

A

00322

36

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

MEMORIA GUSTATIVA EN LA CORTEZA
PERIRRINAL: PARTICIPACIÓN DE LOS
RECEPTORES MUSCARÍNICOS Y
GLUTAMATÉRGICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VANESA DE LA CRUZ OCEGUERA



DIRECTOR DE TESIS
DR. FEDERICO BERMUDEZ RATION



2003
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.

PAGINACION

DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo receptor

NOMBRE: Vanesa
De la Cruz Ocegüera
FECHA: 1/abril/2003
FIRMA: [Firma]

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Memoria gustativa en la corteza perirrinna: participación de los receptores
muscarínicos y glutamatérgicos.

realizado por Vanesa De la Cruz Ocegüera

con número de cuenta 9524597-5, quien 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

Psic. Ranier Gutiérrez Mendoza

Propietario

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Esp. Dip.

Suplente

Dra. María Isabel Miranda Saucedo

Suplente

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

M. en C. [Firma] Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A los meros meros: mis papás, mis mejores maestros, por apoyarme siempre en todo. A Luisa, mi hermana.

A la familia. A Mauricio por sus risas y a mis primos y tíos.

A los amigos. Especialmente a Mayté -una persona grandota-, a Carlos (con quien aprendí mucho en la facultad, fuera de clases), a David y a Xóchitl; por compartir lo feliz y lo triste. A Anidia e Hiram por estar siempre. A Juan, Goyo, Adriana y Jorge.

A quienes hacen más ameno el ambiente en el labo. A Ranler (¡gracias!, ¡gracias!) por su amistad y por lo que está en la siguiente página. A Carlos, muchas gracias también. A Guillaume, quien me adoptó como estudiante y amiga al llegar al laboratorio. A Luis, Israela, Jimena, Maribel, Luisito, Enrique, Eduardo, Miriam, Leticia, Marisela, Sergio, Luciana, Luis R., Gina, Sandra, Bárbara y Óscar.

A la facultad de Ciencias, a la UNAM y a quienes luchan por que la Universidad Nacional Autónoma de México continúe siendo tal.



A Federico Bermúdez por el apoyo y la libertad que brinda a sus estudiantes. A Ranier Gutiérrez por ser un gran maestro; por sus consejos y motivación para realizar investigación.

A Carlos, por formar gran parte de éste y de muchos otros trabajos.

A María Isabel Miranda, por sus consejos y por todo todo (sí, otra vez) su apoyo.

A Silvestre Alavez, por sus valiosos comentarios a esta tesis –aunque suene a cliché- y a María Luisa Fanjul, por realizar la revisión de este trabajo.

A Bárbara y a los valientes que soportan a los Bermúdez. A Oreste y Yolanda, por su paciencia. A Paco, por salvar a las computadoras y a Jandete, por su ayuda con los numerosos cortes de cerebro.

La historia de la medida de la memoria

Cuentan los viejos más viejos de los nuestros, que los más primeros dioses, los que nacieron el mundo, repartieron la memoria entre los hombres y mujeres que caminaban el mundo. Buena es la memoria -dijeron y se dijeron los más grandes dioses-, porque ella es el espejo que ayuda a entender el presente y que promete el futuro.

Con una jicara hicieron los más primeros dioses la medida para repartir la memoria y fueron pasando todos los hombres y mujeres a recibir su medida de memoria. Pero resulta que unos hombres y mujeres eran más grandes que otros y entonces la medida de memoria no se veía igual en todos. Los más pequeños la brillaban más plena y en los más grandes se opacaba. Por eso dicen que dicen que la memoria es más grande y fuerte en los pequeños y es más difícil de encontrar en los poderosos. Por eso dicen también que los hombres y mujeres se van haciendo cada vez más pequeños cuando envejecen. Dicen que es para que más brille la memoria. Dicen que ese es el trabajo de los más viejos de los viejos: hacer grande la memoria.

Y dicen también que la dignidad no es más que la memoria que vive. Dicen.

El Viejo Antonio

Índice

Introducción	1
Memoria a corto y a largo plazo	2
Clasificación de la memoria	2
El CAS, modelo para estudiar el aprendizaje y la memoria	4
La corteza peririnal y el gusto	9
Localización de la corteza peririnal	10
Sistemas colinérgico y glutamatérgico	11
Planteamiento del problema	13
Hipótesis.	13
Objetivos	14
Métodos	
Animales	14
Cirugía	15
Procedimiento conductual	15
Fármacos	17
Microinyecciones	17
Histología	17
Resultados	
Experimento 1	19
Experimento 2	20
Experimento 3	21
Discusión	25
Bibliografía	29

Introducción

Los organismos modifican su conducta en función de los eventos que ocurren en su medio ambiente, ocasionando cambios en su sistema nervioso. Esta capacidad adaptativa les da la habilidad de aprender y recordar (Squire, 1986).

El aprendizaje se define como el proceso por el cual adquirimos conocimientos sobre el mundo. La memoria es el proceso por el que el conocimiento es almacenado y evocado. (Kandel *et al.*, 2000). El aprendizaje y la memoria nos dan individualidad. Por medio del aprendizaje se transmite la cultura de generación en generación y éste actúa como mecanismo de adaptación conductual, por lo que la pérdida de memoria conlleva a la pérdida del contacto con uno mismo, con nuestra historia individual y con otros individuos (Kandel y Hawkins, 1992).

El hombre, a diferencia de los demás animales, además de aprender trata de comprender cómo es que aprende. Los primeros estudios sobre la memoria se remontan a la antigua Grecia pero es a finales del siglo XIX, cuando este estudio adquirió el carácter de ciencia experimental (Milner *et al.*, 1998 y Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

Memoria a corto y a largo plazo

En 1885, Hermann Ebbinghaus observó que al tratar de memorizar sílabas sin sentido sólo recordaba alrededor de siete y que la fase en la que su memoria era susceptible al olvido, era dentro de la primera hora después de haber estudiado (Milner *et al.*, 1998). En 1890, William James propuso que al recordar esas siete sílabas, se hacía uso de una memoria primaria (ahora llamada memoria de corto plazo) definida como el conocimiento que no es necesario evocar ya que no ha abandonado el curso principal de nuestro pensamiento. Asimismo, James propuso la existencia de una memoria secundaria (ahora conocida como memoria de largo plazo), caracterizada por ser usada cuando la información adquirida no ocupa nuestra atención y ya no tenemos conciencia de ella (Squire, 1987; Izquierdo *et al.*, 1999 y Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

La memoria a corto plazo se caracteriza por ser transitoria, con una duración de segundos, minutos u horas. La memoria a largo plazo dura días, años o incluso puede ser permanente. Fisiológicamente, estas dos memorias son diferentes ya que sólo la memoria a largo plazo es dependiente de síntesis de proteínas. (Squire, 1987 y Houpt y Berlin, 1999).

Clasificación de la memoria

En la década de 1940, Wilder Penfield, un neurocirujano del Instituto Neurológico de Montreal, observó que al estimular eléctricamente en la corteza cerebral, a pacientes epilépticos en lugares cercanos a aquellos en los que se producían los focos epilépticos, éstos generaban

ocasionalmente un recuerdo instantáneo (en el 8 % de los ensayos de estimulación), consistente en la descripción de alguna experiencia anterior. Esta respuesta se daba únicamente en los lóbulos temporales, es decir; en la amígdala, la corteza perirrinal, la corteza entorrinal y el hipocampo (Kandel *et.al.*, 1997).

