



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Liberación glutamatérgica y noradrenérgica en la
Corteza Insular durante los estímulos que forman el
aprendizaje gustativo.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
KIOKO RUBÍ GUZMÁN RAMOS



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



MÉXICO, D. F.

2005

m. 347364



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Elena Zambrano González
Vocal	Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio
Secretario	Psic. Leticia Ramírez Lugo
1er. Suplente	...OSCAR ARMANDO PEREZ MENDEZ
2º. Suplente	JOSE LUIS BUSTO SANCHEZ

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México.



Psic. Leticia Ramírez Lugo
Tutora



Kioko Rubí Guzmán Ramos
Sustentante

Al Sagrado Corazón de Jesús

A mis padres, Teresita Ramos Vázquez y Germán Guzmán Pérez cuyo apoyo incondicional me ha proporcionado las herramientas para alcanzar todos mis objetivos; son un ejemplo a seguir, mi eterna admiración. Gracias por su confianza y amor.

A mis hermanos, Mónica Guzmán Ramos y Oscar Guzmán Ramos que me han apoyado en todos los aspectos siempre, no lo habría logrado sin ustedes, son los mejores.

A Ademir Cabrera Sosa, el hombre más dedicado y amable que he conocido; gracias por acompañarme en esta etapa brindándome tu paciencia, apoyo, consejo y amor.

Agradecimientos

A mi tutora, Leticia Ramírez Lugo, en quien no sólo encontré una excelente mentora sino también una amiga entrañable que me introdujo con paciencia al área de las neurociencias, inculcándome amor por esta disciplina.

A las distinguidas profesoras que componen el jurado: Dra. Elena Zambrano González y Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio que brindaron valiosas observaciones al presente trabajo, ayudándome a mejorar. Gracias por su tiempo.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, gracias por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por su apoyo en mis decisiones académicas y por la confianza que me ha brindado para continuar participando.

A Perla Moreno Castilla, sin su ayuda y apoyo este trabajo no sería una realidad; gracias por ser la mejor compañera de trabajo, por compartir risas y llanto en este año y sobre todo por tu amistad, realmente la atesoro.

A Noemí y Mary, las mejores amigas que tengo, gracias por su apoyo, por su consejo y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Pau, Noel, Nayeli, Paulina, Marco, Fernando, Alberto y Armando, por enseñarme que se puede tener una familia fuera de casa.

A Rodrigo y Sergio, cuya compañía siempre ha sido amena. Gracias por su invaluable ayuda y amistad.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, especialmente a Núñez y a Royero, por hacer agradable mi estancia.

A Manuel y Marino, que siempre hicieron de un día normal, un día encantador.

A Oreste y Yola por su ayuda y apoyo, gracias por su labor.

ÍNDICE

Abreviaturas	iii
Resumen	iv
I. INTRODUCCIÓN	
1. Historia del estudio del aprendizaje y la memoria	1
2. Aprendizaje gustativo	4
2.1 Vías de procesamiento dentro del aprendizaje gustativo.....	5
2.1.1 Procesamiento del estímulo gustativo	6
2.1.2 Procesamiento del estímulo visceral	6
2.2 Corteza Insular	7
2.3 Sistema de neurotransmisión glutamatérgico	11
2.4 Sistema de neurotransmisión noradrenérgico	13
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO	15
III. PARTE EXPERIMENTAL	
1. Animales	17
2. Implantación de cánulas guía	17
3. Habitación a la cámara de microdiálisis	19
4. Microdiálisis en libre movimiento	19
5. Análisis de las muestras	
5.1 Cuantificación de glutamato y norepinefrina por electroforesis capilar	22
5.1.1 Desarrollo del método analítico y búsqueda de las condiciones óptimas para el análisis	24
5.1.1.1 Procedimiento de derivatización	24
5.1.1.2 Separación y detección	27
5.1.1.3 Cuantificación	29

