

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

192

PAPEL DE LOS RECEPTORES TIPO NMDA EN
EL APRENDIZAJE OLFATIVO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CLARISSA PATRICIA SOLIS AVILA



DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
AVENIDA DE LA UNAM 11
MEXICO

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:

"Papel de los receptores tipo NMDA en el aprendizaje olfativo"

realizado por Solís Ávila Clarissa Patricia

con número de cuenta 9531520-3, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Gabriel Roldán Roldán

Propietario

Dra. Robyn Hudson

Propietario

Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña de Moles

Suplente

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Suplente

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Dr. Juan Manuel Rodríguez Chávez
Dirección General de Bibliotecas

a difundir en formato electrónico e impreso

de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Solís Ávila Clarissa

Patricia

03/julio/2003



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

A mis padres

Juan Solís Vargas

Soledad Ávila Villanueva

...Sego el hechizo de su aroma cambiaban, sin que ellos lo supieran, la expresión del rostro, la conducta y los sentimientos (...) Porque los hombres podían cerrar los ojos ante la grandeza, ante el horror, ante la belleza y cerrar los oídos a las melodías o a las palabras seductoras, pero no podían sustraerse al perfume. Porque el perfume era el hermano del aliento (...) Quien dominaba los olores dominaba el corazón de los hombres.

El perfume, Patrick Suskind

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial al Dr. Gabriel Roldán por la paciencia que tuvo a lo largo de este tiempo, por sus valiosas enseñanzas, confianza y amistad, pero sobretodo por enseñarme una nueva manera de ver el trabajo científico.

A mi comité tutorial: Dra. Robyn Hudson, Dra. Rosalinda Guevara, Dra. Ma. Luisa Banjul y Dr. Ignacio Camacho por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis, por la atención brindada, por sus comentarios y oportunas sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Neurobiología Conductual por su franca e indispensable ayuda.

A todos mis amigos, en particular a Gaby G., Marysol T., Itzel D., Lizbeth R., José Luis (Gordito), Israel R., Ricardo H. y Rocío O. con quienes compartí tantas experiencias y que constantemente y con cada detalle me recuerdan que la magia existe.

A todas aquellas personas que me brindaron su tiempo y su amistad para enriquecerme y que me han enseñado a descubrir nuevos horizontes.

Mi más profundo agradecimiento a mis hermanos Kari, Carlos y Vero porque los momentos y las alegrías que compartimos son los más bonitos que conozco. Gracias por su cariño y apoyo incondicional.

A mi tía Mariana, una de las personas más importantes en mi vida, por su constante presencia e infinitas atenciones. A mis sobrinos Alex y Erick por la alegría y armonía que han traído a la familia.

Y, finalmente, a mis padres, quienes me han servido de inspiración, por su ejemplo de lucha y superación, por su infinito amor y comprensión y por estar a mi lado en todo momento.

... ah, y un 'gracias' a las incontables ratitas que colaboraron en mis experimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

BO	Bulbo Olfatorio
CAO	Condicionamiento Aversivo al Olor
CAS	Condicionamiento Aversivo al Sabor
CROs	Células receptoras olfativas
EC	Estímulo Condicionado
EI	Estímulo Incondicionado
LA	Lóbulo antenal
LTP	Potenciación a Largo Plazo; Long-term Potentiation
MGCP	Memoria Gustativa de Corto Plazo
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
NMDA	N-metil-D-aspartato
OBPs	Proteínas de unión a Odorantes; Odorant-Binding Proteins
PBPs	Proteínas de unión a Feromonas; Pheromone Binding Proteins
POS	Potenciación de la aversión al Olor por el Sabor
SNC	Sistema Nervioso Central

ÍNDICE

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Aprendizaje y Memoria	5
2.2 Sistema Olfativo: Organización común de los Sistemas Olfativos	8
III. ANTECEDENTES	14
3.1 Aprendizaje Olfativo	14
3.1.1 Condicionamiento Aversivo al Olor	14
3.1.2 Condicionamiento Aversivo al Sabor	15
3.1.3 Potenciación de la aversión al Olor por el Sabor	16
3.2 Receptores tipo NMDA	18
3.2.1 Características	18
3.2.2 Farmacología	21
3.2.3 Importancia de los receptores NMDA en el aprendizaje Olfativo	24
IV. JUSTIFICACIÓN	28
V. OBJETIVOS	29
VI. HIPÓTESIS	30
VII. METODOLOGÍA	31
7.1 Aparatos	31
7.2 Animales	31
7.3 Procedimiento Experimental: CAO	31
7.4 Procedimiento Experimental: POS	36

7.5	Análisis de Datos	38
VIII.	RESULTADOS	39
8.1	Condicionamiento aversivo al olor (CAO)	39
8.2	Potenciación del olor por el sabor (POS)	44
IX.	DISCUSIÓN	46
X.	CONCLUSIONES	52
XI.	REFERENCIAS	53

I. RESUMEN

Los receptores glutamatérgicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) están críticamente involucrados en procesos de plasticidad neuronal tales como la Potenciación a Largo Plazo (LTP), el aprendizaje y la consolidación de la memoria. En el presente estudio se evaluó el papel de los receptores a NMDA en el Condicionamiento Aversivo al Olor (CAO), modelo de aprendizaje en el cual los animales desarrollan aversión a un estímulo olfativo cuando éste es seguido de malestar gástrico provocado por sustancias tóxicas como el LiCl (cloruro de litio). Se emplearon ratas macho cepa Wistar a las cuales se les administró por vía intraperitoneal MK-801 (un antagonista del receptor a NMDA) a distintas dosis y a diferentes intervalos de tiempo post-adquisición o antes de la prueba de evocación. Los resultados obtenidos muestran una reducción en la respuesta condicionada en los animales tratados con el fármaco, observándose también que este efecto amnésico es dependiente de la dosis y del tiempo; a partir de esto se infiere que los receptores a NMDA son necesarios para la adquisición y la fase temprana de la consolidación del CAO, pero no para su evocación. En otro experimento, se evaluó la participación de los receptores a NMDA en la Potenciación de la aversión al olor por el sabor (POS): una forma de aprendizaje que depende del procesamiento de la información en dos modalidades sensoriales. Durante la potenciación, los animales adquieren una fuerte aversión a un estímulo olfativo apareado con malestar gástrico retardado sólo si el olor se presenta asociado a un estímulo gustativo. Los grupos experimentales fueron tratados con MK-801 (ip) inmediatamente después de presentarles el estímulo compuesto (olor y sabor) y posteriormente se realizaron las pruebas de olor y sabor por separado. El resultado indica que a pesar del bloqueo farmacológico de los receptores a NMDA, los animales desarrollaron una fuerte aversión tanto al componente gustativo como al componente olfativo, sugiriendo que la POS no depende de la transmisión glutamatérgica mediada por receptores a NMDA. En conclusión, los receptores a NMDA participan en los procesos centrales necesarios para la adquisición de la aversión al olor, pero no de la aversión a un olor potenciado.

II. INTRODUCCIÓN

Pocas cuestiones han capturado tanto la atención e imaginación de los científicos como la pregunta fundamental de cómo, a lo largo de su vida, los animales son capaces de adquirir una vasta cantidad de información, retenerla en sus cerebros y recuperarla en una forma u otra para usarla en un momento posterior. La profundidad y complejidad de esta pregunta se ve reflejada en la gran diversidad de aproximaciones que los psicólogos y neurobiólogos han utilizado en el análisis de los procesos de aprendizaje y memoria. Dichas aproximaciones van desde el estudio de las corrientes de membrana y eventos moleculares en neuronas individuales hasta el desarrollo de modelos computacionales de redes neurales altamente complejas. Lo que es común a todas ellas es la fascinación que provoca la notable capacidad de los animales de aprender y recordar.

La investigación de las funciones cerebrales que subyacen al aprendizaje y la memoria se ha visto enormemente acelerada en años recientes gracias al desarrollo de nuevas técnicas neurobiológicas y conductuales, así como de nuevos planteamientos conceptuales y teóricos en el estudio de la relación entre cerebro y conducta.

Mucha de la investigación en aprendizaje animal es una búsqueda de principios generales que se apliquen a diferentes especies y situaciones. La idea de que existan estas leyes generales se basa en el principio Darwiniano de la continuidad evolutiva entre especies y en la evidencia sustancial de que especies tan diversas como abejas, caracoles, palomas, ratas, gatos, etc., aprenden básicamente en la misma forma. Pero, cómo es que los animales aprenden en la naturaleza y porqué (en términos de evolución y función actual) los animales aprenden de la manera en que lo hacen, son preguntas que aún no tienen respuesta.

2.1 Aprendizaje y Memoria

El repertorio conductual de la mayoría, sino es que de todos los organismos puede ser modificado por la experiencia individual. En humanos, y en muchas otras especies, los mecanismos más importantes por los cuales el ambiente altera el comportamiento son el aprendizaje y la memoria (Dudai, 1994).

El *aprendizaje* se puede definir como un cambio adaptativo en el comportamiento provocado por la experiencia. En esta definición el término adaptativo se refiere a que el cambio debe tener algún 'significado' para el comportamiento del animal y la supervivencia de la especie; con la palabra cambio nos referimos a que debe existir una diferencia cuantificable entre el comportamiento antes y después de algún evento concreto, no se refiere sólo a un cambio general en el animal como resultado del crecimiento, el desarrollo o la maduración; cuando decimos que el aprendizaje es un cambio en el comportamiento nos referimos a que debe involucrar sistemas centrales de todo el organismo y no solamente a una parte del sistema nervioso periférico o a un punto en la vía sensorial o motora (Dudai, 1994).

Íntimamente relacionada con el aprendizaje está la *memoria*, la cual se entiende como el almacenamiento y recuperación de información y experiencias previas. La memoria es necesaria para el aprendizaje, es el mecanismo por el cual la experiencia es incorporada al organismo de manera que puede ser usada posteriormente y traer cambios adaptativos en el comportamiento (Shepherd, 1994). Los humanos pensamos en las memorias como aquellas experiencias que pueden recuperarse de manera consciente; dichas recolecciones pueden no tener relación obvia con el aprendizaje, en ese sentido, la memoria incluye mucho más que los procesos específicos del aprendizaje.

La memoria no es un proceso global y unitario; existe evidencia sustancial de que la formación de nuevas memorias se da en un periodo de tiempo extenso y que involucra una secuencia de eventos intracelulares:

- **Adquisición.-** en la cual la información es procesada en los circuitos centrales que incluyen microcircuitos en regiones específicas del cerebro.
- **Almacenamiento y Consolidación.-** son los mecanismos por los cuales la información es retenida en esos circuitos.
- **Evocación.-** procesos que permiten el acceso y la recuperación de la información almacenada (Shepherd, 1994).

Usualmente se considera que los mecanismos que operan en escalas de tiempo de horas hasta años e incluso toda la vida caen en la categoría de *memoria de largo plazo*. Esta forma de memoria está involucrada en la construcción de la reserva de información que nos provee de nuestros conocimientos básicos, habilidades, formas de pensar y conductas, es decir, son los estímulos y eventos que adquieren significado permanente. Por su parte, a los mecanismos que operan en periodos muy breves de tiempo se les ha llamado *memoria de corto plazo* o *memoria de trabajo* (Shepherd, 1994).

La memoria de corto plazo es un proceso activo de duración limitada mientras que la memoria de largo plazo involucra un cambio estructural en el Sistema Nervioso. Si un cambio morfológico es la base de la memoria, entonces deberíamos preguntar cuáles neuronas en el cerebro son modificadas por la experiencia. Es poco probable que cada neurona cambie con cada experiencia, o a la inversa, que sólo una neurona se modifique como resultado de la experiencia. Es razonable pensar que experiencias visuales modifiquen neuronas en el sistema visual, que experiencias auditivas en el sistema auditivo, y que las demás experiencias alteren aquellas neuronas en sus respectivos sistemas sensoriales. Dado que muchas memorias dependen del procesamiento sensorial y este procesamiento sensorial se lleva a cabo en múltiples sistemas, se puede asumir que la memoria debe ser un sistema de múltiples componentes con diferentes tipos de información almacenados en distintas regiones del cerebro.