A inicios de los años cincuenta del siglo pasado, se comprendió mejor el papel del los lóbulos temporales en la memoria debido a los estudios de Brenda Milner, colaboradora de Penfield. Un paciente epiléptico, conocido como H.M., no podía llevar una vida normal como consecuencia de sus crisis, por lo que se le removió la parte media de ésta parte del cerebro (Corkin *et. al.*, 1997). Las crisis se redujeron en gran medida, pero H.M. perdió la capacidad para formar nuevas memorias a largo plazo, aunque podía recordar momentos anteriores a la intervención quirúrgica. Sin embargo, la incapacidad para formar memorias a largo plazo no se generalizó, ya que había algunas tareas que podía recordar durante largos periodos de manera similar a sujetos normales. Se observó que H.M. podía adquirir nuevas habilidades motoras, como dibujar el contorno de una estrella al mirar al mismo tiempo su mano y la imagen en un espejo, mejorando su habilidad después de varios días de práctica, aunque no recordaba haber ejecutado la tarea (Milner, 1972). Con base en estos estudios, se hizo una distinción entre dos tipos de memoria: implícita (también llamada de procedimiento) y explícita (declarativa).

Memoria explícita

Se divide en episódica, que codifica información sobre eventos y experiencias personales, y en semántica, una memoria sobre hechos. Es esta memoria la que se afectó en el paciente H.M. (Kandel *et.al.*, 2000). Por

ejemplo, al recordar los sucesos agradables en un viaje que hice a Chiapas, mi memoria episódica es la que está evocando tal recuerdo. Sin embargo; al platicar con alguien sobre el contenido de *La Náusea*, un libro de Jean Paul Sartre, hago uso de mi memoria semántica.

Memoria implícita

Nos ayuda a recordar cómo hacer las cosas adquiriendo habilidades motoras o de percepción (Kandel *et.al.*, 2000). Hacemos uso de ella al andar en bicicleta, patinar, caminar o manejar un automóvil.

La memoria explícita depende de la integridad de los lóbulos temporales. La implícita existe en invertebrados que no poseen estas estructuras, y es muy antigua desde el punto de vista filogenético (Milner *et.al.* 1998). Las personas amnésicas poseen memoria implícita pero no explícita. El desarrollo tardío de la memoria explícita es una posible explicación a la amnesia infantil, es decir, la incapacidad para recordar sucesos dentro del primer o segundo año de la vida en humanos, por lo que se piensa que la memoria explícita se desarrolla después de la implícita (Squire, 1987).

El Condicionamiento de Aversión a los Sabores como modelo para estudiar el aprendizaje y la memoria (o cómo nos la ingeniamos para aprender en el laboratorio cómo es que aprendemos fuera de él)

Para entender los mecanismos por los que todo animal aprende, por lo regular recurrimos a modelos animales relativamente sencillos. La rata de laboratorio *Rattus norvegicus* es semejante al hombre en muchos sentidos. La rata y el hombre tienen requerimientos nutrimentales y sensibilidad al

gusto similares (Rozin, 1978). Debido a su omnivoría, los dos enfrentan básicamente los mismos problemas en la selección de alimentos. Ambas especies comen casi toda fuente nutrimental disponible, lo que les permite vivir en distintos hábitats. Las ratas, y muchos otros animales, aprenden qué comer y qué evitar; es decir, son capaces de asociar selectivamente (figura 1) sabores y eventos internos, como náuseas (García, 1989). Este aprendizaje les permite evaluar las consecuencias de la ingestión de diferentes sustancias.

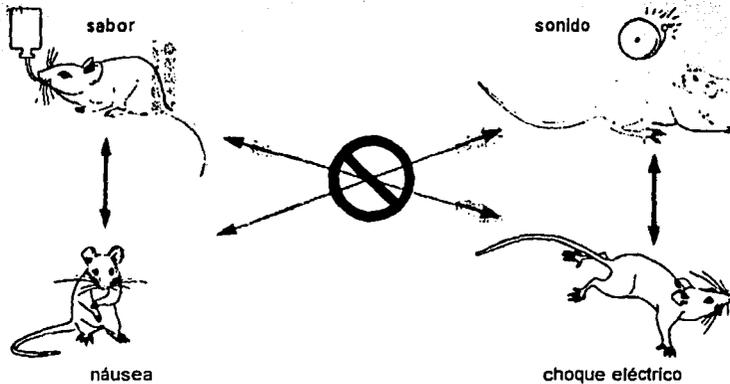


Figura 1. Selectividad asociativa. Aunque las ratas fácilmente aprenden que ciertos sabores pueden causar náuseas y que ciertos sonidos pueden ser seguidos de dolor causado por choques eléctricos, es muy difícil hacer asociaciones entre un sabor y choques eléctricos o entre un sonido y náuseas.

El hecho de distinguir un alimento familiar de uno nuevo, es de suma importancia. Las ratas responden de manera diferente a distintos alimentos, dependiendo de su experiencia previa con éstos (Domjan, 1976). Si el alimento es nuevo, la rata lo consume con recelo. Esta respuesta neofóbica (referente al miedo ante lo nuevo) representa un

mecanismo de defensa ante la ingestión de comida tóxica, la cual es probablemente una característica general de toda especie animal ante una variedad de estímulos. Sin embargo, debe ser más contundente con respecto a la alimentación porque el hecho de probar comida, involucra incorporarla al cuerpo, un acto peligroso e irreversible que puede causar la muerte en comparación con la exploración visual o auditiva de un ambiente (Rozin, 1978). Se puede afirmar entonces que la selección de alimentos es una actividad biológica fundamental.

Cuando un animal ingiere un alimento nuevo y éste no causa malestar, aprenderá que no le hace daño, es decir, etiquetará al sabor como seguro. Por el contrario, si el alimento le provoca malestar, cuando le sea presentado por segunda ocasión, evitará su consumo ya que ha sido codificado como peligroso (Nachman y Jones, 1974). En el laboratorio se reproduce este fenómeno con un modelo llamado Condicionamiento de Aversión a los Sabores (CAS). La adquisición de esta tarea consiste en dar un sabor nuevo (generalmente sacarina) a un grupo de ratas seguido de una inyección intraperitoneal de LiCl, un irritante gástrico que imita el malestar que un alimento tóxico provoca. La prueba consiste en una presentación subsiguiente del sabor y dado que las ratas lo han asociado con malestar, evitarán su consumo.

El estudio del CAS fue introducido alrededor de 1950 por John García (Bures *et al.*, 1998) y desde entonces se ha usado ampliamente como modelo de aprendizaje y memoria (Welzl *et al.*, 2001). García investigó los efectos de los rayos X en los animales y observó que al ser irradiados después de haber consumido cierto alimento, rechazaban el mismo en una presentación subsiguiente. A este fenómeno le llamó CAS (García y Robertson y García, 1985). Si los rayos eran dirigidos al abdomen había

aversión al sabor pero no si eran dirigidos al cerebro, por lo que se pensó que causaban irritación gástrica. Posteriormente, en lugar de irradiaciones utilizó LiCl dirigido al tubo digestivo por medio de una sonda (Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001) observando también aversión.