6. Histología	29
7. Análisis estadístico	30
IV. RESULTADOS	
1. Verificación de la localización de la membrana y de la cánula guía...	31
2. Liberación de glutamato durante la presentación de un estímulo gustativo	31
3. Liberación de norepinefrina durante la presentación de un estímulo gustativo	32
4. Liberación de glutamato tras la inyección del inductor de malestar gástrico	34
5. Liberación de norepinefrina tras la inyección del inductor de malestar gástrico	34
V. DISCUSIÓN	36
VI. CONCLUSIONES	45
VII. BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXO I	54

ABREVIATURAS

ABL	amígdala basolateral
AC	adenilato ciclasa
ACE	amígdala central
ACh	acetilcolina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AN	atenuación de la neofobia
AP	anteroposterior
AP5	Ácido DL-2-amino-5-fosfovalérico
CAS	condicionamiento aversivo a los sabores
CI	corteza insular
DFIL	detección por fluorescencia inducida por láser
DV	dorsoventral
EC	electroforesis capilar
FLC	fosfolipasa C
FQ	(3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído
GLUT	glutamato
HL	hipotálamo lateral
HPLC	high performance liquid chromatography
i.p.	intraperitoneal
L	lateral
LC	locus coeruleus
LCRA	líquido cefalorraquídeo artificial
MCP	memoria a corto plazo
MLP	memoria a largo plazo
NE	norepinefrina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPB	núcleo parabraquial
NTS	núcleo del tracto solitario
TTX	tetradotoxina
VPL	tálamo ventroposterolateral
VPM	tálamo ventroposteromedial

RESUMEN

El aprendizaje es un cambio en el comportamiento como consecuencia de modificaciones neuronales debidas a la experiencia, mientras que la memoria es el proceso por el cual es posible mantener y expresar ese cambio. El estudio de la formación de la memoria es uno de los temas que, por su complejidad requiere de aproximaciones que aporten información que pueda ser integrada para elucidar los mecanismos que se llevan a cabo cuando formamos recuerdos; siendo el aprendizaje gustativo uno de los modelos más ampliamente utilizados para estos fines, el contribuir a un mejor entendimiento de la señalización involucrada en los diferentes estímulos que llevan a la formación de este tipo de aprendizaje y la posible interacción entre sistemas de neurotransmisión permitirá avanzar en el conocimiento de los procesos de la neurobiología del aprendizaje y la memoria. El aprendizaje gustativo inicia cuando el animal consume un alimento nuevo, el comportamiento normal es un consumo restringido del sabor desconocido, a lo que se conoce como respuesta neofóbica (miedo a lo nuevo). Si tras el consumo del sabor nuevo hay efectos adversos como dolor gástrico o náuseas, se reduce su consumo en la siguiente exposición reflejando un aprendizaje gustativo de aversión, conocido como condicionamiento aversivo a los sabores (CAS); por el contrario, si no se presentan consecuencias negativas, la señal gustativa será almacenada como segura y en la siguiente exposición se incrementará el consumo del alimento reflejando el aprendizaje gustativo de lo seguro, modelo llamado atenuación de la neofobia (AN).

Entre las ventajas de emplear estos modelos de aprendizaje está el conocimiento de las estructuras involucradas en el procesamiento de la información gustativa y visceral que participan en el aprendizaje gustativo. Una de las estructuras más estudiadas ha sido la Corteza Insular (CI); se cuenta con amplia evidencia de la participación de esta corteza en la formación del aprendizaje gustativo tanto de lo seguro como de lo aversivo específicamente a través de los sistemas glutamatérgico y colinérgico. La liberación extracelular de acetilcolina (ACh) en la CI se ha relacionado con la familiaridad de los estímulos gustativos, mientras que la señal glutamatérgica se relaciona con el procesamiento del malestar gástrico como lo indican datos de liberación extracelular y manipulaciones farmacológicas intracorticales con antagonistas y agonistas de los receptores de glutamato. En la CI otro sistema de neurotransmisión involucrado en el aprendizaje gustativo es el noradrenérgico, particularmente se sabe que participa en la formación del CAS pues se cuenta con evidencia de que al bloquear los receptores β -adrenérgicos se afecta el aprendizaje gustativo de aversión; sin embargo se desconoce si la señal noradrenérgica está involucrada en el procesamiento del estímulo gustativo o en el del malestar gástrico.