La idea más aceptada acerca de cómo se almacena la información en el Sistema nervioso se basa en el concepto de *ensamble celular* ("cell assembly") originalmente descrito por D. O. Hebb (1949). Según la hipótesis de Hebb cada percepción evoca un patrón único de actividad neural. Las neuronas activadas representan dicha percepción, y están conectadas unas con otras en un circuito cerrado (el "ensamble celular") que se reactiva a sí mismo repetidamente (actividad reverberante). Esta conectividad y actividad reverberante mantiene al ensamble celular activo, permitiendo retener la información que representa por un período de minutos a horas. Hebb sugirió que este periodo de activación recurrente activa repetidamente las sinapsis entre las neuronas que conforman el circuito celular, provocando cambios permanentes en las sinapsis. Estos cambios facilitan la activación posterior de las sinapsis, pues aumentan la probabilidad de que en ocasiones futuras la activación de una parte del circuito active al resto de él, permitiendo la recuperación de la información. No todas las formas de memoria involucran la representación de percepciones, pero en general se acepta que las modificaciones en las sinapsis resultantes de la simultánea (o casi simultánea) activación de las neuronas son la base de los cambios en el comportamiento debidos a la experiencia. La hipótesis de Hebb estaba basada en evidencia que sugería que la memoria es dependiente del tiempo (Martínez & Kesner, 1998). Para que ocurran los cambios sinápticos debe existir un periodo en el cual el circuito celular permanezca relativamente imperturbado; Hebb se refería a este periodo como *consolidación*, el cual requiere entre 15 minutos y varias horas. La consolidación es por lo tanto un proceso por el cual las memorias recién adquiridas (de corto plazo) que se encuentran en un estado lábil —representado por la fase de activación recurrente de Hebb— con el paso del tiempo se vuelven permanentes —representado por el cambio sináptico perdurable de Hebb—, convirtiéndose en memorias de largo plazo (Kolb & Whishaw, 1990).

2.2 Sistema Olfativo: Organización común de los Sistemas Olfativos

La olfacción es una modalidad sensorial muy antigua y se basa en principios de organización neural y funcional que parecen ser muy similares en toda la zoosfera, por esto, tanto en vertebrados como en invertebrados se pueden encontrar características comunes (Hildebrand, 1995).

La capacidad de los sistemas olfativos de distinguir un enorme número de olores depende de las respuestas de las Células Receptoras Olfativas (CROs), y por lo tanto, de las cascadas de eventos moleculares y celulares que van desde el reconocimiento molecular en el sitio del receptor hasta la generación de potenciales de acción en patrones espaciales y temporales que reflejan características del estímulo. Esta capacidad de discriminación también depende de los circuitos neurales en el SNC a través de los cuales se lleva a cabo la integración de la información olfativa.

Interacción entre las moléculas odorantes y las células receptoras

El proceso olfativo comienza en las CROs que residen en un epitelio especializado y que se encuentran entremezcladas con células de soporte. Estas CROs varían en una manera especie-específica en cuanto a su ultraestructura y morfología, sin embargo, presentan una característica común: son neuronas bipolares cuyas dendritas terminan en extensiones filamentosas o cilios que proveen la superficie necesaria para la interacción con el estímulo; figura 1 (Ache, 1991). Los procesos ciliares de las dendritas de las neuronas receptoras se encuentran relativamente expuestos, pues existe un fluido acuoso (moco en el caso de vertebrados y líquido sensilar en los insectos) que separa la membrana dendrítica de los químicos ambientales (Hildebrand, 1995; Hildebrand y Shepherd, 1997).

La mayoría de las especies animales pueden discriminar entre muchos olores. La discriminación olfativa comienza con las interacciones diferenciales de las moléculas odorantes con los diferentes tipos de receptores, de forma análoga a las interacciones entre antígenos y anticuerpos en el sistema inmune, o entre neurotransmisores y sus receptores en el sistema nervioso. De esta manera, los determinantes (o grupos funcionales) de cada molécula odorante establecen contacto con los subsitios (o residuos) del receptor (Hildebrand & Shepherd, 1997).

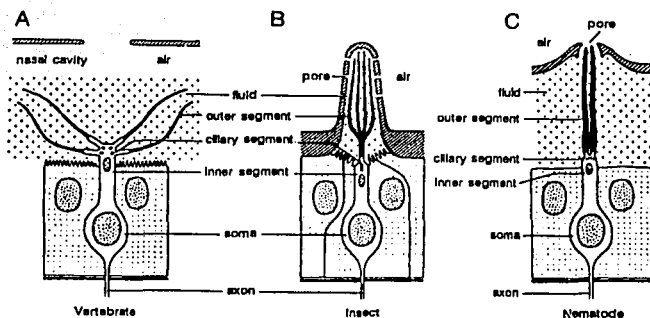


Fig. 1 Células quimiorreceptoras en especies animales de grupos filogenéticamente diversos. A: en el epitelio olfatorio de un vertebrado; B: en la sensila olfatoria de un insecto; C: célula quimiorreceptora en un nemátodo (tomado de Ache, 1991).

Las moléculas odorantes deben atravesar una fase acuosa para alcanzar los sitios receptivos en las dendritas de las CROs. Estas moléculas tienen acceso a las CROs por mecanismos que son similares en vertebrados e invertebrados (Hildebrand & Shepherd, 1997). Estos mecanismos involucran el transporte por medio de proteínas, las cuales están inmersas en el ambiente acuoso y son capaces de unirse o degradar al estímulo. Entre las proteínas que se han identificado se encuentran proteínas hidrosolubles que se unen a moléculas odorantes y se les

conoce como *Proteínas de unión a odorantes* (OBPs; Odorant Binding Proteins) o *Proteínas de unión a feromonas* (PBPs, Pheromone Binding Proteins), así como varios tipos de enzimas degradativas. Las OBPs y PBPs se han encontrado en diversas especies y se sugiere que además de participar en el transporte podrían estar involucradas en el reconocimiento de los estímulos (Ache, 1991; Shirsat & Siddiqi, 1993; Hildebrand & Shepherd, 1997).

Transducción de la señal sensorial

Las CROs tienen la función de transducir las señales químicas en señales eléctricas. La transducción sensorial se inicia por la unión de las moléculas odorantes a ciertos receptores de membrana acoplados a proteínas G, activando así cascadas de señalización que involucran múltiples segundos mensajeros intracelulares.

Las CROs, en respuesta a señales olfativas, activan diferentes sistemas de transducción mediados por enzimas como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y la guanilato ciclasa; entre los segundos mensajeros implicados se han identificado al AMPc (AMP cíclico), inositol trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG), el óxido nítrico (ON) y el calcio (Shirsat & Siddiqi, 1993; Hildebrand & Shepherd, 1997; Kandel *et al.*, 2000; Purves *et al.*, 2001).

Como resultado de la actividad de los segundos mensajeros se abren canales iónicos y se genera un potencial receptor en la CRO. Esta señal se propaga en forma de potenciales de acción a lo largo del axón de la neurona hasta los centros de integración en el SNC (Hildebrand, 1995; Hildebrand & Shepherd, 1997); figura 2.

Organización glomerular

Una vez que los axones de las neuronas sensoriales llegan a los centros olfativos de primer orden en el SNC —por ejemplo, el bulbo olfatorio (BO) en vertebrados y el lóbulo antenal (LA) en insectos—, estos axones o fibras aferentes primarias se reorganizan formando estructuras llamadas *glomérulos* (Shirsat & Siddiqi, 1993; Hildebrand, 1995; Hildebrand & Shepherd, 1997).

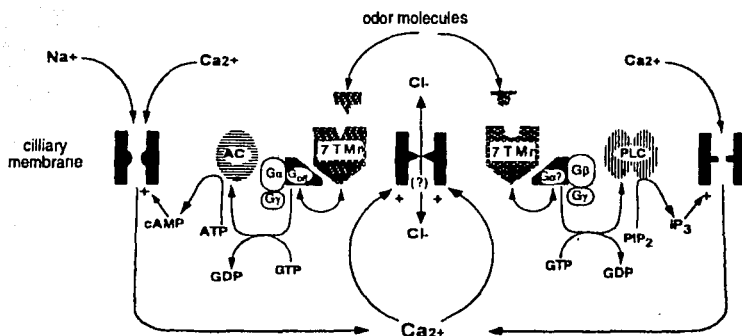


Fig. 2 Esquema de los posibles mecanismos de transducción mediados por las Células Receptoras Olfativas (CROs). Se sugiere que las moléculas odorantes se unen a un receptor específico (7TMR) de siete regiones transmembranales; dichos receptores están acoplados a proteínas G que activan ya sea a la adenilato ciclasa (AC) para generar AMP cíclico (AMPc) o a la fosfolipasa C (PLC) para generar inositol trifosfato (IP₃); estos segundos mensajeros abren canales que permiten la entrada de calcio (Ca^{2+}) o sodio (Na^{+}) a la célula; la entrada de iones origina potenciales de acción que se propagan por todo el axón hasta el bulbo olfatorio (tomado de Shipley & Ennis, 1996)

Los glomérulos son estructuras esféricas de neuropilo rodeadas por una capa distintiva de pequeñas neuronas y de células gliales. Los glomérulos son los sitios iniciales de la integración sináptica en el sistema olfativo (Shipley & Ennis, 1996).

Esta organización glomerular presente tanto en vertebrados como invertebrados es de gran relevancia; primero, porque es un tipo de organización que probablemente surgió muy temprano en la evolución de los sistemas olfativos (Hildebrand, 1995), y segundo, porque aproximaciones moleculares, anatómicas, fisiológicas y metabólicas apoyan el concepto del glomérulo como una unidad funcional universal en el procesamiento de la información olfativa (Hildebrand & Shepherd, 1997).

La organización celular del glomérulo involucra tres tipos de neuronas cuyas interacciones sinápticas varían poco entre los taxa (Strausfeld & Hildebrand, 1999). Cada glomérulo encierra neuronas que pueden ser: neuronas de proyección (o principales), las cuales extienden sus axones a diferentes regiones del cerebro; interneuronas o neuronas locales que están confinadas al BO ó LA y se unen unas con otras estableciendo conexiones entre los glomérulos; o células granulosas que generan conexiones entre las neuronas principales. Cada axón de la CRO se proyecta a un sólo glomérulo y varios axones de las CROs convergen en cada glomérulo donde establecen sinapsis con neuritas de tipos particulares de neuronas. Ejemplos de neuronas de proyección son las células mitrales y células en penacho del BO de vertebrados y las neuronas de proyección uniglomerulares y multiglomerulares del LA de los insectos. Estas neuronas llevan la información a los sitios de procesamiento olfativo de alto orden en el SNC (Hildebrand, 1995; Strausfeld & Hildebrand, 1999).

Proyecciones Centrales

En el caso de los vertebrados, parece ser que la información sensorial es ampliamente procesada y refinada en el BO antes de ser enviada a la corteza olfativa. Los axones de las células mitrales del BO se proyectan a través del tracto olfatorio lateral hacia la corteza olfativa. Entre las estructuras centrales involucradas en el procesamiento olfativo se encuentran cinco regiones principales: 1) el núcleo olfatorio anterior; 2) la corteza piriforme; 3) la amígdala; 4) el tubérculo olfatorio; y 5) parte de la corteza entorrinal (fig. 3). Con excepción del núcleo olfatorio anterior, la información es relevada hacia la corteza orbitofrontal vía el tálamo; sin embargo, la corteza olfativa también tiene contacto directo con la corteza frontal.

Además, la información olfativa es transmitida desde la amígdala hacia el hipotálamo y desde el área entorrinal hacia el hipocampo; figura 3. Se cree que la percepción y la discriminación de olores dependen de las rutas aferentes que pasan a través del tálamo hacia la corteza orbitofrontal. En contraste, las rutas olfatorias que van de la amígdala al hipotálamo parecen participar en los aspectos emotivos de la olfacción así como en muchos efectos neuroendócrinos y conductuales de los olores (Kandel *et al.*, 2000).