El CAS se caracteriza por poder ser adquirido con un solo apareamiento entre sacarina y LiCl, incluso con un intervalo grande de tiempo entre ambos estímulos (mayor a 10 horas pero menor a 24 ; Gutiérrez *et al.*, datos no publicados) lo que hace posible estudiar las distintas fases que lo constituyen (figura 2).

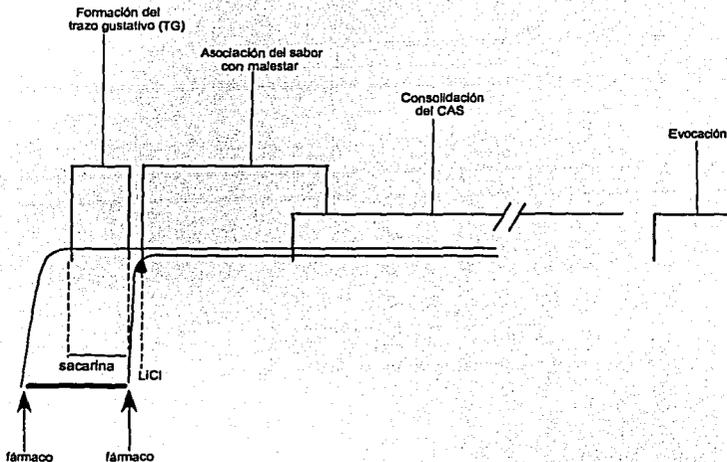


Figura 2. Fases del CAS en la memoria. Las flechas indican tiempos de inyección de fármacos y las líneas señaladas por las flechas, las fases del CAS que se estudian cuando el fármaco es inyectado antes de la presentación del sabor o después de su consumo.

La aversión a un sabor se puede aprender aún si un animal pierde la conciencia. Buresova y Bures (1997) observaron que al inyectar LiCl a ratas que se encuentran bajo los efectos de nembutal (un anestésico), rechazan el sabor en la siguiente presentación.

La adquisición del CAS no requiere contigüidad temporal entre el sabor y el malestar. De hecho, si se sobrelapan, la aversión no es tan fuerte en comparación con un retardo entre la sacarina y el LiCl (Bures *et al.*, 1998). Se piensa que es así ya que un alimento tóxico requiere ser digerido para tener efecto, por lo que es necesaria la existencia de una representación neural del sabor. Esta representación es conocida como trazo gustativo o memoria gustativa a corto plazo (Bures *et al.*, 1998). Una vez que se ha probado el sabor, el animal lo codifica como seguro o aversivo, dependiendo de las consecuencias gástricas que tenga el haberlo consumido, es decir, ocurre una asociación del sabor con malestar o con seguridad (Nachman y Jones, 1974 y García, 1982). Posteriormente se lleva a cabo un fenómeno llamado consolidación, definido como un cambio en la memoria que ocurre con el paso del tiempo después del aprendizaje, en el que hay menor susceptibilidad al olvido (Squire, 1987). La consolidación es evidente a lo largo de toda la escala filogenética; se observa en el hombre así como en invertebrados como el caracol (Dudai, 1996).

Se han hecho diversos estudios sobre la neuroanatomía y neurofisiología del CAS (ver Yamamoto *et al.*, 1994; Bures *et al.*, 1998 y Welzl *et al.*, 2001) principalmente sobre la participación de la corteza insular y la amígdala, y sus sistemas de neurotransmisión (ver Gallo *et al.*, 1992; Rosenblum *et al.*, 1996; Cubero *et al.*, 1999; Berman *et al.*, 2000; Yasoshima *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2002 y Ferreira *et al.*, 2002). Conforme se ha ido estudiando este fenómeno, la literatura que concierne a este tema reporta cada vez

mayor número de estructuras cerebrales que participan en esta tarea (ver figura 3) y por ende, se ha ido conociendo más sobre los mecanismos generales referentes al aprendizaje.

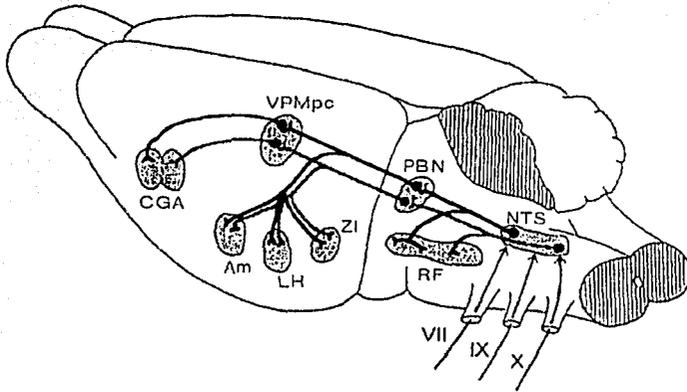


Figura 3. Relevos de la información gustativa y visceral en el sistema nervioso. Las líneas oscuras representan la información gustativa y las claras, la visceral. VIII = nervio facial, IX = nervio glossofaríngeo, X = nervio vago, NTS = núcleo del tracto solitario, PBN = núcleo parabraquial, RF = formación reticular, VPMpc = tálamo ventroposterior medial, Am = amígdala, CGA = corteza gustativa, H = hipotálamo lateral, ZI = zona incerta. Tomado de Yamamoto *et al.*, 1998.

La corteza perirrinal y el gusto

La corteza perirrinal juega un papel esencial en la memoria de reconocimiento visual (Xiang y Brown, 1998; Steckler *et al.*, 1998 y Brown y Xiang, 1998). Su función parece ser crucial para establecer representaciones de objetos, para conocer que un objeto es el mismo en distintos contextos o perspectivas (Murray y Richmond, 2001). Esta

estructura está interconectada con múltiples áreas corticales sensoriales de asociación (Murray y Richmond, 2001). Estas conexiones recíprocas, presumiblemente proveen el sustrato neural para unir las representaciones almacenadas en las distintas áreas corticales sensoriales.

La corteza perirrinal recibe proyecciones del área visual primaria 17, de las áreas visuales de asociación 18a y 18b, de una parte de la corteza de asociación auditiva, de la región periamigdalina olfativa y de la corteza piriforme -corteza olfativa- (Burwell *et al.*, 1995). La remoción de la corteza perirrinal causa déficits dramáticos en el reconocimiento visual y táctil de objetos (Murray y Richmond, 2001). La corteza perirrinal también recibe información gustativa: Saper (1982) reportó interconexiones entre esta estructura y la corteza insular (que contiene a la corteza gustativa). Sowards y Sowards (2001), basándose principalmente en evidencias anatómicas y haciendo analogías con el sistema visual; proponen que además de la corteza gustativa primaria, localizada en la corteza insular granular de la rata, existen tres áreas gustativas de asociación. La secundaria localizada en la corteza insular disgranular, la terciaria en la corteza insular agranular y la cuaternaria en la corteza perirrinal.

¿En dónde se localiza la corteza perirrinal?

La corteza perirrinal forma parte de los lóbulos temporales. En la rata se localiza en la parte caudal del surco rinal (figura 3), mientras que en el mono abarca la parte rostral y caudal. Las relaciones espaciales son similares en ambas especies y son estructuras homólogas (Burwell *et al.*, 1995). En la parte ventral de esta estructura se localiza la corteza entorrinal y en la dorsal, las áreas Te2 y Te3. (Burwell *et al.*, 1995 y Paxinos, 1995).

