soluciones y técnicas.

Prueba de Inmunohistoquímica para Fos.

Los cortes fueron seleccionados con alturas específicas, de acuerdo con el atlas de Paxinos (Anterior: Interaural 7.60mm, Bregma -1.40mm; Posterior: Interaural 6.88mm, Bregma -2.12mm), se colocaron 7 cortes por pozo, por animal; se enjuagaron tres veces por 10 minutos en PBS (Buffer Salino de Fosfatos), se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de 0.3% de H₂O₂ en PBS se hicieron tres enjuagues posteriores de 10 minutos en PBS, la segunda incubación fue con PBS +Tritón 2% NGS (Suero normal de Cabra; Vector) 2% BSA (Sigma), sin enjuagar se colocó la solución del primer anticuerpo (anticuerpo policlonal de conejo anti Fos), con una dilución de 1:2500 en PBS +T 1% NGS. Se volvieron a realizar enjuagues en PBS +T y se incubó en una solución de Peroxidasa biotilada-Avidina (ABC)Vector, por dos horas más y se enjuagó posteriormente en PBS+T 3/10 minutos.

El revelado se realizó con el stock de revelado KIT Vector SK 41000, los cortes se flotaron en la solución hasta que tomaron una coloración café y se paró la reacción con PBS frío. Los cortes se guardaron para su montaje previo en 4°C durante 12 horas.

Buffer de Perfusión

En 850ml de agua desionizada se disuelven en agitación constante 8grs de NaCl, 0.25grs de KCl, 0.5grs de NaHCO₃ 50 ml de PB 0.2M, se ajusta el pH a 7.4 y se realiza la perfusión vía intracardiaca.

PB 0.2M

Se pesan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4.6grs), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (44.69g), se disuelven en agitación en 1000 ml de H_2O desionizada y se ajusta el pH a 7.4.

Sacarosa 30%

30grs sacarosa en 100ml de PB 0.1M

Paraformaldehído al 4%.

Calentar a 60 grados centígrados 400 ml de H_2O desionizada y agregar 40g de Paraformaldehído, agitar hasta que se disuelva; añadir 2 a 3 gotas de NaOH (saturado) para aclarar la solución añadir 500 ml de pB 0.2 M pH 7.4 medir el PH y ajustar a 7.4 con HCl si es necesario aforar a 1L. Se aplica posterior al buffer de perfusión durante 7 minutos más.

PBS

Se mezcla una parte de PB0.2M con una parte de solución salina 0.3M (dilución 1:1) para obtener una concentración final de buffer fosfato (0.1M) + solución salina (0.15M, 0.9%) Ph 7.4.

Anexo 2. Promedio del número de células antero posterior.