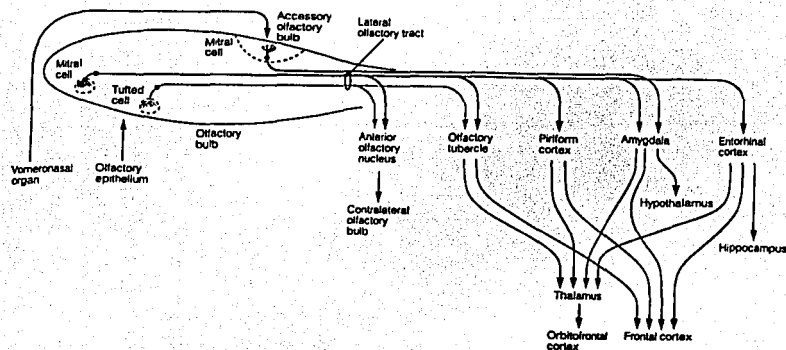


Fig. 3 Proyecciones neocorticales del bulbo olfatorio principal y accesorio de vertebrados (tomado de Kandel *et al.*, 2000)

En los invertebrados, las neuronas de proyección distribuyen la información acerca de los olores a varias estructuras del cerebro. Por ejemplo, en los insectos las neuronas de proyección extienden un axón hacia una zona llamada protocerebro lateral y al cuerpo fúngico. Éstos son centros de integración multimodal donde converge información de las áreas visual, táctil, auditiva, gustativa, y por supuesto olfativa. Parece ser que los cuerpos fúngicos también participan en los procesos de aprendizaje y memoria olfativos (Shirsat & Siddiqi, 1993; Strausfeld & Hildebrand, 1999).

III. ANTECEDENTES

3.1 Aprendizaje Olfativo

La habilidad de adquirir y transmitir información del ambiente externo al Sistema Nervioso Central (SNC) es un elemento esencial del comportamiento (Ache, 1991). En los metazoarios que poseen un sistema nervioso bien diferenciado, una importante función de este sistema es detectar, analizar, integrar, y generar respuestas a los químicos en el ambiente, los cuales pueden provenir de diversos elementos (Hildebrand, 1995). Éstas señales químicas son útiles para los seres vivos en varias formas: localización de alimento, mediación de las funciones de casta en los insectos sociales, localización de pareja sexual, identificación de estímulos nocivos, selección del sitio de oviposición, selección del hábitat, organización de la alimentación, apareamiento e interacciones sociales, así como para los procesos de aprendizaje y memoria asociados a dichos estímulos (Hildebrand y Shepherd, 1997). De hecho, en una gran variedad de especies, tanto el reconocimiento como la comunicación intra e interespecífica, dependen del sistema olfativo. Por esto, la olfacción puede tener profundos efectos en el estado conductual de los animales.

3.1.1 Condicionamiento Aversivo al Olor

El Condicionamiento Aversivo al Olor (CAO) es un modelo de aprendizaje ampliamente utilizado debido a su representatividad a través de la escala filogenética y a su alto valor adaptativo. Durante el CAO los animales adquieren aversión a un estímulo olfativo (estímulo condicionado: EC) cuando éste es seguido de daño o malestar, el cual puede ser provocado

por sustancias tóxicas —como el cloruro de litio— o por choque eléctrico. Una característica de este tipo de aprendizaje es que cuando se usa un agente que provoca malestar gástrico como estímulo incondicionado (EI), éste debe presentarse inmediatamente después del estímulo olfativo para que el animal pueda hacer una asociación correcta; cuando se extiende el intervalo de tiempo entre los dos estímulos, es decir, si se retrasa la presentación del EI, no se desarrolla una aversión o la aversión es muy débil (Palmerino *et al.*, 1980). Por el contrario, se ha demostrado que el olor resulta ser un estímulo adecuado en experimentos donde se emplea una descarga eléctrica como EI. En otras palabras, el olor es un estímulo débil en el condicionamiento toxicofóbico aunque muy efectivo en experimentos EC-choque (Rusiniak *et al.*, 1982).

3.1.2 Condicionamiento Aversivo al Sabor

De manera similar a como ocurre en el CAO, en el Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS), los animales desarrollan aversión a ciertos estímulos sápidos que previamente se han apareado con algún malestar. Una característica peculiar del CAS es que puede haber un retraso largo (1 a 12 horas) entre el estímulo gustativo y los síntomas aversivos internos generados por el EI (la sustancia tóxica ingerida). Generalmente, el CAS es aceptado como el prototipo de aprendizaje implementado por mecanismos que no requieren una cercanía temporal entre los estímulos condicionado e incondicionado (Bures *et al.*, 1998; Welzl *et al.*, 2001).

Se sugiere que la presentación del estímulo gustativo induce la formación de una *memoria gustativa de corto plazo* (MGCP) y que es esta "huella de memoria" y no la actividad en la vía del estímulo gustativo, la que se asocia con el estímulo incondicionado visceral. El sabor (y otros atributos sensoriales) de un alimento nuevo se almacena como MGCP hasta que las

consecuencias viscerales de la ingestión hacen posible evaluar la experiencia como benéfica o dañina (Bures *et al.*, 1998).

El circuito de integración del CAS provee un registro automático de las consecuencias viscerales de la ingestión, el cual continúa aún bajo condiciones que bloquean el registro consciente de la información que entra al cerebro a través de otros órganos sensoriales. Esta cualidad excepcional del aprendizaje aversivo al sabor se debe obviamente al significado vital de identificar en la experiencia consciente los eventos que pueden estar relacionados causalmente con náusea o malestar (Bures *et al.*, 1998). Por lo tanto, este tipo de aprendizaje le da a los animales la capacidad de identificar y clasificar a los alimentos, y por lo tanto de evitar aquellos que puedan ser potencialmente dañinos (Welzl *et al.*, 2001).

3.1.3 Potenciación de la aversión al Olor por el Sabor

Como se mencionó anteriormente, las señales olfativas son estímulos más débiles que las señales sápidas para establecer una asociación con efectos tóxicos retardados. Sin embargo, cuando los dos estímulos se combinan y tiempo después son seguidos por malestar provocado por cloruro de litio (LiCl), el sabor potencia al olor, y como resultado, el olor se vuelve un estímulo muy efectivo cuando se presenta solo. A este fenómeno se le conoce como Potenciación del olor por el sabor (POS). Además, el olor potenciado se vuelve aversivo por sí mismo, permaneciendo inaceptable aún después de que la aversión al sabor se haya extinguido. El olor y el sabor operando de forma conjunta son un estímulo mucho más poderoso que cuando se emplean solos (Rusiniak, *et al.*, 1982; Durlach & Rescorla, 1980; Rusiniak *et al.*, 1979)

La interacción peculiar entre olor y sabor puede deberse a los diferentes papeles que juegan estos sistemas sensoriales en el comportamiento de los animales. El sabor es considerado un

canal de información intermitente caracterizado por poca interferencia en periodos grandes de tiempo, y normalmente brinda información sobre la calidad, cantidad y tipo de alimento. En contraste, la olfacción es un canal saturado donde llega información muy diversa: los receptores olfativos constantemente extraen información relacionada con una gran variedad de emociones y conductas: reproducción, depredación, territorialidad, alimentación, etc. (Palmerino *et al.*, 1980).

Otro punto importante que hay que destacar es que los aferentes gustativos y viscerales convergen directamente — a través del vago y del área postrema— en el tallo cerebral, indicando una estrecha relación entre sabor, ingestión y émesis. (Palmerino *et al.*, 1980; Rusiniak *et al.*, 1982). El procesamiento del estímulo visceral aversivo es paralelo al procesamiento gustativo en varios niveles incluyendo el núcleo del tracto solitario, el núcleo posteromedial del tálamo, el núcleo parabraquial del puente, la amígdala y la corteza insular (Welzl *et al.*, 2001). Por el contrario, las aferentes olfativas no tienen acceso directo al sistema emético (Palmerino *et al.*, 1980).

Se cree que es necesaria la retroalimentación visceral para que ocurra la potenciación, ya que los efectos sinérgicos no se observan cuando la misma combinación de olor y sabor se aparea con choque inmediato. A partir de esto, se ha establecido una hipótesis de convergencia neural: en la potenciación, el olor puede llegar al sistema emético por un mecanismo controlado por el sabor, es decir, la presencia del estímulo gustativo modifica de alguna manera la señal olfativa de modo que el olor puede entrar al sistema de memoria emético donde se vuelve un estímulo igual de aversivo que el sabor (Palmerino *et al.*, 1980; Rusiniak *et al.*, 1982).

3.2 Receptores tipo NMDA

3.1.2 Características

Los receptores a NMDA son receptores glutamatérgicos ionotrópicos que se sabe están involucrados en un diverso rango de procesos de plasticidad neuronal. Su nombre deriva del agonista sintético que los activa selectivamente: N-metil-D-aspartato. La forma ácida del N-metil-D-aspartato (NMDA) fue sintetizada a inicios de 1960 y se descubrió como un potente excitador de neuronas espinales; dicha excitación se asoció a un tipo particular de receptores sensibles a glutamato, conocidos ahora como receptores a NMDA. Fue a partir de 1977 cuando se empezaron a reconocer y a caracterizar las funciones del receptor a NMDA (figura 4). Con el uso de antagonistas se pudo evidenciar el papel de estos receptores en la transmisión sináptica en el sistema nervioso así como en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos (Watkins, 1994).

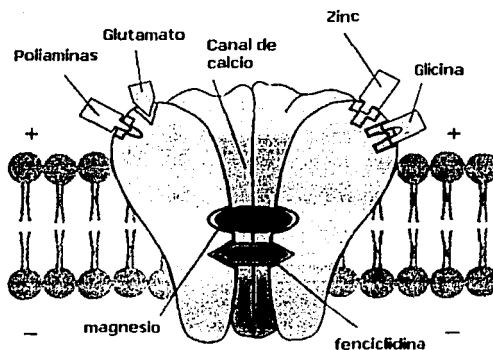


Fig. 4 Esquema del receptor a NMDA con sus diferentes sitios de unión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los receptores a NMDA poseen propiedades funcionales únicas que los hacen especialmente interesantes. Este tipo de receptores forma canales iónicos regulados por ligando constituidos por múltiples subunidades. Existen como mínimo cinco tipos de subunidades de los receptores a NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D); las diferentes sinapsis tienen distintas combinaciones de estas subunidades y producen diferentes subtipos de receptores a NMDA (Purves *et al.*, 2001).

A diferencia de otros receptores ionotrópicos sensibles a glutamato —por ejemplo, los receptores AMPA y Kainato—, los receptores a NMDA se activan y se desactivan más lentamente, es decir, su cinética de activación es relativamente baja. El análisis de la cinética del receptor indica que se requiere la unión de cuatro moléculas de agonista (dos de glutamato y dos de glicina) para su activación (Dingledine, *et al.*, 1999).

El receptor a NMDA tiene un canal catiónico con tres propiedades particulares: a) es un canal permeable a Ca^{2+} , así como a Na^+ y K^+ ; b) la apertura del canal requiere de un cofactor extracelular, es decir que el canal sólo funciona en presencia de su coagonista; c) la apertura del canal depende tanto de cambios de voltaje de membrana como de transmisores químicos (Bliss & Collingridge, 1993; Kandel *et al.*, 2000).