Esta tesis se enfocó en el estudio de la liberación extracelular en la CI de dos neurotransmisores: el glutamato y la norepinefrina; respecto al glutamato se han analizado cambios en su concentración extracelular en la CI relacionados al aprendizaje gustativo de aversión mediante monitoreos de fracciones de muestra de líquido cefalorraquídeo de rata que comprenden 15 minutos ya que la cuantificación se lleva a cabo con ayuda de HPLC y el volumen mínimo de muestra requerido es de 20-30 μ L, de manera que la liberación de glutamato podría apreciarse mejor obteniendo muestras en intervalos más cortos presentando la necesidad de aplicar nuevas técnicas que permitan lograr esto; respecto a la norepinefrina no se cuentan con datos directos acerca de su liberación relacionada al aprendizaje gustativo. De manera que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la liberación de glutamato y norepinefrina en muestras de líquido cefalorraquídeo de rata obtenido de la CI por medio de microdialisis en libre movimiento durante la presentación del estímulo gustativo y del malestar gástrico para analizar la posible participación de estos neurotransmisores en su señalización. El reto experimental consistió en realizar la cuantificación en la misma muestra y de manera simultánea para contar con los datos de liberación extracelular de varios neurotransmisores al mismo tiempo, de manera que se llevó a

cabo mediante electroforesis capilar en su modalidad de cromatografía micelar electrocinética, una técnica de reciente desarrollo que se ha aplicado escasamente en las neurociencias.

Para cumplir con el objetivo planteado se estudiaron los siguientes eventos:

- 1) Liberación de glutamato y norepinefrina al dar un estímulo gustativo por primera vez, como una solución de sacarina al 0.1% comparada con agua; donde se observó un incremento en la liberación de norepinefrina con la solución de sacarina pero no con el agua y no se apreciaron cambios en la liberación de glutamato en ningún caso.
- 2) Liberación de glutamato y norepinefrina al inducir malestar gástrico con una inyección intraperitoneal de LiCl en comparación con la inyección de NaCl, que no induce malestar gástrico. En este experimento se observó un incremento en la liberación de ambos neurotransmisores debido a la inyección del LiCl que en el caso de la inyección de NaCl no se presentó en lo que respecta al glutamato, sin embargo no se vieron diferencias en la liberación de norepinefrina entre el grupo que recibió la inyección de LiCl y el que recibió la de NaCl.

De los resultados anteriores se concluye que el incremento en la liberación de glutamato en CI se presentó como parte de la señalización del malestar gástrico específicamente y no hay cambios apreciables en la liberación de este neurotransmisor relacionados al estímulo gustativo. No así en el caso de la norepinefrina que participa en la señalización del estímulo gustativo, ya sea involucrando un proceso de atención debido a la novedad o a la generación de estrés debida a la propia novedad; el papel de este neurotransmisor en la señalización del malestar gástrico dentro de la CI no queda claro, lo cual da pie a nuevas preguntas para explicar con más detalle su participación en el aprendizaje gustativo.