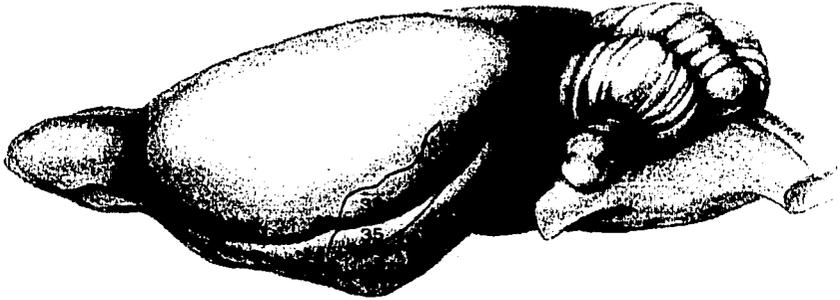


Figura 4. Corteza peririnal. La estructura se localiza en la zona señalada por los números 35 y 36. Modificado de Burwell *et al.*, 1995.

Sistemas colinérgico y glutamatérgico

Existen dos tipos de receptores para los neurotransmisores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos consisten en un canal iónico que seleccionan de manera directa la entrada de iones a la neurona: el receptor posee un dominio que reconoce al neurotransmisor, ocasionando que se abra una compuerta por la que los iones entran. Los receptores metabotrópicos están asociados a una proteína G: el receptor reconoce al neurotransmisor, cambia su estructura y activa a la proteína G, la cual desencadena una serie de cascadas intracelulares. Se conocen alrededor de 100 neurotransmisores (Kandel *et al.*, 2000) y por lo general, cada uno es reconocido tanto por receptores ionotrópicos como por metabotrópicos.

El neurotransmisor del sistema colinérgico es la acetilcolina. Sus receptores metabotrópicos se llaman muscarínicos y los ionotrópicos, nicotínicos. El glutamato es el neurotransmisor del sistema glutamatérgico. Los receptores ionotrópicos de glutamato son de dos tipos: del tipo NMDA y del tipo AMPA/Kainato, aunque también poseen receptor metabotrópico.

Es aceptado ampliamente que los sistemas colinérgico y glutamatérgico subyacen a diversos procesos de aprendizaje y memoria (Hasselmo y Bower, 1993 y Castellano *et al.*, 2001). La aplicación de antagonistas colinérgicos afectan la memoria mientras que la aplicación de agonistas bajo condiciones apropiadas, la facilitan (Overstreet, 1984). La pérdida de memoria en pacientes con Alzheimer se ha relacionado con el deterioro del sistema colinérgico en el cerebro anterior (Baxter y Chiba, 1999). La acetilcolina, a través de sus receptores muscarínicos participa en procesos de plasticidad sináptica, relacionada con procesos de aprendizaje y memoria (Van Der Zee y Luiten, 1999). La potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) es un fenómeno asociado a la memoria a largo plazo. La LTP consiste en el aumento persistente (desde horas hasta días) del tamaño en los potenciales de acción después de estimulación a alta frecuencia (Kandel *et al.*, 1997). Esta potenciación ha sido asociada a la activación de los receptores NMDA en el hipocampo y la neocorteza (Kandel *et al.*, 2002 y Escobar *et al.*, 2002). La administración de antagonistas del tipo NMDA en la corteza insular, afectan la LTP y el Condicionamiento de Aversión al Sabor (Escobar *et al.*, 2002).

Se ha descrito la participación de los sistemas colinérgico y glutamatérgico en aprendizajes gustativos. La acetilcolina participa en la formación del trazo gustativo en la corteza insular en el CAS, vía receptores muscarínicos (Rosenblum *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2002 y Gutiérrez *et al.*, 2000) y el

glutamato participa en esta estructura en la memoria a largo plazo de esta misma tarea, vía receptores NMDA (Ferreira *et al.*, 2002). Se ha reportado también que el glutamato participa en la asociación entre sacarina y malestar gástrico (Yamamoto *et al.*, 2000 y Miranda *et al.*, 2002)

Recientemente se ha observado que también la corteza perirrinal participa en el CAS (ver Tassoni *et al.*, 2000) ya que al aplicar TTX en esta estructura (bloqueador de los canales de sodio y por lo tanto, que evita todo potencial de acción), antes de que una rata consuma sacarina novedosa, la aversión al sabor disminuye considerablemente en el día de la prueba. Si se aplica TTX inmediatamente después del consumo del sabor, 6 ó 24 h. después de la administración de LiCl o antes de la prueba de memoria; no hay efecto, es decir, hay CAS (Tassoni *et al.*, 2000). Este trabajo sugiere que la corteza perirrinal participa en el CAS y particularmente, que codifica la formación del trazo gustativo ya que solo tiene efecto al ser inyectada antes de la presentación de sacarina (ver figura 2) Sin embargo, no existen reportes sobre los sistemas de neurotransmisión involucrados.

Planteamiento del problema

Hipótesis

Dado que la corteza perirrinal participa en el CAS y que los sistemas colinérgico y glutamatérgico actúan como sustratos en diversos procesos de aprendizaje y memoria, incluidos aquellos relacionados con el gusto, probablemente estas vías de neurotransmisión están involucradas en el CAS en esta zona cortical.

Objetivos

- Determinar la participación de los receptores metabotrópicos de acetilcolina en la corteza perirrinal, en el CAS.
- Determinar la participación de los receptores ionotrópicos para glutamato en la corteza perirrinal, en el CAS.

Dado lo anterior; se aplicaron antagonistas para los receptores muscarínicos de acetilcolina (escopolamina) y para receptores ionotrópicos del tipo AMPA/Kainato (NBQX) y del tipo NMDA (AP5) en la corteza perirrinal, 20 minutos antes del consumo de sacarina novedosa (experimento 1). Con base en los resultados obtenidos, se inyectó escopolamina inmediatamente después del consumo de sacarina novedosa (experimento 2). Asimismo, se midieron los efectos de la escopolamina en la memoria a corto y a largo plazo del CAS al ser inyectada antes de la primera presentación de sacarina (experimento 3). El tiempo de administración de los fármacos así como las dosis, se tomaron de trabajos que reportan efectos en la corteza insular en el CAS (Gutiérrez *et al.*, 1999; Berman *et al.*, 2000 y Ferreira *et al.*, 2002).

Métodos

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 270 a 300 g., obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Fueron mantenidas en cajas individuales en un ambiente de 22 ± 1 °C con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, con agua y comida *ad libitum*,

hasta el inicio de los procedimientos conductuales. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz.

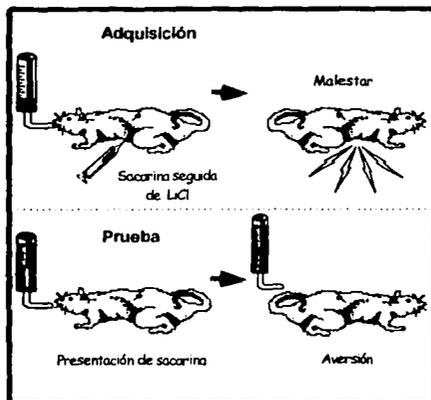
Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg de peso e implantadas en la corteza peririnal con cánulas bilaterales, vía cirugía estereotáxica basadas en las coordenadas establecidas por Paxinos y Watson (AP = -3 mm, Lat. = \pm 6.5 mm, DV = 5 mm con respecto a bregma). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con cemento dental mediante dos tornillos, 2 mm arriba del sitio de inyección. Se colocó un mandril en cada guía cánula para prevenir que se taparan.