Esta dependencia dual del receptor (unión del agonista y potencial de membrana) es una característica única que distingue al receptor a NMDA de otros canales iónicos activados por ligando. La dependencia de voltaje del receptor es resultado directo del bloqueo del canal por concentraciones submilimolares de Mg^{2+} extracelular. La unión de Mg^{2+} extracelular dentro del poro es dependiente de voltaje, y esta característica determina las propiedades fisiológicas de los receptores a NMDA. En potencial de membrana en reposo, la mayoría de los subtipos del receptor a NMDA son bloqueados rápidamente por Mg^{2+} extracelular, ya que el magnesio actúa como tapón reduciendo considerablemente el flujo de corriente. Sin embargo, cuando la neurona es despolarizada (por ejemplo por la intensa activación de receptores tipo AMPA postsinápticos), el bloqueo por magnesio se interrumpe y el ión sale del canal por repulsión

electrostática permitiendo el flujo de calcio y sodio a través de los receptores a NMDA activados. El flujo de calcio puede activar una variedad de cascadas de señalización intracelular a través de la activación de cinasas y fosfatasa (Dingledine, *et al.*, 1999; Kandel *et al.*, 2000).

Algunas evidencias indican que el receptor a NMDA interactúa con una gran diversidad de proteínas intracelulares; al parecer, estas proteínas son importantes tanto para el agrupamiento como para la modulación de la actividad misma del receptor y para la activación de cascadas de señalización (Dingledine, *et al.*, 1999).

La mayor parte de la información que se tiene acerca de los mecanismos de transducción de señales mediados por los receptores a NMDA proviene de experimentos de Potenciación a Largo Plazo en el hipocampo. Se sabe que la estimulación de estos receptores induce la entrada de calcio a la célula; esta señal es amplificada por la liberación de más moléculas de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Como resultado se activan receptores glutamatérgicos de tipo metabotrópico (mGluRs) así como enzimas dependientes de calcio, fosfatasa —como la calcineurina—, fosfolipasas y cinasas dependientes de segundos mensajeros en la célula postsináptica. Algunas de las enzimas implicadas son la calmodulina, la proteína cinasa dependiente de calcio (PKC), la CAMKII (proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina), la cinasa dependiente de AMPc (PKA), entre otras (Bliss & Collingridge, 1993). El calcio también activa la óxido nítrico sintasa (ONS) la cual genera óxido nítrico (ON) a partir de L-arginina; este ON actúa como mensajero retrógrado activando a la guanilato ciclasa en la célula presináptica induciendo así la síntesis de glutamato (Purves *et al.*, 2001). Se ha propuesto que estas enzimas participan en la conversión de la señal inicial (la entrada de calcio a través del canal del receptor a NMDA) en modificaciones persistentes de la eficiencia sináptica; se cree que estas modificaciones en la sinapsis son fundamentales en los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss & Collingridge, 1993; Kandel *et al.*, 2000).

Los receptores a NMDA no sólo se unen directamente a moléculas de señalización, sino que se combinan indirectamente con otras moléculas (canales de potasio, bombas de calcio, etc.) mediante la interacción de proteínas de unión a actina y proteínas que contienen el dominio PDZ. Proteínas como la α -actinina, capsinas, neurofilamentos y la tubulina forman redes complejas con el receptor a NMDA y parecen tener un papel importante en el agrupamiento, localización y función de dichos receptores (Dingledine, *et al.*, 1999).

3.2.2 Farmacología

- Agonistas

Los receptores NMDA son activados por el transmisor endógeno L-glutamato y por L-aspartato; además requieren de glicina como coagonista (figura 5). El sitio de unión a glicina parece estar localizado en la subunidad NR1, mientras que la unión a glutamato se realiza en la subunidad NR2 (Dingledine, *et al.*, 1999).

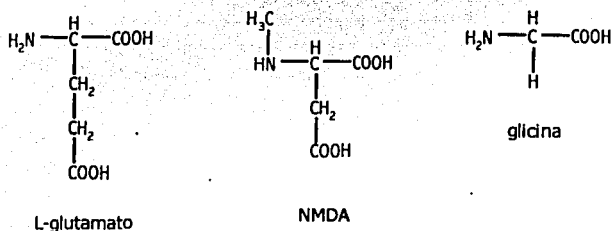


Fig. 5 Estructura de los principales agonistas de los receptores tipo NMDA

- **Antagonistas competitivos**

Los principales antagonistas competitivos del receptor a NMDA son derivados fosfatados de aminoácidos de cadena corta como el AP5 (ác. 2-amino-5-fosfonopentanoico) y el AP7 (ác. 2-amino-5-fosfonoheptanoico); por otra parte, las quinoxalinedionas halogenadas y derivados del ácido kinurénico fueron los primeros antagonistas competitivos identificados que actuaban en el sitio de unión a glicina (Dingledine, *et al.*, 1999).

- **Antagonistas no competitivos**

Son una clase de antagonistas que bloquean a los receptores NMDA en una manera independiente de voltaje sin que provoquen una reducción significativa de la potencia del agonista, ya que se unen al receptor en un sitio diferente al sitio de unión al agonista. Entre éstos se encuentran el ifenprodil y sus análogos, ciertos péptidos cargados, el etanol en altas concentraciones, y el tricloroetanol en concentraciones anestésicas (Dingledine, *et al.*, 1999).

- **Bloqueadores no competitivos**

Un bloqueador no competitivo actúa sólo en el receptor activado, no cuando el receptor está en reposo. Además de los iones de Mg^{2+} extracelular, existen otros compuestos que entran y bloquean el canal del receptor cuando éste está abierto. Una característica general de estos fármacos es que su sitio de unión (un sitio dentro del canal diferente del sitio de unión a Mg^{2+}) se vuelve disponible una vez que el canal se encuentra en su estado abierto. Entre este tipo de compuestos se encuentran la fenciclidina (PCP), el MK-801, la ketamina, el dextrometorfan, dextrorfan, memantina y amantadina, entre otros; figura 6 (Dingledine, *et al.*, 1999).

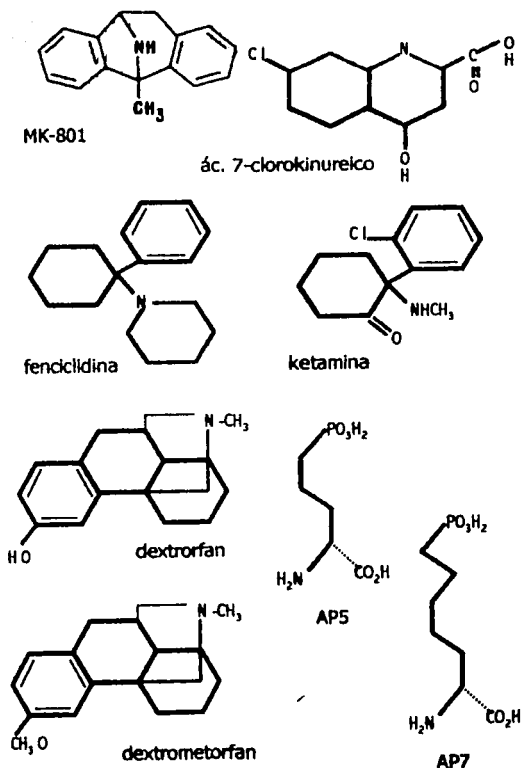


Fig.6 Estructura de algunos antagonistas competitivos, antagonistas no competitivos y bloqueadores no competitivos del receptor α NMDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.3 Importancia de los receptores a NMDA en el aprendizaje olfativo

Dentro de los modelos celulares que tratan de explicar los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria destaca el modelo de Potenciación a Largo Plazo (LTP; Long-term Potentiation) que se define como un incremento prolongado en la eficiencia sináptica debido a la estimulación repetitiva (estímulo tetanizante) de las aferentes de un área determinada del SNC (Kandel *et al.*, 2000). La LTP en el hipocampo es el modelo experimental más utilizado en la investigación de las bases celulares del aprendizaje y la memoria en vertebrados, y la LTP mejor entendida es aquella inducida por la activación de los receptores a NMDA.

Las primeras evidencias del papel de los receptores a NMDA en la LTP surgieron cuando Collingridge y col. demostraron en 1983 que el AP5, un antagonista específico de los receptores a NMDA, prevenía de manera reversible la inducción de LTP. Asimismo, se demostró que la aplicación de NMDA potenciaba esta respuesta sináptica. Estudios subsecuentes ampliaron estas observaciones; en particular, se ha mostrado que una serie de antagonistas del receptor a NMDA bloquean la inducción de LTP (Bashir *et al.*, 1994).

Dada la relación entre LTP y los procesos de aprendizaje y memoria, y a raíz del descubrimiento de Collingridge y col. que la activación de los receptores a NMDA es un paso crucial en la inducción de LTP, se iniciaron una serie de estudios sobre el papel de dichos receptores en ciertos tipos de aprendizaje. En el transcurso de las últimas décadas el conocimiento sobre el papel de los receptores a NMDA en diversas formas de aprendizaje ha ido avanzando y hoy es indudable el amplio rango de fenómenos en los cuales están implicados, incluyendo el aprendizaje espacial, el condicionamiento aversivo, el aprendizaje de prevención pasiva, el reconocimiento madre-cría ("filial imprinting"), el aprendizaje olfativo, entre otros (Morris & Davis, 1994).

Se han realizado varios estudios referentes al aprendizaje olfativo y su relación con los receptores a NMDA; por ejemplo, un estudio determinó que ciertas regiones del cerebro

relacionadas con la olfacción son especialmente ricas en receptores a NMDA; en particular, se han encontrado niveles altos de estos receptores en la corteza olfativa primaria, en el núcleo olfatorio anterior, en BO, en el núcleo de la cintilla olfatoria y en los tubérculos olfatorios. En núcleos específicos de la amígdala y en ciertas regiones del hipocampo también se localiza una alta concentración de este tipo de receptores (Monaghan & Cotman, 1985), lo que sugiere que los receptores a NMDA tienen una participación importante en el procesamiento olfativo.

Hallazgos recientes aportan evidencias sobre el hecho de que tanto la activación de las células granulosas como la auto-excitación de las células mitrales es dependiente de los receptores a NMDA; ambos tipos celulares se localizan en el BO y son importantes en el proceso de discriminación y aprendizaje olfativo (Sassoè-Pognetto & Ottersen, 2000).

Ciertas investigaciones han confirmado que se requiere la activación de estos receptores para un aprendizaje olfativo normal en ratas neonatas, pues cuando éstos se bloquean farmacológicamente antes o inmediatamente después del entrenamiento hay un deterioro en la preferencia a un estímulo olfativo condicionado (Lincoln *et al.*, 1988; Weldon *et al.*, 1997). Incluso en ratas adultas la infusión intracerebral de antagonistas del receptor a NMDA retarda significativamente el aprendizaje de discriminación olfativa (Staubli *et al.*, 1989). Asimismo, se ha reportado que en ratas adultas los receptores a NMDA están involucrados en la adquisición de tareas de discriminación de estímulos olfativos (Barkai & Saar, 2001).

En ratones, se ha probado que los receptores a NMDA participan en cierto modo en la *memoria de reconocimiento* por la cual una hembra genera una memoria de las feromonas del macho semental; como resultado los machos son reconocidos por las hembras, y por lo tanto, se mitiga el bloqueo del embarazo. El bloqueo del embarazo ocurre antes de la implantación si la hembra recién apareada es expuesta a la orina de machos extraños. Esta función es biológicamente importante para la hembra, pues es indispensable para mantener la preñez en presencia de olores de su macho semental (Brennan & Keverne, 1997; Brennan *et al.*, 1990).

Se ha demostrado también que el NMDA administrado sistémicamente mejora las tareas de reconocimiento social en ratas adultas. En este tipo de aprendizaje se prueba la habilidad de un animal adulto de reconocer a conespecíficos inmaduros (juveniles). En dicho experimento se demostró que el NMDA prolongaba la retención de la información de las características olfativas de un juvenil particular, es decir, mejoraba la capacidad del reconocimiento social en adultos (Hlíňák & Krejčí, 2002).

Incluso, se han empleado manipulaciones genéticas para determinar el papel de los receptores a NMDA en ciertos modelos de aprendizaje olfativo. Por ejemplo, se sabe que en ratones *knockout* CA1-KO (que carecen del receptor a NMDA en la región CA1 del hipocampo) se afecta significativamente la memoria de discriminación olfativa, con lo cual se demuestra que la actividad de estos receptores en la región CA1 es fundamental en la formación de memoria dependiente de hipocampo, como es el caso de la memoria olfativa (Rampon *et al.*, 2000).