| Rata | Grupo | Lateral | Basolateral | Central | PVN |
|------|--------------|---------|-------------|---------|-------|
| 1 | H2O | 20 | 24.25 | 23 | 131.5 |
| 2 | H2O | 15 | 21.75 | 18 | 141 |
| 3 | H2O | 15 | 18 | 32.75 | 115.5 |
| 4 | H2O | 19.5 | 43.75 | 27.5 | 139.5 |
| 5 | H2O | 29.25 | 53 | 38.5 | 144.5 |
| 6 | Sac | 54 | 111.95 | 160.75 | 204.5 |
| 7 | Sac | 35 | 51.75 | 91.75 | 226 |
| 8 | Sac | 62.5 | 48 | 52.75 | 195 |
| 9 | Sac | 60.75 | 23 | 62.75 | 270 |
| 10 | Sac | 51.5 | 25.5 | 49 | 265 |
| 11 | NaCl | 69.75 | 54.5 | 49.75 | 284.5 |
| 12 | NaCl | 16.5 | 37.5 | 38.25 | 406 |
| 13 | NaCl | 25 | 55.5 | 44 | 282 |
| 14 | NaCl | 15.25 | 135 | 74 | 258 |
| 15 | NaCl | 54 | 84.5 | 47 | 280 |
| 16 | LiCl | 44 | 77.25 | 187.5 | 456.5 |
| 17 | LiCl | 40.5 | 79.75 | 200.5 | 429.5 |
| 18 | LiCl | 40.75 | 90.5 | 203.25 | 353.5 |
| 19 | LiCl | 79.25 | 130.25 | 226 | 335 |
| 20 | LiCl | 37.75 | 67.75 | 223.5 | 412.5 |
| 21 | Sac-LiCl | 126.5 | 210.25 | 235.75 | 265 |
| 22 | Sac-LiCl | 94 | 173.75 | 241 | 284 |
| 23 | Sac-LiCl | 91.5 | 89.25 | 205.25 | 429.5 |
| 24 | Sac-LiCl | 102.25 | 149.75 | 290.25 | 240 |
| 25 | Sac-LiCl | 78.25 | 124.75 | 183 | 315.5 |
| 26 | NaCl-Sac | 74.5 | 114.5 | 116.75 | 298.5 |
| 27 | NaCl-Sac | 57.75 | 98.75 | 77.75 | 324.5 |
| 28 | NaCl-Sac | 61.25 | 96 | 106 | 140 |
| 29 | NaCl-Sac | 53 | 101.25 | 127.5 | 259.5 |
| 30 | NaCl-Sac | 104 | 119.75 | 122.5 | 200 |
| 31 | tadqLiCl-Sac | 100 | 207 | 204 | 435.5 |
| 32 | tadqLiCl-Sac | 128 | 141.5 | 264 | 455 |
| 33 | tadqLiCl-Sac | 99 | 158.25 | 252.75 | 427.5 |
| 34 | tadqLiCl-Sac | 119.25 | 132.75 | 180.5 | 405 |
| 35 | tadqLiCl-Sac | 84.75 | 124.25 | 111.75 | 399 |
| 36 | tadqNacl-Sac | 130 | 149.75 | 180 | 216 |
| 37 | tadqNacl-Sac | 102.75 | 112 | 66 | 364 |
| 38 | tadqNacl-Sac | 80.5 | 81.5 | 80.5 | 324.5 |
| 39 | tadqNacl-Sac | 71.5 | 111.75 | 56 | 308.5 |
| 40 | tadqNacl-Sac | 59.25 | 97.75 | 113.5 | 300 |

| Rata | Grupo | Lateral | Basolateral | Central | PVN |
|------|-------------------|---------|-------------|---------|-------|
| 41 | tadqLiCl-Sac-Evoc | 76.5 | 124.5 | 94.5 | 366 |
| 42 | tadqLiCl-Sac-Evoc | 112.25 | 144 | 214 | 333.5 |
| 43 | tadqLiCl-Sac-Evoc | 100 | 150.25 | 215.75 | 391 |
| 44 | tadqLiCl-Sac-Evoc | 107.25 | 146.5 | 162.5 | 321 |
| 45 | tadqLiCl-Sac-Evoc | 108.25 | 168.75 | 158.75 | 350 |
| 46 | tadqNaCl-Sac-Evoc | 100 | 104 | 163.5 | 253.5 |
| 47 | tadqNaCl-Sac-Evoc | 83.5 | 119 | 159.75 | 278.5 |
| 48 | tadqNaCl-Sac-Evoc | 87.75 | 155.75 | 181.75 | 203 |
| 49 | tadqNaCl-Sac-Evoc | 97.5 | 116.5 | 151.5 | 372 |
| 50 | tadqNaCl-Sac-Evoc | 80.5 | 123.5 | 165.5 | 280 |
| 51 | LiCl-Sac-Evoc | 90 | 95.75 | 94.25 | 319 |
| 52 | LiCl-Sac-Evoc | 139.5 | 186.25 | 163 | 374 |
| 53 | LiCl-Sac-Evoc | 94 | 102.5 | 124.5 | 222 |
| 54 | LiCl-Sac-Evoc | 81 | 105.25 | 115.5 | 426.5 |
| 55 | LiCl-Sac-Evoc | 80.5 | 113 | 93.5 | 350 |
| 56 | NaCl-Sac-Evoc | 89 | 96 | 104.5 | 401.5 |
| 57 | NaCl-Sac-Evoc | 61.75 | 67.5 | 61.5 | 280 |
| 58 | NaCl-Sac-Evoc | 52.75 | 63.75 | 59.25 | 401 |
| 59 | NaCl-Sac-Evoc | 50 | 70.75 | 64.25 | 367.5 |
| 60 | NaCl-Sac-Evoc | 60 | 111.75 | 97.75 | 354.5 |
| 61 | Sac-Fam | 87.25 | 170.75 | 215.75 | 334.5 |
| 62 | Sac-Fam | 72.25 | 114.5 | 138.25 | 274.5 |
| 63 | Sac-Fam | 57.5 | 85.25 | 86 | 344 |
| 64 | Sac-Fam | 82.5 | 111.5 | 122.5 | 258 |
| 65 | Sac-Fam | 59.25 | 128.25 | 88.5 | 315 |