Procedimiento conductual

Después de la recuperación de la cirugía, los animales fueron privados de agua por 24 horas para acostumar a los animales a beber agua en un tiempo específico. Se les presentó agua en bebederos graduados durante 15 minutos una vez al día (entre 11 am y 1 pm) hasta observarse un consumo de agua asintótico (línea base). Al día siguiente, se realizó la adquisición del CAS, presentando un sabor novedoso (sacarina al 0.1%) durante 15 minutos y 15 minutos después, se administró una solución de LiCl, vía intraperitoneal (0.4 M a una dosis de 7.37 ml/kg de peso). Los 2 días subsecuentes se dio agua también por 15 minutos y un 24 h. después, se hizo una prueba de memoria consistente en la presentación de sacarina. (figura 5).

Condicionamiento de Aversión a los Sabores



TESIS CON
 PALLA DE ORIGEN

Figura 5. Protocolo del CAS. Obsérvese la diferencia en el consumo de sacarina el día de la prueba, en comparación con el del día de la adquisición.

Para medir la memoria a corto y a largo plazo del CAS (MCP y MLP, respectivamente), las ratas se privaron de agua por 24 h, después de la recuperación de la cirugía. Los días siguientes se les dio agua 2 veces al día durante 15 minutos, hasta observarse un consumo de agua estándar (línea base). La primera presentación de agua de cada día fue de 10 ml (entre 11 am y 1 pm), y en la segunda presentación, las ratas podían consumir tanto como pudieran en un lapso de 15 min., 4 h. y media después de la primera presentación de agua (entre 3:30 pm y 5:30 pm). El día posterior a la línea base se les dio sacarina al 0.1 % por 15 minutos y 15 minutos después, se les inyectó LiCl (0.4 M, 7.37 ml/kg de peso); 4 h. y media después se les hizo la prueba de MCP presentándoles sacarina y observando su consumo. Los 2 días siguientes se les dio agua una vez al día durante 15 min. Al día siguiente se les hizo la prueba de MLP.

Fármacos

- Vehículo: solución Ringer (118 mM NaCl, 19 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂ y 3.3 mM glucosa; pH 7.4).
- El antagonista colinérgico de receptores muscarínicos: escopolamina (60 µg/µl)
- Los antagonistas de receptores ionotrópicos para glutamato. Del tipo NMDA: AP5 (5 µg/µl) y del tipo AMPA/kainato: NBQX (5 µg/µl).

Los antagonistas usados fueron disueltos en solución Ringer.

Microinyecciones

Se realizaron restringiendo de movimiento a las ratas con las manos. Los mandriles fueron removidos de las cánulas y se insertaron agujas dentales, 2 mm por debajo de la cánula, conectadas a microjeringas Hamilton de 10 µl vía una tubería de polietileno. A cada rata se le inyectó un volumen de 0.5 µl por hemisferio cerebral a una tasa de 0.5 µl/min. Las agujas se retiraron un minuto después de la inyección para permitir una mejor difusión del fármaco en la zona cerebral de interés. Las microinyecciones se llevaron a cabo 20 minutos antes de que las ratas fuesen expuestas a la sacarina (experimentos 1 y 3) e inmediatamente después de que tomaron sacarina (experimento 2).

Histología

Para verificar que las cánulas estuvieran colocadas en la zona cerebral de interés, después de los experimentos conductuales los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos con

NaCl (solución al 0.9 %) seguido de paraformaldehído (4 % en buffer fosfatos 0.1 M). Se removieron los cerebros y se colocaron en la misma solución de paraformaldehído durante 24 h., después de las cuales fueron cambiados a una solución de sacarosa (30% en buffer fosfatos 0.2 M), manteniéndose a 4°C. Posteriormente, con un microtomo se obtuvieron rebanadas coronales de cerebro de 40 μm de grosor. Las rebanadas se montaron en portaobjetos y se tiñeron con la técnica de Nissl para poder observar más claramente el sitio de inyección (figura 6).

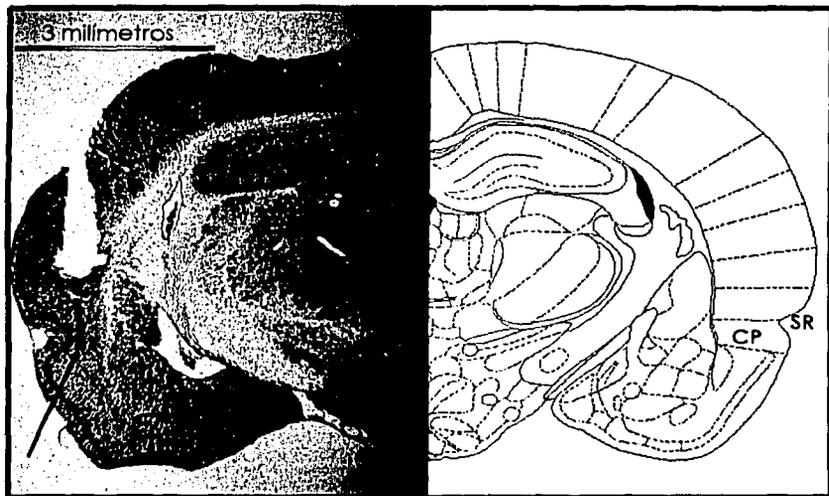
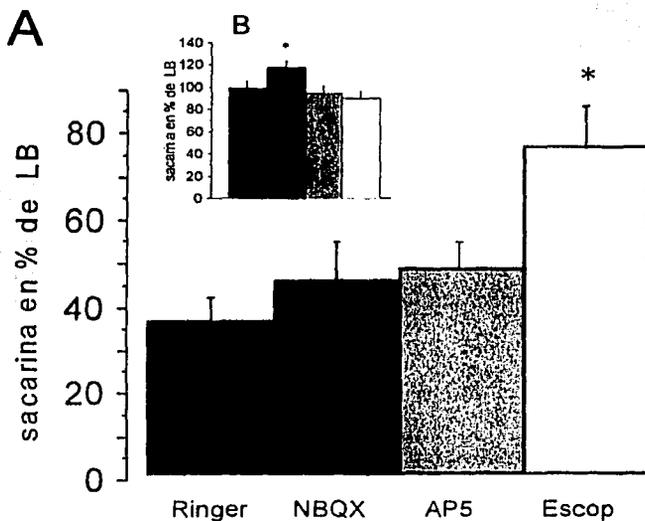


Figura 6. Corte coronal de cerebro. En la fotografía se muestra el sitio de inyección de los fármacos (flecha) y en el esquema, la corteza peririnal (CP) y el surco rinal (SR). Esquema tomado de Paxinos y Watson, 1986.

RESULTADOS

Experimento 1

Inyección de vehículo, escopolamina, AP5 y NBQX; 20 minutos antes del consumo de sacarina novedosa.