Dada la estrecha relación entre los receptores a NMDA y varios modelos de aprendizaje olfativo, se iniciaron investigaciones sobre la participación de estos receptores en el modelo de POS. Este modelo de aprendizaje ha despertado gran interés por parte de los científicos y son varias las líneas de investigación que se enfocan en dilucidar los mecanismos neurales que subyacen a este fenómeno.

En un experimento realizado por Robinson y col. (1989) se demostró que la administración sistémica de MK-801 antes del entrenamiento debilita la adquisición de la POS pero no tiene efectos en el CAS, es decir, que los receptores a NMDA son fundamentales para la integración adecuada del primero, pero no del segundo (Willner *et al.*, 1992). Asimismo, la administración intraventricular de antagonistas de este receptor antes del entrenamiento bloquea el componente olfativo pero deja intacto el componente gustativo en la POS y tampoco afecta el aprendizaje aversivo a estímulos gustativos simples (Willner *et al.*, 1992).

Estudios previos habían demostrado que lesiones electrolíticas en el núcleo basolateral de la amígdala o la aplicación de anestésicos locales en toda la amígdala producían un déficit en la POS sin afectar la adquisición de la aversión al sabor (Bermúdez-Rattoni, *et al.*, 1986, 1983). Asimismo, se sabía que la POS depende de la integridad del núcleo basolateral de la amígdala, pues lesiones neurotóxicas en dicho núcleo bloqueaban el componente olfativo en la potenciación aunque permanecía inalterado el componente gustativo; también se comprobó que dichas lesiones no tenían ningún efecto en CAS (Hatfield *et al.*, 1992).

Otros estudios han confirmado este resultado pues cuando se administran antagonistas selectivos del receptor a NMDA directamente en el núcleo basolateral de la amígdala de la rata antes del entrenamiento se interfiere con la adquisición más no con la evocación de la POS y, al igual que en los casos anteriores, el efecto se observa en el estímulo olfativo mientras que el componente gustativo permanece inalterado (Hatfield & Gallagher, 1995; Ferry & Di Scala, 2000).

IV. JUSTIFICACIÓN

Si bien son varios los modelos de aprendizaje olfativo en los que se ha demostrado la participación de los receptores a NMDA, no existe ningún trabajo donde se haya investigado su papel en el Condicionamiento aversivo al olor.

Sabemos que la formación de nuevas memorias ocurre en un periodo extenso de tiempo y que involucra una secuencia de eventos intra e intercelulares. Aunque se ha determinado que los receptores a NMDA son fundamentales para la adquisición de la memoria, poco se sabe respecto a qué etapa del proceso íntegro de aprendizaje (adquisición, consolidación o evocación) están implicados dichos receptores, pues son muy pocos los estudios que se han enfocado en la dinámica temporal de los eventos celulares que derivan del aprendizaje olfativo (Staubli, *et al.*, 1989; Weldon, *et al.*, 1997). De ahí el interés de realizar un experimento que nos permita determinar el papel de los receptores a NMDA en las diferentes etapas de la formación de la memoria en el CAO, el cual es un modelo biológicamente importante por su amplia representatividad en la escala filogenética.

Por otra parte, aún cuando varios estudios han demostrado que los receptores a NMDA de la amígdala basolateral son relevantes en el fenómeno de POS, no se ha caracterizado el efecto del bloqueo global de estos receptores en el SNC durante este tipo de aprendizaje. Tal es la razón de realizar un experimento que permita evaluar la administración sistémica de un antagonista de este receptor y al mismo tiempo valorar el efecto del bloqueo farmacológico inmediatamente después de la presentación del estímulo condicionado, pues esta metodología ha sido poco utilizada.

V. OBJETIVOS

- * Determinar el papel de los receptores a NMDA en los procesos de adquisición, consolidación y evocación del Condicionamiento Aversivo al Olor mediante la administración sistémica de MK-801

- * Determinar el papel de los receptores a NMDA en la adquisición de la Potenciación del Olor por el Sabor mediante la administración sistémica de MK-801

VI. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes expuestos anteriormente se propone lo siguiente:

- a) Si los receptores a NMDA son esenciales en la adquisición del CAO, el bloqueo farmacológico de dichos receptores provocará un deterioro en el aprendizaje manifestándose como una incapacidad de los animales de discernir entre un estímulo olfativo inocuo y uno aversivo.
- b) Aunque se ha demostrado que los receptores a NMDA no participan en la etapa de evocación en otros modelos de aprendizaje, no se puede descartar que dichos receptores tengan un papel relevante en las etapas de consolidación y evocación del CAO.
- c) En la POS, el bloqueo sistémico de los receptores a NMDA después de la presentación del estímulo condicionado provocará un efecto deletéreo en el componente olfativo pero no en el componente gustativo de la potenciación. Es decir, los animales tratados con MK-801 desarrollarán aversión al sabor pero no serán capaces de discriminar entre un olor inocuo y un olor aversivo.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Aparatos

Durante las sesiones experimentales se emplearon cajas de acrílico de 46 x 31 x 19.5 cm a las cuales se les hizo una perforación de 2.5 cm de diámetro en dos de sus paredes laterales a una distancia de 8 cm de la base de la caja. Estas perforaciones sirvieron para colocar un tapón con un disco de papel filtro donde se depositaba esencia de vainilla o almendra. En estas cajas también se colocaron de manera vertical y sostenidas por una pequeña placa de acrílico, dos pipetas de 25 ml donde los animales bebían agua. El consumo se midió leyendo el nivel de líquido en la pipeta antes y después de cada sesión con una precisión de ± 0.2 ml.

7.2 Animales

Como sujetos experimentales se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 300 gramos las cuales se mantuvieron con un ciclo normal de luz-oscuridad (12:12) y con libre acceso a comida y agua, excepto por acceso restringido al agua durante los experimentos.

7.3 Procedimiento Experimental: CAO

El aprendizaje aversivo al olor es una forma de condicionamiento clásico donde la sustancia que induce malestar (en este caso LiCl) es el estímulo incondicionado (EI) mientras que el olor representa el estímulo condicionado (EC); usualmente se considera que evitar el EC es un

signo de que se ha establecido adecuadamente una reacción condicionada, y se dice que el sujeto ha desarrollado aversión al olor o un condicionamiento aversivo al olor (CAO).

Experimento 1a: CAO-adquisición

La finalidad de este experimento es determinar si los receptores a NMDA participan en la adquisición del CAO. Las ratas fueron sometidas a un régimen en el cual tenían acceso al agua sólo una vez al día durante 10 minutos. Diariamente los animales fueron pesados antes de cada sesión experimental para verificar su adaptación al esquema de restricción al agua. Las ratas se privaron de agua 24 hrs antes del inicio del estudio. En los primeros dos días del experimento los animales tuvieron acceso a agua simple; al tercer día se expusieron a esencia de vainilla (olor inocuo) mientras bebían. El cuarto día (adquisición) las ratas fueron expuestas a esencia de almendra (olor aversivo, EC) al momento de tomar agua e inmediatamente después de beber se les inyectó LiCl 0.15 M (en una cantidad igual al 2% de su peso) para inducir intoxicación. El quinto día se les permitió beber agua simple. El sexto día (evocación) se realizó la prueba en la cual las ratas tenían acceso a las dos pipetas de agua, una de ellas con esencia de vainilla y la otra con esencia de almendra; se midió el consumo de agua en cada pipeta y se comparó la preferencia entre la esencia de vainilla y la esencia de almendra. Los grupos experimentales fueron tratados con MK-801 por vía intraperitoneal (ip) en dosis de 0.02, 0.1 ó 0.5 mg/kg inmediatamente después de presentarles la esencia de almendra (ver diagrama). En este experimento se incluyó un grupo control al cual se le administró una cantidad equivalente (aproximadamente 0.25 ml) de solución salina en lugar del fármaco. Adicionalmente, se empleó un grupo control al cual se le administró MK-801 en dosis de 0.1 mg/kg pero no se le inyectó LiCl, esto con el fin de determinar si el fármaco podría estar funcionando por sí mismo como EI.

Experimento 1b: CAO-consolidación

Para evaluar la participación de los receptores a NMDA en la consolidación del CAO se llevó a cabo el siguiente experimento: un grupo de animales fue sometido a un esquema de restricción de agua como en el caso anterior. Un día antes del inicio del experimento las ratas fueron privadas de agua; en los días 1 y 2 se les dio a beber agua simple. El tercer día fueron expuestas a esencia de vainilla mientras bebían. El cuarto día las ratas fueron expuestas a esencia de almendra (EC) al momento de tomar agua y fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

- Grupo 0 min. Se le administró MK-801 0.1 mg/kg (ip) inmediatamente después de presentarles el EC y en seguida se les inyectó LiCl 0.15 M en una cantidad igual al 2% de su peso.
- Grupo 60 min. Recibieron LiCl en la misma dosis y 60 minutos después se les administró MK-801 0.1 mg/kg por vía intraperitoneal.
- Grupo 120 min. Igual que el grupo anterior excepto porque el fármaco se inyectó 120 minutos después del EC (ver diagrama).

El quinto día los animales bebieron agua durante 10 min. El sexto día se realizó la prueba de evocación en la que se comparó la preferencia entre la esencia de almendra y la esencia de vainilla.

Experimento 1c: CAO-evocación

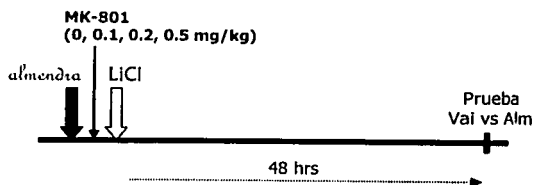
El objetivo de este experimento fue evaluar la participación de los receptores a NMDA en la fase de evocación del CAO. Las ratas se privaron de agua 24 hrs antes del inicio del estudio. En los primeros dos días del experimento, los animales bebieron agua simple durante 10 minutos; al tercer día se expusieron a esencia de vainilla (olor inocuo) mientras bebían. El cuarto día (adquisición) las ratas fueron expuestas a esencia de almendra (olor aversivo, EC) al momento de tomar agua e inmediatamente después de beber se les inyectó LiCl 0.15 M (en una cantidad igual al 2% de su peso). El quinto día se les permitió beber sólo agua. El sexto día (evocación) a los animales se les administró el fármaco (ip) en dosis de 0.1 ó 0.2 mg/kg 15

minutos antes de la prueba de evocación y posteriormente se calculó el porcentaje de consumo del estímulo aversivo (ver diagrama).

En los tres experimentos se calculó el consumo diario promedio de agua y en la prueba de retención se determinó el porcentaje de consumo del estímulo aversivo, que se calculó usando la fórmula: $(A / A + B) \cdot 100$ donde A= consumo de agua con esencia de almendra y B= consumo de agua con esencia de vainilla.