Bibliografía.

1. **Abramson, C.I. A primer of invertebrate learning.** A.P.A. Washington, 1994
2. **Anokhin K, Ryabinin E, Sudakov V. Expression of the Fos gene in the mouse brain during the acquisition of defensive behavior habits.** Neuroscience and Behavioral Physiology Vol. 31 No.2 (2001) 139-143.
3. **Bermúdez F, McGaugh J. Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion.** Brain Research. 549. (1991) 165-170.
4. **Bures J, Bermúdez F. et al. Conditioned Taste Aversion.** New York. Oxford Science Publications. 1998.
5. **Bianchin M, Souza T, Medina J, Izquierdo I. The amygdala is involved in the modulation of long - term memory, but not in working or short - term memory.** Neurobiology of Learning and Memory. 71 (1999) 127-131.
6. **Cahill L, McGaugh J. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of task using appetitive and aversive reinforcement.** Behavioral Neuroscience 1990 (1990) 532-543.
7. **Camarota M, Bevilacqua L, Ardenghi P, Parachata G, Levi M, Izquierdo I, Medina J. Learning associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade.** Molecular Brain Research. 76 (2000) 36-46.
8. **Carter D, Murphy D. Regulation of Fos expression in the rat supraoptic nucleus.** Cellular and Molecular Neurobiology. Vol. 10 No. 3 (1990) 435-445.
9. **Cole R, Sawchenko. Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** The journal of Neuroscience, February 2002, 22(3):959-969.

10. Dayas CV, Buller KM, Day TA. **Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala.** Eur J Neurosci 1999 Jul 11:2312-22
11. Dudai Y, Roseblum K, Meiri N. **Correlates of taste aversion learning in the rodent brain.**
12. Gustavson C, Garcia J, Hankins K, Rusiniak W. **Coyote predation control by aversive conditioning.** Science 184:581-583.
13. Gallo M, Roldan G, Bures J. **Differential involvement of gustatory insular cortex and the amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats.** Behavioral Brain Research. 52 (1992) 91-97.
14. Garcia R, Garcia J. **Darwin was a Learning Theorist. Evolution and Learning.** Lawrence Erlbaum Associates Inc. Hillsdale, (1987).N.J.
15. Garcia J. **The evolution of eating safely.** Brain Research Bulletin. Vol. 6 No.2 (1982) 3-5.
16. Hamamura T, Lee Y, Ohashi K, Fujiwara Y, Miki M, Suzuki H, Kuroda S. **Low dose of lithium chloride selectively induces Fos protein in the central nucleus of the amygdala of rat brain.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2000 Feb 24:285-94.
17. Hoffman G, Smith S, Verbalis J. **Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems.** Frontiers in Neuroendocrinology . Vol. 14, No.3 (1993) 173-213.
18. Honkaniemi J, Kainu T, Ceccatelli S, rechartd L, Hökfelt T, PeltoHuikko M. **Fos and Jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress.** Neuroreport 3 (1992) 849-852.