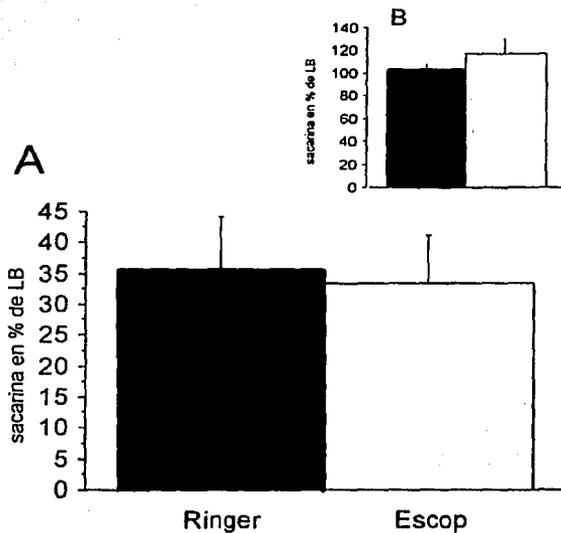


Gráfica 1. Porcentaje del consumo de sacarina con respecto a la línea base en la prueba del CAS (A) y en la adquisición (B). Ringer: n=10, NBQX: n=8, AP5: n=13 y Escop: n=9. El porcentaje es un índice de aversión ya que la línea base representa el consumo estándar de líquido.

Una prueba de Fisher, reveló que en el día de la adquisición no hubo diferencia significativa entre los diferentes grupos con respecto al consumo de sacarina, con excepción del grupo "NBQX" ($p < 0.05$). Sin embargo, el día de la prueba, el único grupo en el que se observó CAS, fue en el de "Escop antes". ($p < 0.05$).

Experimento 2

Inyección de escopolamina y vehiculo inmediatamente después del consumo de sacarina novedosa.

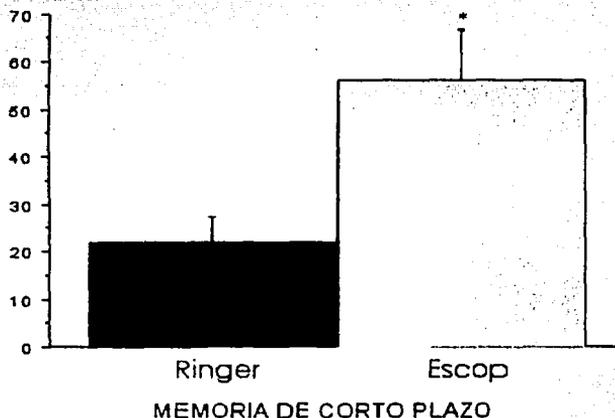


Gráfica 2. Porcentaje del consumo de sacarina con respecto a la línea base en la prueba (A) y en la adquisición del CAS (B). Ringer: n=7 y Escop: n=8.

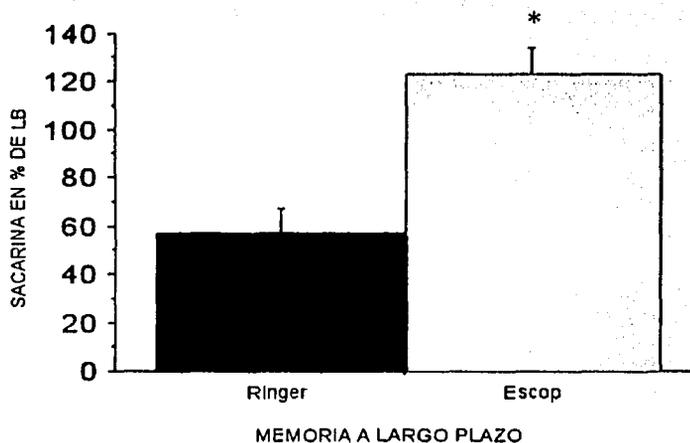
Una prueba de Fisher reveló que no hay diferencias significativas entre los grupos "Ringer" y "Escop" ($p > 0.05$) es decir, la escopolamina no tiene efecto en el CAS cuando es inyectada después de que la rata ha consumido el sabor.

Experimento 3

Se inyectó escopolamina 20 min. antes de la primera presentación de sacarina y se midió la memoria a corto y a largo plazo del CAS.



Gráfica 3. MEMORIA A CORTO PLAZO. Porcentaje del consumo de sacarina con respecto a la línea base. Ringer: $n=9$ y Escop: $n=10$.



Gráfica 4. MEMORIA A LARGO PLAZO. Porcentaje del consumo de sacarina con respecto a la línea base. Ringer: n=9 y Escop: n=10.

Una prueba de Fisher reveló diferencias significativas entre los dos grupos por lo que se puede concluir que tanto la memoria a corto plazo como la de largo, se ven afectadas por el efecto de la escopolamina ($P < 0.05$). Sin embargo, como se observa en la gráfica 3, el consumo de sacarina en el grupo "Escop" es de aproximadamente el 60 % con respecto a la línea base cuando éste es mayor en la memoria de largo plazo, por lo que se podría argumentar que el efecto de la escopolamina no es contundente. Para eliminar esta posibilidad, se realizaron observaciones en el consumo de líquido en tres grupos controles sin manipulación farmacológica de por medio (gráfica 5):

- **Grupo sac-LiCl-sac (n=23)**

Se le dio 10 ml de sacarina novedosa por 15 minutos y 15 minutos después, se aplicó una inyección intraperitoneal de LiCl. Cuatro horas después del litio, las ratas fueron expuestas a sacarina como prueba de memoria a corto plazo. Setenta y dos horas después de la adquisición, se le presentó sacarina como prueba de memoria a largo plazo. Este grupo es el control del CAS.

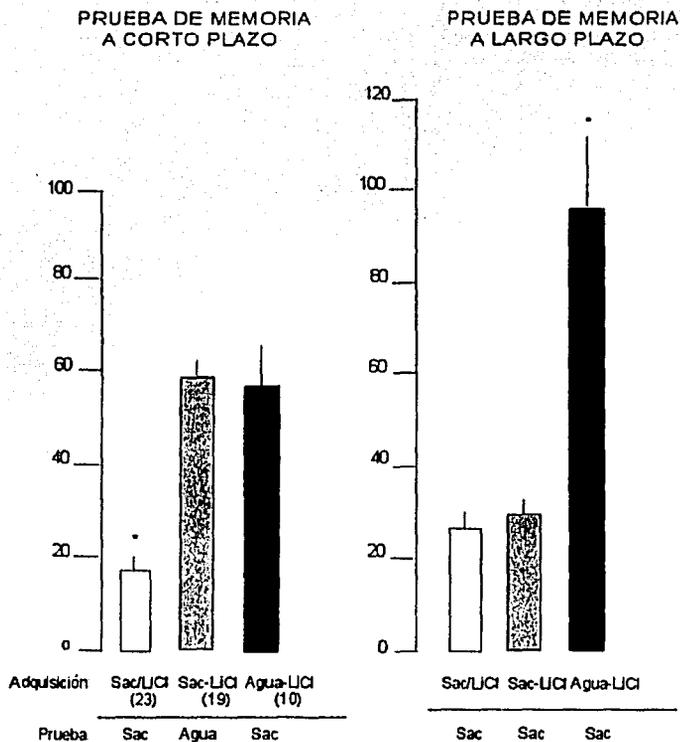
- **Grupo sac-LiCl-agua (n=19)**

Para observar el efecto del malestar causado por el LiCl en el consumo de líquidos, se presentó sacarina apareada con LiCl y en la prueba de memoria a corto plazo, agua. Este grupo nos da información sobre qué tanta cantidad de líquido permite consumir el malestar. En la prueba de MLP se dio sacarina.