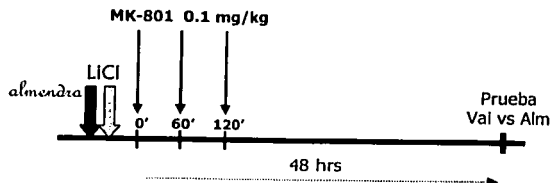
Diagrama de los diseños experimentales

CAO adquisición

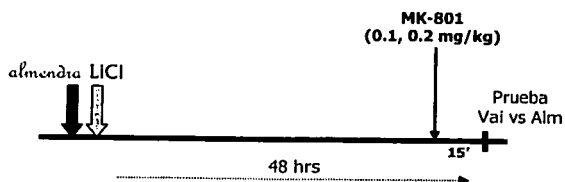


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAO consolidación



CAO evocación



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

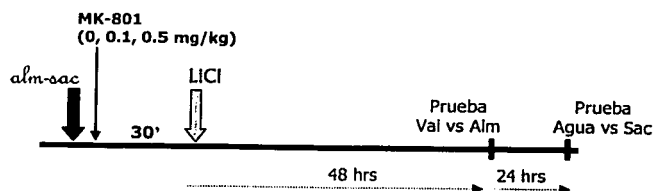
7.4 Procedimiento Experimental: POS

Antes del inicio del experimento las ratas fueron privadas de agua por un periodo de 24 hrs. Los dos primeros días sirvieron para habituar a los animales a beber agua durante 10 min en las cámaras experimentales; al tercer día se expusieron a un olor inocuo (esencia de vainilla) mientras bebían. El cuarto día se les dio a beber agua simple durante 10 min. La fase de adquisición (quinto día) consistió en la presentación de un estímulo compuesto (olor y sabor) durante 10 minutos; como estímulo olfativo se empleó esencia de almendra y como estímulo gustativo se utilizó solución de sacarina 0.1% (w/v). Los grupos experimentales fueron tratados con MK-801 (ip) en dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg inmediatamente después de presentarles el estímulo (esencia de almendra + sacarina); el grupo control fue tratado con una cantidad equivalente de solución salina en lugar del fármaco. Transcurridos 30 min a los animales se les administró por vía intraperitoneal LiCl 0.15 M (2% de su peso) para inducir malestar gástrico. El sexto día (recuperación) se les permitió beber sólo agua. Por último, las pruebas de olor y sabor se realizaron de manera independiente en los días 7 y 8, respectivamente (ver diagrama).

En la prueba de olor se comparó la preferencia entre el olor inocuo (vainilla) y el olor aversivo (almendra) de la misma forma en que se calculó para los experimentos de CAO; en la prueba de sabor se comparó el consumo de agua contra el consumo de solución de sacarina y se obtuvo un porcentaje de consumo del estímulo aversivo. La fórmula empleada fue la siguiente: $(A / (A + B)) \cdot 100$ donde A= consumo de sacarina y B= consumo de agua. Asimismo, se hizo un cálculo del consumo diario promedio de líquido para cada uno de los grupos.

Diagrama del diseño experimental de POS

POS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.5 Análisis de Datos

Todo el análisis de datos se realizó calculando el porcentaje de consumo del estímulo aversivo donde un valor cercano a 50 indica que no hay preferencia por ninguna de las soluciones, mientras que un resultado cercano a 10 representa una reducción en el consumo y por lo tanto mayor aversión a ese estímulo. Los resultados de las pruebas de olor y sabor se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA); considerando $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Para el análisis *post-hoc* se empleó la prueba de Newman-Keuls de comparaciones múltiples.

VIII. RESULTADOS

8.1 Condicionamiento aversivo al olor (CAO)

Las figuras 1, 2 y 3 muestran el consumo diario de agua para cada uno de los grupos en los tres experimentos (adquisición, consolidación y evocación). En el experimento de adquisición (figura 1) se observa que las ratas tienen un cierto patrón de consumo: el primer día beben poca cantidad de agua, al segundo día del experimento se incrementa el consumo de líquido y este nivel se mantiene más o menos estable durante el resto del experimento, a excepción del quinto día en el que hay cierta reducción en el consumo de agua (con respecto al día anterior). Esta reducción es estadísticamente significativa sólo para el grupo control y para el grupo de 0.02 mg/kg.

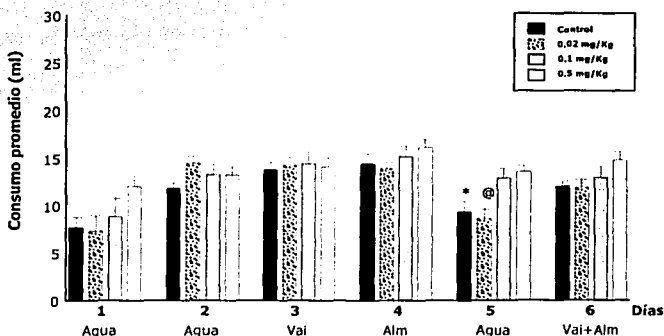


Fig. 1 Consumo promedio de agua de los animales tratados con diferentes dosis de MK-801 en el experimento de Condicionamiento aversivo al olor; * $p < 0.01$ vs día 4; @ $p < 0.01$ vs día 4, Newman-Keuls; $n = 10$ en todos los grupos.

El mismo patrón de consumo se observa en los experimentos de consolidación y evocación (figuras. 2 y 3). La reducción en la ingesta el quinto día posiblemente se debe a que el volumen de LiCl injectado durante la adquisición es muy grande de manera que las ratas no tienen necesidad de beber mucha agua el siguiente día.

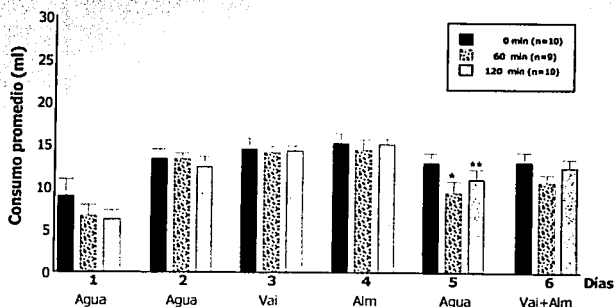


Fig. 2. Consumo promedio de agua de los animales tratados a diferentes intervalos de tiempo post-adquisición con MK-801 en el experimento de Condicionamiento aversivo al olor. * $p < 0.05$ vs día 4; ** $p < 0.05$ vs día 4; Newman-Keuls.

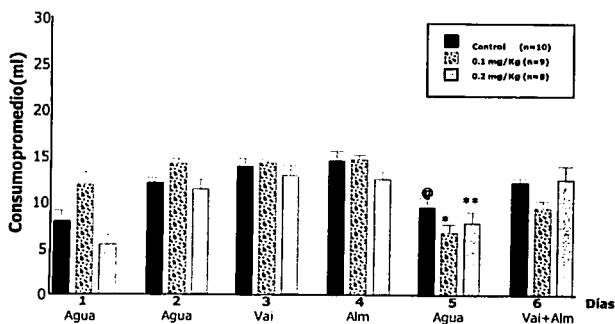


Fig. 3. Consumo promedio de agua de las ratas a las que se les administró MK-801 antes de la prueba de evocación del Condicionamiento aversivo al olor; @ $p < 0.01$ vs día 4, * $p < .001$ vs día 4, ** $p < 0.05$ vs día 4, Newman-Keuls.

Experimento 1a: CAO-adquisición

La figura 4 muestra los resultados obtenidos en la prueba de aversión de las ratas tratadas con MK-801 a diferentes dosis después de la adquisición. Se observa que tanto el grupo control como los animales tratados con dosis de 0.02 reducen el consumo de agua con esencia de almendra, esto es, tienen una fuerte aversión a dicho estímulo; por el contrario, los animales a los que se les administró el antagonista en dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg muestran una disminución en la respuesta condicionada (CAO), es decir, no tienen preferencia por ninguna de las dos esencias. El análisis estadístico confirma este resultado: $F=8.648$, $p=0.0002$, ANOVA; la prueba *post hoc* (Newman-Keuls) indica que existe una diferencia significativa ($p<0.01$) entre el grupo control y los grupos experimentales tratados con dosis altas (0.1 y 0.5 mg/kg), aunque entre el grupo de 0.02 mg/kg y el grupo control no hay diferencia estadística significativa ($p>0.05$). En el caso del grupo control que sólo fue tratado con MK-801 pero no recibió LiCl, se observó un porcentaje de consumo igual a 45.43 ± 7.19 ($\bar{X} \pm E.E.$) por lo que se infiere que el fármaco no actúa como EI, es decir, no es aversivo por sí mismo.

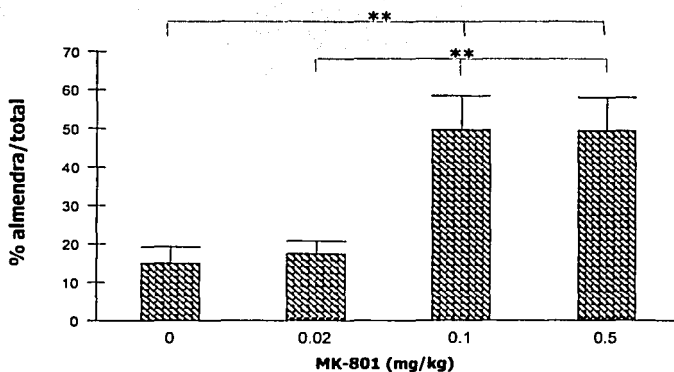


Fig. 4 Consumo de agua con esencia de almendra en la prueba de aversión al olor de las ratas bajo los diferentes tratamientos. Se grafica $\bar{X} \pm E.E.$ de los datos, $F=8.648$, $p=0.0002$, ANOVA; $**p<0.01$, Newman-Keuls, ($n=10$ en todos los grupos)

Experimento 1b: CAO-consolidación

La figura 5 muestra el efecto del MK-801 cuando es administrado 0, 60 ó 120 minutos después del EC (esencia de almendra). La prueba conductual se realizó 48 horas después (día 6) y se observó que las ratas tratadas inmediatamente después de la adquisición (Grupo 0 min) no mostraron aversión por el EC; mientras que el grupo al cual se le administró el fármaco 60 minutos después de EC desarrolló una aversión moderada a la almendra. Por su parte, los animales tratados con un intervalo de tiempo de 120 min post-adquisición tuvieron una fuerte aversión a la almendra, ya que el porcentaje de consumo en este grupo fue considerablemente bajo. Las pruebas estadísticas corroboran este resultado: la ANOVA indica una diferencia muy significativa entre los grupos ($F= 12.738$, $p=0.0001$) y la prueba de Newman-Keuls señala una diferencia ($p<0.05$) entre el grupo de 0 min y el grupo de 60 min; de igual forma entre el grupo de 60 min y el grupo de 120 min existe una diferencia significativa ($p<0.05$); finalmente, el análisis indica una diferencia altamente significativa ($p<0.001$) entre los animales tratados con el fármaco inmediatamente después y aquellos a los que se les administró 120 min después.

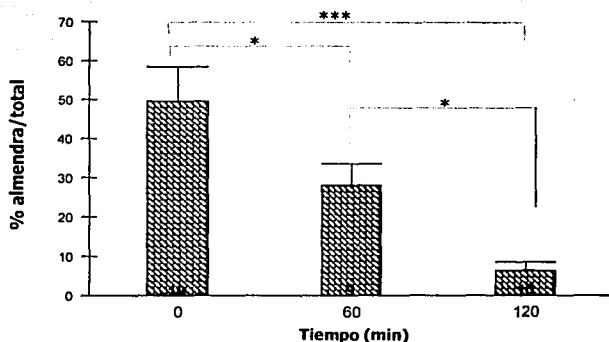


Fig. 5 Consumo de agua con esencia de almendra en la prueba de aversión al olor de las ratas tratadas con MK-801 0.1 mg/Kg (i.p.) a diferentes intervalos después del EC. Se grafica $\bar{X} \pm E.E.$ de los datos; $F=12.738$, $p=0.0001$, ANOVA; * $p<0.05$, *** $p<0.001$, Newman-Keuls. El número dentro de la barra indica la n de cada grupo.

Experimento 1c: CAO-evocación

En la figura 6 se representan los resultados obtenidos en la prueba conductual de las ratas a las que se les inyectó el fármaco antes de la evocación. Se observa que tanto en el grupo control como en los dos grupos experimentales hay un consumo muy pobre del agua con esencia de almendra, lo que indica una fuerte aversión hacia este estímulo; esto se confirma con el análisis de varianza (ANOVA) ya que no existe diferencia estadística significativa entre los tres grupos ($F=1.548$, $p=0.2331$). Es importante recalcar que en el caso del grupo tratado con MK-801 en dosis de 0.2 mg/kg la prueba conductual se realizó 150 minutos después de la administración del fármaco y no 15 minutos después como lo marca el protocolo, debido a los fuertes efectos motores del fármaco sobre los animales, que les impedía ejecutar eficientemente la prueba, es decir, las ratas eran incapaces de beber agua y por este motivo fue necesario dejar pasar ese periodo de tiempo para su recuperación.