I. INTRODUCCIÓN

1. *Historia del estudio del aprendizaje y la memoria.*

Una forma en la que los individuos interaccionan con el ambiente es a través del aprendizaje, éste puede definirse como un cambio en la conducta debido a la experiencia que permite a los organismos adaptarse a situaciones para las cuales su comportamiento innato es inadecuado (Chance *et al.*, 1999); el proceso por el cual es posible mantener y expresar el cambio conductual antes mencionado se llama memoria. La forma en que se adquiere, almacena y recupera la información guardada involucra procesos complejos que poco a poco se han ido descubriendo y complementando como si se tratara de un rompecabezas; inicialmente los filósofos estudiaron la memoria por medio de introspección, análisis lógico y argumentación (Squire *et al.*, 2000) sin embargo, esta aproximación era subjetiva y poco cuantificable.

En la búsqueda de explicar algunos fenómenos mentales objetiva y cuantitativamente, a finales del siglo XIX Hermann Ebbinghaus estudió por primera vez sistemáticamente el proceso mnemónico proporcionando información experimental que permitió clasificar la memoria de acuerdo a su duración. Posteriormente, en 1890 William James llamó a aquellas memorias que duran minutos u horas “memoria de corto plazo” (MCP) y a aquellas que duran meses o años las llamó “memoria de largo plazo” (MLP). Georg Müller y Alfons Pilzecker sugirieron que esta última se consolida con el tiempo, es decir, se vuelve “resistente a la interferencia” (Squire *et al.*, 2000). La pregunta acerca de dónde se almacena la memoria trató de ser respondida por Karl Lashley quien, tras entrenar ratas a salir de un laberinto, removió diferentes áreas de la corteza cerebral, y las

colocó de nuevo en el laberinto para observar cuánto del aprendizaje habían conservado; encontró que el déficit en el desempeño correlacionaba con el tamaño del área cortical removida, no con una localización específica gracias a lo cual se comenzó a demostrar que no existe un solo centro en el cerebro en el que se almacena la memoria. Para explicar los resultados de Lashley, Donald Hebb sugirió que redes de células trabajan juntas para representar información y que estos conjuntos se encuentran distribuidos en grandes áreas de la corteza (Squire, *et al*, 2000).

En 1957 el caso H.M. (por las iniciales del paciente), descrito por Brenda Milner aportó evidencias de la participación de diferentes estructuras en la capacidad de trasladar MCP a MLP, proceso conocido como consolidación. Al paciente H.M. le fueron removidas estructuras mediales del lóbulo temporal bilateralmente como tratamiento a una epilepsia severa, lo cual le trajo como consecuencia la incapacidad de almacenar nueva información (amnesia anterógrada), sin embargo el paciente podía recordar todos los eventos previos a la intervención quirúrgica; demostrándose que las estructuras extraídas no son los últimos sitios de almacenaje de la memoria. También se demostró que existe más de un sistema de memoria, uno de ellos no depende del lóbulo temporal medial pues este sistema se encontraba intacto según las observaciones realizadas en el paciente H.M. y se adquiere con la repetición de una tarea expresándola a través del desempeño pero sin evocarla conscientemente, a este tipo de memoria se le llama “No Declarativa” o “Implícita” y se refiere a “saber cómo”, por ejemplo algunas habilidades motoras. El otro sistema de memoria se conoce como “Memoria Declarativa” o “Explícita” que se refleja al recordar hechos y eventos refiriéndose al “saber qué, cuándo y dónde” (Milner *et al*, 1998).

Actualmente la clasificación de la Memoria más aceptada es la de Larry Squire. Esta clasificación se basa en el análisis de los daños en los sistemas de memorias como consecuencia de lesiones en pacientes con padecimientos neurológicos, (fig. 1).