- **Grupo agua-LiCl-sacarina (n=10)**

El LiCl *per se* podría causar neofobia por lo que a este grupo se le dio agua seguida de LiCl y cuatro horas después, sacarina. En la prueba de MLP se le dio agua.

En este experimento, las ratas consumieron como mínimo 8 ml. de agua los días de línea base y el mismo volumen de sacarina, el día de la adquisición.



Gráfica 5. Efecto del apareamiento en la adquisición, de sacarina-LiCl (sac-LiCl-sac y sac-LiCl-agua) ó agua_LiCl (agua-LiCl-sac) en la memoria a corto y largo plazo del CAS. Todos los grupos fueron expuestos a sacarina en la prueba de memoria a largo plazo.

Discusión

Se puede concluir que la corteza peririnal es una estructura que participa en la formación del trazo gustativo vía receptores muscarínicos, ya que al inyectar escopolamina, pero no NBQX o AP5, 20 minutos antes de la ingestión de sacarina, se observa que disminuye la aversión a este sabor (experimento 1), conducta que se ve reflejada en el consumo el día de la prueba. Estos datos indican que los receptores muscarínicos están involucrados en el aprendizaje del CAS pero no los receptores ionotrópicos para glutamato. Asimismo, al aplicar escopolamina inmediatamente después del consumo de sacarina (experimento 2), los animales aprendieron que el sabor es dañino. ¿Cómo interpretar estos resultados? Como ya se mencionó, muy probablemente la acetilcolina está involucrada en la codificación de la formación del trazo gustativo y no en la asociación sacarina/malestar vía receptores muscarínicos, dado que su bloqueo no afecta la expresión de la aversión una vez que el trazo ya se ha formado. Esto se observa en el día de la prueba, ya que cuando la escopolamina es inyectada antes de la presentación del sabor en el día de la adquisición, aparentemente las ratas no recuerdan haberlo probado.

En la figura 3 se muestra un esquema del procesamiento de la información gustativa en el sistema nervioso. Como se observa, la corteza peririnal aún no está considerada, por lo que este trabajo contribuye a la identificación de una estructura más en la codificación de esta información. Se sabe que esta estructura tiene conexiones recíprocas con la corteza insular y la amígdala, y puesto que recibe información de diversas áreas corticales sensoriales, muy probablemente participa en la representación de

estímulos de múltiples modalidades sensoriales (tacto, olfato, gusto, etc.) Tang *et al.* (1997) demostraron que esta estructura participa en el reconocimiento de estímulos visuales en monos, ya que esta se afecta al inyectar escopolamina antes de la presentación del estímulo novedoso. Cuando ese mismo objeto se le presenta al mono, no lo reconoce como familiar. El reconocimiento no se afecta cuando la inyección de escopolamina se hace después del estímulo (tal como ocurre en el CAS), sugiriendo que la escopolamina interfiere con el almacenamiento de la representación de un objeto. Los datos de esta tesis sugieren que la corteza peririnal codifica la representación de un estímulo gustativo vía receptores muscarínicos. En este sentido, el sistema visual y el gustativo comparten mecanismos relacionados con la codificación de la representación de un estímulo, al menos en la misma zona cortical. Presumiblemente sucede lo mismo con otros sistemas sensoriales.

Naor y Dudai (1996) demostraron que si se inyecta escopolamina en la corteza insular antes de la presentación de sacarina novedosa, no hay aversión al sabor. Por otra parte, Miranda *et al.* (2000) demostraron que cuando una rata consume un sabor novedoso, hay una liberación de acetilcolina en la corteza insular, 661 % mayor con respecto a los niveles basales. En presentaciones subsiguientes de este mismo sabor, la liberación de acetilcolina es igual a la basal. Este mismo fenómeno muy probablemente ocurre también en la corteza peririnal.

Xiang y Brown (1998) reportaron un decremento en la activación neuronal en la corteza peririnal de monos cuando un estímulo novedoso visual se repite. Massey *et al.* (2001) demostraron que la activación de los receptores muscarínicos induce depresión a largo plazo, es decir, un decremento en el disparo neuronal (LLD, por sus siglas en inglés) en

preparaciones *in vitro* de corteza perirrinal de rata, proceso independiente de receptores NMDA; proponiendo que este mecanismo se lleva a cabo en la memoria de reconocimiento visual. Presumiblemente, cuando un animal consume un alimento novedoso hay neuronas que disparan con mayor amplitud con respecto a si el sabor es familiar. Por otro lado, este decremento en el disparo podría estar mediado via receptores muscarínicos. Este argumento concuerda con los resultados obtenidos: se observó un efecto al aplicar un antagonista de los receptores metabotrópicos para acetilcolina (muscarínicos) pero no al aplicar un antagonista para receptores NMDA.

Ferreira *et al.* (2002) reportaron que los receptores del tipo NMDA de la corteza insular participan en la memoria a largo plazo del CAS, pero no en la de corto, por lo que se descartó su participación en la formación del trazo gustativo. Se podría argumentar que lo mismo ocurre con los receptores muscarínicos de la corteza perirrinal. Aún cuando se ha sugerido que el sistema colinérgico participa en la codificación de la representación de estímulos gustativos (Miranda *et al.*, 2000), se midió la MCP y MLP del CAS para suprimir esta posibilidad (experimento 3), observándose que ambas memorias se ven afectadas. En los grupos intactos, se observa que todos los grupos redujeron su consumo en la prueba de MCP con respecto a la línea base (gráfica 5), observándose el efecto del malestar causado por el LiCl. Sin embargo, este decremento no fue el mismo: el grupo control del CAS (sac-LiCl-sac) redujo su consumo hasta alrededor del 15 % mientras que, aquellos que no debieron de haber tenido aversión (sac-LiCl-agua y agua-LiCl-sac), lo redujeron a alrededor del 60 % observándose diferencias estadísticas significativas entre el control del CAS y los otros dos, pero no entre estos últimos. Es decir, aún cuando el malestar causado por el LiCl sólo permite que las ratas consuman 60 % de

la línea base, aquellas en las que se indujo CAS reducen su consumo aún más (15 %) por lo que bajo este protocolo, se puede medir la MCP y MLP en el mismo animal.

Dado que los receptores muscarínicos no tienen efecto en el CAS una vez que se ha formado el trazo gustativo (experimento 2), aparentemente no participan en la asociación entre el sabor y el malestar, y exclusivamente juegan un papel en la codificación de este trazo.

Asimismo, este trabajo apoya la idea de que no sólo una estructura es la encargada de llevar a cabo cierta función: tanto la corteza insular como la peririnal actúan sinérgicamente en la codificación de la formación del trazo gustativo. Con esto se puede decir que el cerebro es un sistema dinámico en el que diversas zonas cerebrales se comunican entre sí, llevándose a cabo interacciones para "cerciorarse" de que el sistema funcione, como asegurar el recuerdo de si se ha probado o no cierto alimento, aumentando por lo tanto, la probabilidad de sobrevivir.

Bibliografía

Baxter M.G. y Chiba A.A. (1999) Cognitive functions of the basal forebrain. *Current Opinion in Neurobiology*, **9**, 178-183.

Berman D.E., Hazvi S., Neduva V. y Dudai Y. (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK 1-2 and formation of a memory trace. *Journal of Neuroscience*, **20**, 7017-7023.