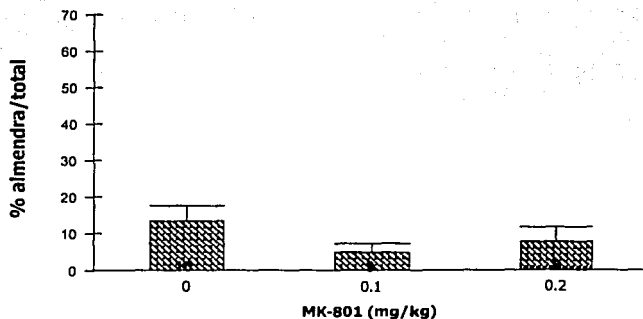


Fig. 6 Resultados de la prueba de aversión al olor de las ratas tratadas con MK-801 (i.p.) antes de la prueba de evocación. No existe diferencia estadística significativa entre los grupos, $F=1.548$, $p=0.2331$, ANOVA; Se grafica $\bar{X} \pm E.E.$ de los datos; la n de cada grupo se indica dentro de la barra.

8.2 Potenciación del olor por el sabor (POS)

En la figura 7 se muestra el consumo diario promedio de líquido para los diferentes grupos en el experimento de POS, se observa que dicho consumo es muy similar entre los grupos; además ocurre lo mismo que en el experimento de CAO: los animales beben muy poca agua el primer día y a partir del segundo el consumo aumenta y se mantiene estable hasta el final del experimento, con excepción del día en que se les presenta el estímulo condicionado (sacarina + esencia de almendra). Para analizar la respuesta neofóbica los datos del quinto día (adquisición) de todos los grupos ($n=29$) se compararon con la ingesta diaria de los tres días anteriores; el resultado indica una reducción significativa en el consumo ($F=17.65$, $p<0.0001$, ANOVA; @ $p<0.0001$, Newman-Keuls). Es decir, el día de la adquisición las ratas disminuyen la ingesta sugiriendo que la combinación de un olor y un sabor nuevo generan una respuesta neofóbica.

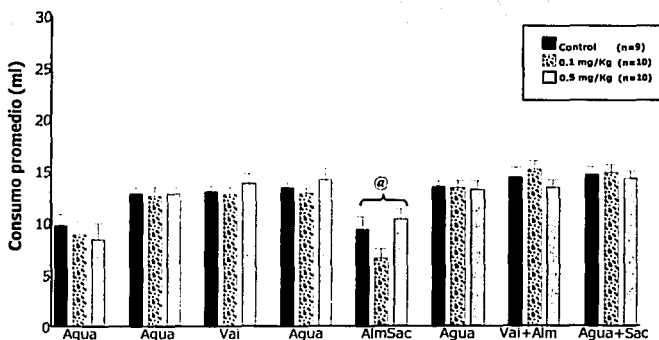


Fig. 7 Consumo promedio de líquido de los animales en el experimento de Potenciación del Olor por el Sabor; se observa un efecto neofóbico al compuesto sacarina+esencia de almendra que se ve reflejado en la disminución en el consumo, $F=17.65$, $p<0.0001$, ANOVA; @ $p<0.0001$ Newman-Keuls con respecto al consumo de los tres días anteriores.

En la figura 8 se muestran los resultados de las pruebas de olor y sabor de los animales en el experimento de Potenciación. Como puede observarse, en los tres grupos se observa una fuerte aversión hacia el componente gustativo (solución de sacarina) independientemente del tratamiento al que fueron sometidos. De igual forma, los datos indican que tanto las ratas del grupo control como las experimentales desarrollaron aversión hacia la esencia de almendra; se observa que la aversión al sabor fue un poco mayor que la aversión por el estímulo olfativo. Es decir, el fármaco no tuvo ningún efecto en el aprendizaje aversivo al olor o al sabor. El análisis estadístico (ANOVA) confirma que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F = 1.186$, $p = 0.3214$ en la prueba de olor y $F = 1.255$, $p = 0.3018$ en la prueba de sabor).

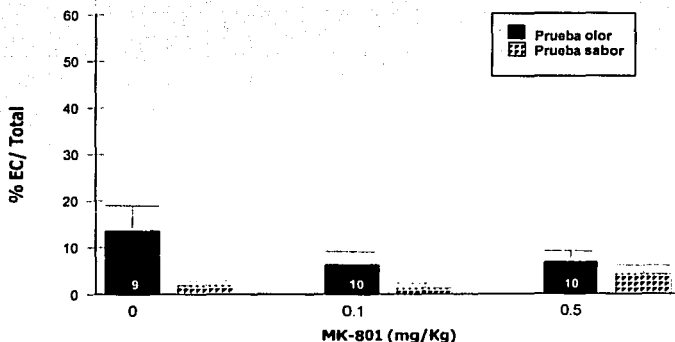


Fig. 8 Porcentaje de consumo del estímulo aversivo en las pruebas de olor y sabor de las ratas sometidas a los diferentes tratamientos en el modelo de Potenciación del Olor por el Sabor. Se grafica $\bar{X} \pm E.E.$ de los datos; no existe diferencia estadística significativa entre los grupos, $F = 1.186$, $p = 0.3214$ para la prueba de olor; $F = 1.255$, $p = 0.3018$ para la prueba de sabor (ANOVA). El número dentro de la barra indica la n de cada grupo.

IX. DISCUSIÓN

Condicionamiento Aversivo al Olor

Los datos de consumo nos indican que los animales tienden a beber cantidades equivalentes de agua durante los experimentos y que la manipulación no tiene efecto en los animales pues éstos mantienen un patrón de consumo estable durante el mismo. Por otro lado, se infiere que los estímulos olfativos (esencia de vainilla o esencia de almendra) no producen un efecto neofóbico en las ratas.

En el experimento de CAO (experimento 1a; figura 4) se observa que los animales del grupo control fueron capaces de desarrollar aversión a un estímulo olfativo cuando éste fue seguido inmediatamente de malestar gástrico, es decir, se estableció adecuadamente un aprendizaje aversivo al olor. Por otra parte, los datos muestran que la administración sistémica del antagonista MK-801 en dosis mayores de 0.1mg/kg provoca la pérdida de la respuesta condicionada (CAO), esto es, una disminución muy significativa de la aversión a la almendra.

Por otra parte, se pudo constatar que sólo las ratas a las que se les inyectó el fármaco 120 min post-adquisición (experimento 1b; figura 5) fueron capaces de desarrollar aversión hacia la esencia de almendra, mientras que el grupo de 60 min post-adquisición mostró una aversión intermedia a la almendra, medida como una disminución moderada de la respuesta condicionada. Esto nos indica que el deterioro en el aprendizaje provocado por el antagonista del receptor a NMDA tiene un gradiente temporal, pues el efecto amnésico del fármaco persiste al menos 60 minutos después de la adquisición, transcurrido este tiempo el fármaco tiene poco o ningún efecto.

En el experimento de evocación (figura 6) se observa que los grupos experimentales (0.1 y 0.2 mg/kg) se comportan de manera muy similar al grupo control. Es decir, las ratas tienen una fuerte aversión a la esencia de almendra y son capaces de evocar perfectamente la información aún cuando existe bloqueo farmacológico de los receptores a NMDA. Como ya se mencionó la adquisición de la memoria involucra una secuencia de eventos intracelulares y durante esos eventos pueden o no participar las mismas estructuras y/o los mismos sistemas de neurotransmisión. De acuerdo a los resultados se concluye que la activación de los receptores a NMDA es indispensable para la adquisición y la consolidación del CAO, pero no para su evocación.

Estos resultados son comparables a los de Staubli y col. (1989) donde se demostró que los receptores a NMDA son fundamentales para la adquisición pero no para la evocación de las tareas olfativas. Existe evidencia de que los receptores a NMDA están involucrados en la adquisición y en etapas tempranas de la consolidación de la memoria no sólo de tareas olfativas (Staubli *et al.*, 1989; este estudio) sino también de tareas de tipo espacial (Przybylski & Sara, 1997). Asimismo, se ha documentado que los receptores a NMDA no se requieren para la expresión de LTP sino únicamente en su inducción (Bliss & Collingridge, 1993). La LTP es una forma de plasticidad sináptica que se cree contribuye a la obtención y al almacenamiento de información en el cerebro. Esto tiene implicaciones importantes en el entendimiento de los mecanismos fisiológicos que subyacen a la memoria olfativa; en particular, se considera que los receptores a NMDA son fundamentales en la adquisición pero no en el mantenimiento (expresión) de dicha memoria, y podría ocurrir algo similar en otras formas de aprendizaje.

Potenciación del olor por el sabor

Los resultados muestran que las ratas beben cantidades equivalentes de líquido a lo largo del experimento, con excepción del quinto día cuando se les presenta el estímulo condicionado (sacarina + esencia de almendra), lo que indica que la combinación de un sabor y un olor provoca una mayor respuesta neofóbica en los animales en comparación con un estímulo solo, pues el efecto de neofobia no se observa cuando se presenta únicamente la esencia de almendra (como es el caso del experimento de CAO).

Un alimento nuevo genera neofobia que se manifiesta por el consumo de pequeñas porciones en intervalos largos de tiempo. La neofobia tiene la función de separar el estímulo novedoso de los familiares permitiendo la evaluación aislada de las consecuencias de su ingestión y como resultado se reduce el peligro de envenenamiento. En otras palabras, la respuesta neofóbica limita el consumo de un alimento nuevo hasta que se determinan las consecuencias de su ingesta (Bureš & Burešová, 1981). Es evidente el valor adaptativo de la respuesta neofóbica pues las conductas de alimentación están ligadas a la supervivencia de los organismos y están basadas en la ingestión de alimentos nutritivos evitando aquellos que pudieran tener un efecto tóxico.

En el experimento de POS (Fig. 8) se muestra que los animales del grupo control son capaces de hacer una asociación entre el olor (esencia de almendra) y el LiCl aún cuando existe un retardo de 30 minutos entre la presentación de un estímulo y otro. Este efecto sólo se observa cuando el olor viene acompañado del sabor pero no cuando el olor se presenta solo pues cuando se comparó este grupo control con un grupo independiente en el que se estableció un CAO en un esquema retardado (es decir, que hubo un lapso de 30 min entre la presentación del EC y el EI) se encontró que había una diferencia estadística muy significativa ($\bar{X} \pm EE = 14.18 \pm 3.24$ vs 35.35 ± 6.70 ; $F = 4.267$, $p = 0.0039$, t de Student; no se muestra la gráfica) con lo cual se comprueba el fenómeno de POS.

Por otra parte, en la misma gráfica se observa que los grupos experimentales presentan una aversión muy fuerte a la sacarina, lo cual concuerda con reportes previos donde se demuestra que la inyección de antagonistas del receptor a NMDA por vía sistémica (Robinson *et al.*, 1989) o por vía intracerebral no bloquea el elemento gustativo durante la potenciación (Ferry & Di Scala, 2000; Hatfield & Gallagher, 1995; Willner *et al.*, 1992). Sin embargo, contrario a los reportes donde el bloqueo farmacológico de los receptores a NMDA por vía sistémica (Robinson *et al.*, 1989) o intracerebral (Hatfield & Gallagher, 1995; Willner *et al.*, 1992) tiene un efecto en el elemento olfativo de la potenciación, en este estudio se demostró que el componente olfativo permanece inalterado cuando un antagonista del receptor a NMDA se emplea (aún en dosis muy altas) inmediatamente después del EC.