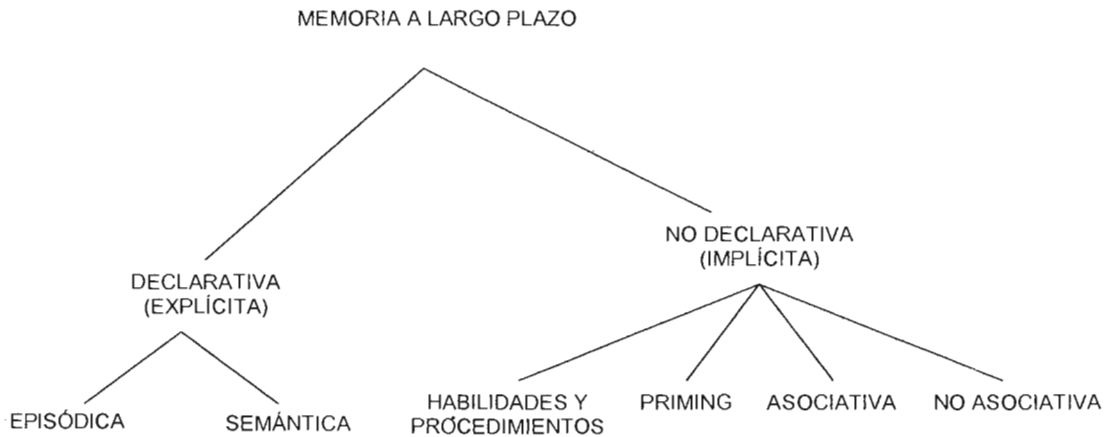


Fig. 1. Taxonomía de los sistemas de memoria en los mamíferos según Squire. Modificado de Milner *et al.*, 1998.

El estudio y descripción de casos clínicos o evidencia anecdótica no nos permite explicar los fenómenos que subyacen al aprendizaje, de manera que se hace necesario emplear métodos experimentales donde podamos manejar variables controladas. Existen varios modelos para el estudio del aprendizaje, la memoria y los procesos neurales involucrados; entre los más utilizados están los que se refieren al aprendizaje gustativo.

2. *Aprendizaje gustativo.*

El alimentarse es esencial para la supervivencia; sin embargo, implica algunos riesgos, ya que existe la posibilidad de consumir alimentos tóxicos o venenosos. Cuando los animales prueban un alimento nuevo, el comportamiento normal es un consumo restringido del sabor desconocido, a lo que se conoce como respuesta neofóbica (miedo a lo nuevo) y constituye una estrategia de supervivencia conservada a través de la evolución que permite disminuir el consumo de un alimento que puede ser dañino y provocar náuseas, dolor o incluso la muerte. Si tras el consumo del sabor nuevo no se presentan consecuencias negativas, en la siguiente exposición a éste, incrementará su consumo reflejando un aprendizaje gustativo de lo seguro, modelo conocido como atenuación de la neofobia (AN). Por el contrario, si después de consumir el sabor hay efectos adversos como dolor gástrico o náuseas, reducirá su consumo en la siguiente exposición reflejando un aprendizaje gustativo de aversión, conocido como condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) (García *et al.*, 1955); éste se basa en un aprendizaje asociativo establecido cuando el animal relaciona un sabor con un subsecuente malestar gástrico, esta asociación presenta varias características únicas que confieren a los experimentadores ventajas metodológicas: 1) Puede establecerse un CAS fuerte al parear una sola vez el sabor con el malestar y 2) Es posible formar el CAS aún cuando hayan pasado varias horas entre la exposición al sabor y la llegada del malestar (Yamamoto *et al.*, 1998). La figura 2 representa lo que dentro de este modelo experimentalmente constituye la fase de adquisición, que es la asociación entre el sabor y malestar gástrico. La prueba constituye la posterior presentación del mismo sabor para saber si el animal recuerda que le hizo daño.