Bermúdez-Rattoni F. y Prado R. A. (2001) MEMORIA. Dónde reside y cómo se forma. Ed. Trillas. México, 170 pp.

Brown M.W. y Xiang J.-Z. (1998) Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. *Progress in Neurobiology*, **55**, 149-189.

Bures J., Bermúdez-Rattoni F. y Yamamoto T. (1998) Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind. Oxford University Press, Nueva York, 178 pp.

Buresova O. y Bures J. (1977) The effect of anesthesia on acquisition and extinction of conditioned taste aversion. *Behavioral Biology*, **20**, 41-50.

Burwell R.D., Witter M.P. y Amaral D.G. (1995) Perirhinal and Postrhinal Cortices of the Rat: A Review of the Neuroanatomical Literature and Comparison With Findings From the Monkey Brain. *Hippocampus*, **5**, 390-408.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Castellano C., Cestori V. y Ciames A. (2001) NMDA receptors and learning and memory proceses. *Current Drug Targets*, **2**, 273-283.

Corkin S., Amaral D.G., González R.G., Johnson K.A. y Hyman B.T. (1997) H.M.'s medial temporal lobe lesions: findings from magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience*, **17**, 3964-3979.

Cubero I., Thiele T.E. y Bernstein I.L. (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**, 17-25.

Dudai Y. (1996) Consolidation: Fragility on the Road to the Engram. *Neuron*, **17**, 367-370.

Escobar M.L., Alcocer I. y Bermúdez-Rattoni F. (2002) In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, **129**, 101-106.

Ferreira G., Gutiérrez R., De la Cruz V. y Bermúdez-Rattoni F. (2002) Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, **16**, 1139-1145.

García J. (1982) The Evolution of Eating Safety. *Bribulletin*, **6**, 3-5.

García J. (1989) Food for Tolman: Cognition and Cathexis in Concert, en: AVERSION, AVOIDANCE AND ANXIETY. Lawrence Erlbaum Associates, 45-85.

García y Robertson y García J. (1985) X-Rays and Learned Taste Aversions: Historical and Psychological Ramifications, en: CANCER, NUTRITION AND EATING BEHAVIOR: A BEHAVIORAL PERSPECTIVE. Lawrence Erlbaum Associates, 9-41.

Gallo M., Roldan G. y 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.

Gutiérrez H., Hernández-Echegaray E., Ramírez-Amaya V. y Bermúdez-Rattoni F. (1999) Blockade of N-Methyl-D-Aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, **89**, 751-758.

Gutiérrez R., Núñez-Jaramillo L., Rodríguez-Ortiz C.J., De la Cruz V., y Bermúdez-Rattoni F. (2002) Differential participation of muscarinic receptors in insular cortex on safe or aversive taste learning. *Society for Neuroscience 32 Annual Meeting*. Orlando, Florida.

Hasselmo M.E. y Bower J.M. (1993) Acetylcholine and memory. *Trends in Neuroscience*, **16**, 218-222.

Houpt T.A. y Berlin R. (1999) Rapid, Labile, and Protein Synthesis-Independent Short-Term memory in Conditioned Taste Aversion. *Learning & Memory*, **6**, 37-46.

Izquierdo I., Medina J.H., Vianna M.R.M., Izquierdo L.A. y Barros D.M. (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioral Brain Research*, **103**, 1-11.

Kandel E.R. y Hawkins R.D. (1992). The Biological Basis of Learning and Individuality. *Scientific American*, **267**, 79-86.

Kandel E.R., Jessell T.M. y Schwartz J.H. (1997). Neurociencia y conducta, Ed. Prentice Hall, España, 811 pp.

Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T.M (2000). Principles of neural science, 4a edición, Ed. Mc Graw Hill, 1414 pp.

Massey P.V., Bhabra G., Cho K., Brown M.W. y Bashir Z.I. (2001) Activation of muscarinic receptors induces protein synthesis-dependent long-lasting depression in the perirhinal cortex. *European Journal of Neuroscience*, **14**, 145-152.

Milner B. (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clinical Neurosurgery*, **19**, 421-446.

Milner B., Squire L.R. y Kandel E.R. (1998) Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, **20**, 445-468.

Miranda M.I., Ferreira G., Ramírez-Lugo L. y Bermúdez-Rattoni F. (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *PNAS*, **99**, 11417-11422.

Miranda M.I., Ramírez-Lugo L. y Bermúdez-Rattoni F. (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, **882**, 230-235.

Murray E. y Richmond B. (2001). Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Current Opinion in Neurobiology*, **11**, 188-193.

Nachman M. y Jones D.R. (1974) Learned taste aversions over long delays in rats: the role of learned safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **86**, 949-956.

Naor C. y 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.

Overstreet D.H. (1984) Behavioral plasticity and the cholinergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **8**, 133-151.

Paxinos G.(ed.) (1995) *The Rat Nervous System*. 2ª edición. Academic Press. Australia.

Paxinos G. y Watson G. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2ª edición, Academic Press. San Diego.

Revusky S.H. y Bedarf E.W. (1967) Association of illness with prior ingestion of novel foods. *Science*, **155**, 219-220.

Rosenblum K., Berman D., Hazvi S. y Dudai Y. (1996) Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *Neuroreport*, **7**, 1401-1404.

Rozin P. (1978) The Use of Characteristic Flavorings in Human Culinary Practice, en *Flavor: its chemical, behavioral, and commercial aspects*. Ed. C.M. Apt. Westview Press, 101-126.

Saper C.B. (1982) Convergence of Autonomic and Limbic Connections in the Insular Cortex of the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **210**, 163-173.

Sewards T.V. y Sewards M.A. (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, **25**, 395-407.

Smith C.U.M. (1996) Elements of Molecular Neurobiology. Ed. John Wiley & Sons, 522 pp.

Squire L.R. (1986) Mechanisms of Memory. *Science*, **232**, 1612-1619.

Squire L.R. (1987) Memory and Brain. Oxford University Press, Estados Unidos, 315 pp.

Steckler T., Drinkenburg W.H.I.M., Sagal A. y Aggleton J.P. (1998) Recognition Memory in Rats – I. Concepts and Classification. *Progress in Neurobiology*, **54**, 289-311.

Tang Y., Mishkin M. y Aigner T.G. (1997) Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *PNAS*, **94**, 12667-12669.

Tassoni G., Lorenzini C.A., Baldi E., Sacchetti B. y Bucherelli C. (2000) Role of the Perirhinal Cortex in Rats' Conditioned Taste Aversion Response Memorization. *Behavioral Neuroscience*, **5**, 875-881.

Van Der Zee E.A. y Luiten P.G.M. (1999) Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Progress in Neurobiology*, **58**, 409-471.

Welzl H., D'Adamo P. y Lipp H. (2001) Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioral Brain Research*, **125**, 205-213.

Xiang J.-Z. y Brown M.W. (1998) Differential neural encoding of novelty, familiarity and recency neurons in regions of the anterior temporal lobe. *Neuropharmacology*, **37**, 657-676.

Yamamoto T., Shimura T., Sako N., Yasoshima Y. y Sakai N. (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Research*, **65**, 123-137.

Yamamoto T., Nagai T., Shimura T. y Yasoshima Y. (1998) Roles of Chemical Mediators in the Taste System. *Japanese Journal of Pharmacology*, **76**, 325-348.

Yasoshima Y., Morimoto T. y Yamamoto T. (2000) 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**, 15-24.