19. Hsu DT, Chen FL, Takahashi LK, Kalin NH. **Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis.** Brain Res 1998 Mar 788:305-10.
20. Houpt TA, Berlin R, Smith GP. **Subdiaphragmatic vagotomy does not attenuate Fos induction in the nucleus of the solitary tract after conditioned taste aversion expression.** Brain Res 1997 Jan 747:85-91. No.1.
21. Iqbal G, Fujioka T, Nakamura S. **Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restrain stress.** Brain Research Bulletin. Vol.52, No.3 (2000) 171-182.
22. Kovacs K. **Fos as a transcription factor: stressful review from a functional map.** Neurochemistry 33 (1998) 287-297.
23. Lamprecht R, Dudai Y. **Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl.** Neuroreport 7 (1995) 289-293.
24. Leathwood P, Ashley D. **Behavioral strategies in the regulation of food choice.** Experiential Supplements. 44 (1983) 171-196.
25. Lindemann B. **Receptors and transduction in taste.** Nature 2001 Sep 413:219-26. Volume 413 • Issue 6852.
27. Lindemann B. **Taste reception.** Physiol Rev 1996 Jul Vol. 76:718-66. No. 3
28. Lindemann B. **Chemoreception: tasting the sweet and the bitter.** Curr Biol 1996 Oct. Vol.6:1234-7. Num.10.
29. Lindemann B. **A taste for umami.** Nat. Neuroscience 2000 Feb. Vol.3:99-100. No.2.

30. Matsunaga W, Takamana A, Bun H, Nakashima T, Kiyohara T. **LPS – induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus.** Research Report. 858 (2000) 9-18.
31. Montag M, Weizl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M. **Novelty induced increased expression of immediate early genes Fos and arg 3.1 in the mouse brain.** Journal of Neurobiology. 38 (1999) 234-246.
32. Nader K, Schafe G, Le Doux J. **Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval.** Nature 406 (2000) 722-726.
33. Navarro M, Spray K, Cuberol, Thiele T, Bernstein. **cFos induction during conditioned taste aversion expression varies with aversion strength.** Brain Research. 887 (2000) 450-453.
34. Nolan L, McCaughey S, Giza. B, et.al. **Extinction of a conditioned taste aversion in rats. Behavioural effects.** Physiology & Behaviour, Vol 61, No.2, pp. 319-323, 1997.
35. Olszewski P, Shi Q, Billington C, Levine A. **Opioids affect acquisition of LiCl induced conditioned taste aversion: involvement of OT and VP systems.** American Journal of Physiology and Integrative Compound Physiology. 279 (2000) 1504-1511.
36. Pezzone M, Lee W, Hoffman G, Rabin B. **Induction of Fos Immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli.** Brain Research. 597 (1992) 41-50.
37. Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. **Molecular mechanism associated with long term consolidation of the NMDA signals.** Life Sciences 67 (200) 335-364.
38. Sakai N, Yamamoto T. **Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion.** Neuroscience Research 35 (1999) 53-61.

39. Sakai N, Yamamoto T. **Conditioned taste aversion and Fos expression in the rat brainstem after administration of various USs.** *Neuroreport* 8, 2215-20 (1997)
40. Shafe G, Thiele T, Bernstein I. **Conditioning method dramatically alters the role of amygdala in taste aversion learning.** *Vol. 5, 481-92. Issue 6.*
41. Spencer C, Houpt T. **Dynamics of Fos and ICER mRNA expression in rat forebrain following lithium chloride injection.** *Molecular Brain Research. 93 (2001) 113-126.*
42. Swank M, Bernstein I. **Fos induction in response to a conditioned stimulus after single trial taste aversion learning.** *Brain Research. 636 (1994) 202-208.*
43. Swank M, Ellis A, Cochran B. **Fos antisense blocks acquisition and extinction of conditioned taste aversion in mice.** *Neuroreport. 7 (1996) 1866-1870.*
44. Swank M. **Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning.** *Neuroreport. Vol, No.18 (2000) 1625-1630.*
45. Swank M. **Conditioned Fos in mouse NTS during expression of a learned taste aversion depends on contextual cues.** *Brain Research. 862 (2000) 138-144.*
46. Swank M, Shafe G, Bernstein I. **Fos induction in response to taste stimuli previously paired with amphetamine or LiCl during taste aversion.** *Brain Research. 673 (1995) 251-261.*
47. Swank M. **Coordinate regulation of Fos and Jun proteins in mouse by LiCl.** *NeuroReport. 10 (1999) 3685-3689.*
48. Vazdarjanova A, McGaugh J. **Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning.** *Journal of Neuroscience. Vol.19 No.15 (1999) 6615-6622.*