Esta discrepancia puede deberse a cuestiones metodológicas, en particular, al momento en el que se administró el fármaco; mientras que en los estudios mencionados se inyectó la droga antes del EC, en nuestro estudio el MK-801 se aplicó inmediatamente después del EC. Por otro lado, el resultado es consistente con otro experimento donde la infusión de APV (un antagonista competitivo del receptor a NMDA) en la amígdala basolateral bloquea la adquisición de la aversión al componente olfativo cuando se administra antes pero no inmediatamente después de la presentación del EC (Ferry & Di Scala, 2000). Es decir, nuestro experimento confirma la hipótesis de que la activación de los receptores a NMDA es indispensable para la formación de la memoria olfativa durante la POS. Sin embargo, una vez que se inicia este proceso dependiente de glutamato (durante los 10 minutos que el animal bebe y tiene contacto con ambos estímulos) dicho mecanismo mnémico se vuelve independiente de la transmisión glutamatérgica mediada por los receptores NMDA. Es fundamental hacer notar que esto solo sucede durante la POS pero no durante el CAO, donde el MK-801 tiene efecto amnésico aún después de la presentación del EC.

Si bien no podemos descartar que en otras estructuras cerebrales dichos receptores participen en la serie de eventos fisiológicos que se dan durante la potenciación, parece que la activación de la transmisión glutamatérgica no es un paso esencial en el proceso. Esto nos lleva a pensar

que el sabor es un estímulo tan fuerte que de alguna manera 'protege' al olor aún en condiciones que afectan el condicionamiento a estímulos olfativos simples.

Con estos experimentos se demuestra que cuando se administra un antagonista del receptor a NMDA se interfiere con la adquisición del CAO; sin embargo, cuando se asocia ese mismo estímulo olfativo con un sabor, el fármaco no tiene efecto pues el elemento sávido modifica las propiedades del olor volviéndolo un estímulo muy aversivo; en otras palabras, el efecto de potenciación no depende de manera esencial de la transmisión glutamatérgica mediada por receptores a NMDA.

Algo que merece especial atención es el hecho de que en la prueba de sabor las ratas mostraron una aversión extremadamente fuerte a la sacarina. De hecho, es significativamente más fuerte cuando se compara el grupo control (grupo 0 mg/Kg en la figura 8) con un grupo en el cual se ha establecido un CAS ($\bar{X} \pm E.E. = 11.61 \pm 4.82$; $F=25.653$, $p<0.0001$, t de Student; no se muestra la gráfica). A partir de lo anterior se sugiere que no sólo el sabor tiene un efecto sinérgico sobre el olor sino que podría darse el efecto inverso: la potenciación del sabor por el olor. Existe evidencia de que el olor puede tener un efecto sinérgico sobre el sabor (Slotnick, *et al.*, 1997); estos autores demostraron que un estímulo olfativo puede potenciar el aprendizaje aversivo a un sabor y que este efecto sólo se observa cuando el estímulo gustativo se asocia muy débilmente con el malestar gástrico pero no cuando el sabor es un estímulo fuerte para establecer un condicionamiento toxicofóbico. La hipótesis de Slotnick y col. sugiere que para que ocurra la potenciación del aprendizaje aversivo se deben cumplir dos condiciones: a) la presencia de un estímulo aversivo que se asocie fuertemente al malestar y b) la presencia de un estímulo que por sí sólo sea ineficaz para asociarse con dicho malestar.

Sin embargo, en el presente estudio se demuestra que puede darse la potenciación aún cuando se utiliza un estímulo gustativo que puede asociarse eficazmente con enfermedad, es decir, se puede establecer una potenciación aún cuando el sabor es un estímulo fuerte. Pero,

¿cómo es que ocurre este efecto sinérgico? Varios autores apoyan la hipótesis de que existe convergencia entre las aferentes olfativas y gustativas y que esta convergencia física es la base de la POS (Palmerino *et al.*, 1980; Rusiniak *et al.*, 1982); sin embargo, no se conoce una teoría que explique claramente el mecanismo fisiológico de la potenciación.

Sabemos que existe una estrecha relación entre olfato y gusto; de hecho, en condiciones naturales las percepciones provocadas por el consumo de alimento resultan de la integración de información olfativa, gustativa, y posiblemente trigeminal. Por lo tanto, se infiere que varios atributos intrínsecos del alimento o fluido ingerido (y no solamente el sabor) constituyen un EC crítico para el sistema interno, de manera que las propiedades no gustativas de los alimentos pueden ser igual de efectivas para asociarse al malestar o a cualquier otra consecuencia de su ingestión (Slotnick, *et al.*, 1997).

Si bien los resultados del experimento no permiten hacer inferencias acerca de la serie de eventos fisiológicos que son la base de la potenciación, podemos concluir que el efecto de potenciación del sabor sobre el olor o viceversa resulta del hecho de que existen interacciones sensoriales entre estímulos gustativos ("tastes") y olfativos que crean la percepción de los sabores ("flavors").

X. CONCLUSIONES

- La activación de los receptores a NMDA es necesaria para la adquisición y la fase temprana de la consolidación del Condicionamiento Aversivo al Olor (CAO), pero no para su evocación.
- En la potenciación del olor por el sabor (POS), el efecto sinérgico del sabor sobre la aversión olfativa se mantiene a pesar del bloqueo farmacológico de los receptores a NMDA.
- La Potenciación del olor por el sabor (POS) no depende de manera esencial de la transmisión glutamatérgica mediada por receptores tipo NMDA.
- Puede haber un efecto sinérgico del olor sobre un estímulo gustativo, es decir, una potenciación del sabor por el olor.

XI. REFERENCIAS

- Ache, B.** (1991) Phylogeny of smell and taste. In *Smell and Taste in Health and Disease*, ed. T. Getchell, R. Doty, L. Bartoshuk, J. Snow Jr. New York: Raven Press, pp. 3-18
- Barkai, E., Saar, D.** (2001) Cellular correlates of olfactory learning in the rat piriform cortex. *Reviews in the Neurosciences* 12: 111-20
- Bashir, Z., Berretta, N., Bortolotto, Z., Clark, K., Davies, C., Frenguelli, B., Harvey, J., Potier, B., Collingridge, G.** (1994) NMDA receptors and long-term potentiation in the hippocampus. In *The NMDA receptor*, 2nd Ed, ed. Collingridge, G. and Watkins, J., UK: Oxford University Press, pp. 294-312
- Bermúdez-Rattoni, F., Rusiniak, K., Garcia, J.** (1983) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behavioral and Neural Biology* 37: 61-75
- Bermúdez-Rattoni, F., Grijalva, C., Kiefer, S., Garcia, J.** (1986) Flavor-illness aversions: the role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiology and Behavior* 38: 503-8
- Bliss, T., G. Collingridge** (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-9
- Brennan, P., Kaba, H., Keverne, E.** (1990) Olfactory recognition: A simple memory system. *Science* 250: 1223-6
- Brennan, P., Keverne, E.** (1997) Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology* 51: 457-81

- Bureš J.**, Bermudez-Rattoni F., Yamamoto T. (1998) *Conditioned Taste Aversion. Memory of a special kind*. Oxford Psychological Series 31. UK: Oxford University Press
- Bureš J.**, Burešová, O. (1981) Elementary Learning Phenomena in Food Selection. In *Brain and Behavior. Advances in Physiological Sciences*, Vol. 17, eds. Adám, G., Mészáros, E. and Bányaí. I., Budapest: Akadémiai Kiado, pp. 81-94
- Dingledine R.**, Borges K., Bowie D., Traynelis S. (1999) The glutamate receptors ion channels. *Pharmacological Reviews* 51: 7-61
- Dudai, Y.** (1994) *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends*. UK: Oxford University Press
- Durlach, P.**, Rescorla, R. (1980) Potentiation rather than overshadowing in flavor-aversion learning: an analysis in terms of within-compound associations. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 6: 175-87
- Ferry, B.**, Di Scala, G. (2000) Basolateral amygdala NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of Taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behavioral Neuroscience* 114: 1005-10
- Hatfield, T.**, Graham, P., Gallagher, M. (1992) Taste-potentiated odor aversion learning: role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behavioral Neuroscience* 106: 286-93
- Hatfield, T.**, Gallagher, M. (1995) Taste-potentiated odor conditioning: impairment produced by infusion of an N-metil-D-aspartate antagonist into basolateral amygdala. *Behavioral Neuroscience* 109: 663-8
- Hildebrand, J.** (1995) Analysis of chemical signals by nervous systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:67-74

- Hildebrand, J.,** Sheperd, G. (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across Phyla. *Annual Reviews in Neurosciences* 20: 595-631
- Hlířák, Z.,** Krejčí, I. (2002) N-methyl-D-aspartate improved social recognition potency in rats. *Neuroscience Letters* 330:227-30
- Kandel, E.,** Schwartz, J., Jessell, T. (2000) *Principles of Neural Science*. 4th Edition, USA: McGraw-Hill
- Kolb, B.,** Whishaw, I. (1990) *Fundamentals of Human Neuropsychology*. 3rd ed. New York: Freeman & Co.
- Lincoln J.,** Coopersmith R., Harris E., Cotman C., Leon M. (1988) NMDA receptor activation and early olfactory learning. *Developmental Brain Research* 39:309-12
- Martínez, J. Jr.,** Kesner, R. ed. (1998) *Neurobiology of Learning and Memory*. USA: Academic Press
- Monaghan, D.,** Cotman, C. (1985) Distribution of N-Methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]Glutamate-binding sites in rat brain. *The Journal of Neuroscience* 5: 2909-19
- Morris, R.,** M. Davis (1994) The role of NMDA receptors in learning and memory. In *The NMDA Receptor*, 2nd Ed., ed. Collingridge, G. and J. Watkins, UK: Oxford University Press, pp. 340-75
- Palmerino C.,** Rusiniak K., Garcia J. (1980) Flavor-illness aversions: The peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 208: 753-5
- Przybylski, J.,** Sara, S. (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioral Brain Research* 84: 241-246
- Purves, D.,** Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., Lamantia, A., Mcnamara, J. (2001) *Invitación a la Neurociencia*, Argentina: Ed. Médica Panamericana

- Rampon C., Tang Y., Goodhouse J., Shimizu E., Kynin M., Tsien J. (2000)** Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1- knockout mice. *Nature Neuroscience* 3: 238-44
- Robinson, G., Crooks, G., Shinkman, P., Gallagher, M. (1989)** Behavioral effects of MK-801 mimic deficits associated with hippocampal damage. *Psychobiology* 17:156-64
- Rusiniak K., Hankins W., Garcia J., Brett L. (1979)** Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behavioral and Neural Biology* 25: 1-17
- Rusiniak K., Palmerino C., Rice A., Forthman D., Garcia J. (1982)** Flavor-illness aversions: Potentiation of odor by taste with toxin but not shock in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 96: 527-39
- Sassoè-Pognetto, M., Ottersen, O. (2000)** Organization of Ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience* 20: 2192-201
- Shepherd, G. (1994)** *Neurobiology*, 3rd ed, New York: Oxford University Press
- Shipley, M., Ennis, M. (1996)** Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology* 30: 123-76
- Shirsat, N., Siddiqi, O. (1993)** Olfaction in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* 3: 553-7
- Slotnick, B., Westbrook, F., Darling, F. (1997)** What the rat's nose tells the rat's mouth: Long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors. *Animal Learning and Behavior* 25: 357-69
- Staubli, U., Thibault, O., DiLorenzo, M., Lynch, G. (1989)** Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behavioral Neuroscience* 103: 54-60

- Strausfeld, N.,** Hildebrand, J. (1999) Olfactory systems: common design, uncommon origins? *Current Opinion In Neurobiology* 9:634-9
- Watkins, J.** (1994) The NMDA receptor concept: origins and development. In *The NMDA Receptor*, 2nd Ed., ed. Collingridge, G. and Watkins, J., UK: Oxford University Press, pp. 1-30
- Weldon, D.,** Fedorick, G., Lo Russo, C., Tiburzi, M., Lenoci, J. (1997) Olfactory conditioning impairment following posttraining NMDA receptor blockade in neonatal rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 67: 34-42
- Welzl, H.,** D' Adamo, P., Lipp, H. (2001) Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioral Brain Research* 125: 205-13
- Willner J.,** Gallagher M., Graham P., Crooks G. (1992) N-Methyl-D-Aspartate antagonist D-APV selectively disrupts taste-potentiated odor aversion learning. *Behavioral Neuroscience* 106: 315-23