49. Welzl H, D'Adamo P, Lipp H. **Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm.** Behavioural Brain Research. 125 (2001) 205-213.
50. Woody C. Conditioning. Plenum Publishing Corporation. USA. 1982. pp.567-79.
51. Yamamoto T, Azuma S, Kawamura Y. **Functional relations between the cortical gustatory area and the amygdala: Electrophysiological and behavioral studies in rats.** Experimental Brain Research. 56 (1984) 23-31.
52. Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima, Sakai N. **Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat.** Behavioural Brain Research. 65 (1994) 123-137.
53. Yamamoto T, Sako N, Sakai N, Iwafune A. **Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of Fos like immunoreactivity.** Neuroscience Letters 226 (1997) 127-130.
54. Yamamoto T, Fujimoto Y. **Brain mechanism of taste aversion learning in the rat.** Brain Research Bulletin. Vol.27. pp.403-406. 1991.
55. Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Azuma S, et. al. **Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride.** Neuroreport 3, 1049-52 (1992).
56. Yasoshima Y, Morimoto T, Yamamoto T. **Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats.** Brain Research, 869 (2000) 15-24.
57. Tsigos C, Chrousos G. **Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.** J Psychosom Res 2002 Oct 53:865
58. Dunn J., Whitener J. Neuroendocrinology 42 211-217 (1986)

59. Paxinos G, Watson C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** London, San Diego: Academic Press, 1986.
60. Boudaba C, Szabó K, Tasker JG. **Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus.** J Neurosci 1996 Nov 16:7151-60
61. Chang FC, Scott TR. **Conditioned taste aversions modify neural responses in the rat nucleus tractus solitarius.** J Neurosci 1984 Jul 4:1850-62
62. Norgren R, Leonard CM. **Taste pathways in rat brainstem.** Science 1971 Sep 173:1136-9
63. Shapiro RE, Miselis RR. **The central neural connections of the area postrema of the rat.** J Comp Neurol 1985 Apr 234:344-64
64. Greenberg ME, Ziff EB. **Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the Fos proto-oncogene.** Nature 1984 Oct 4-10 311:433-8
65. Sheng M, Greenberg ME. **The regulation and function of Fos and other immediate early genes in the nervous system.** Neuron 1990 Apr 4:477-85
66. Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T, Greenberg ME. **Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase.** Mol Cell Biol 1995 Jul 15:3672-84.
67. Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME. **Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism.** J Neurosci 1996 Sep 16:5425-36.
68. Saper CB, Loewy AD. **Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat.** Brain Res 1980 Sep 197:291-317.

69. Suemori K, Kobashi M, Adachi A. **Effects of gastric distension and electrical stimulation of dorsomedial medulla on neurons in parabrachial nucleus of rats.** J Auton Nerv Syst 1994 Aug 48:221-9.
70. Schwarz M, Susswein AJ. **Presence of conspecifics facilitates learning that food is inedible in *Aplysia fasciata*.** Behav Neurosci 1992 Apr 106:250-61.
71. Susswein AJ, Schwarz M, Feldman E. **Learned changes of feeding behavior in *Aplysia* in response to edible and inedible foods.** J Neurosci 1986 May 6:1513-27
72. Schwarz M, Susswein AJ. **A neural pathway for learning that food is inedible in *Aplysia*.** Brain Res 1984 Mar 294:363-6
73. Berrúdez F., Prado R. **Memoria.** Edit. Trillas. México 2001. 1ª edición.
74. Kandel E., Jessell T. et al. **Neurociencia y Conducta.** Edit. Prentice Hall. España. 1997. 1ª edición.
75. Anderson J. **Aprendizaje y Memoria.** Edit Mc Graw Hill. México. 2ª edición.