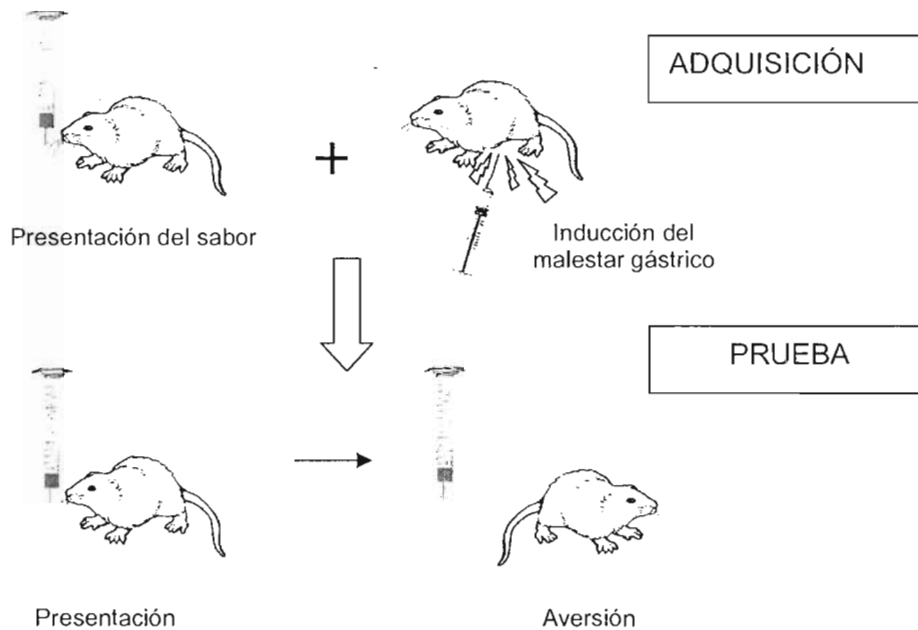


Fig. 2. Procedimiento del condicionamiento aversivo a los sabores. En la adquisición, a los animales se les da un estímulo gustativo nuevo, se les permite beber de una probeta graduada durante 15 minutos y se anota el consumo en mL; treinta minutos después se les aplica una inyección vía intraperitoneal de una solución de cloruro de litio (LiCl, 0.4 M) para inducir malestar gástrico. Cuatro días después se realiza la prueba, donde el animal es reexpuesto al sabor, si el animal asoció éste con el malestar su respuesta será aversión a ese sabor reflejada por una disminución en el consumo con respecto al consumo basal de agua.

2.1 Vías de procesamiento dentro del aprendizaje gustativo.

Varios estudios han descrito las vías neurales que intervienen en el procesamiento de los estímulos gustativo y visceral empleando técnicas anatómicas y electrofisiológicas (Bermúdez-Rattoni, 2004). El conocimiento de las estructuras involucradas constituye una ventaja importante para el estudio de la codificación tanto del estímulo gustativo como del malestar gástrico.

2.1.1 Procesamiento del estímulo gustativo.

Como se puede observar en la figura 3, en la codificación del estímulo gustativo el núcleo del tracto solitario rostral recibe aferencias gustativas primarias de la lengua vía dos nervios craneales, el facial (VII) y el glosofaríngeo (IX) con contribución del nervio vago (X) que inervan la lengua y la cara. Posteriormente la información gustativa llega al núcleo parabraquial dorsolateral en el cerebro medio, esta estructura tiene proyecciones hacia el hipotálamo lateral, stria terminalis y amígdala central y basolateral y hacia el núcleo ventral posteromedial del tálamo; éste proyecta hacia la corteza insular (CI) donde se encuentra la corteza gustativa (corteza insular agranular) (Bermúdez-Rattoni, 2004).

2.1.2 Procesamiento del estímulo visceral (malestar gástrico).

Respecto al estímulo visceral, el núcleo del tracto solitario caudal recibe proyecciones de las ramas hepáticas del nervio vago, que son sensibles a irritación gástrica, y del área postrema, que es sensible a toxinas presentes en la sangre; las proyecciones del núcleo del tracto solitario llegan al núcleo parabraquial externo lateral, la amígdala central y el núcleo hipotalámico paraventricular. De la porción lateral del núcleo parabraquial existen proyecciones a la parte ventral posterolateral del tálamo, que junto con la amígdala central presenta aferencias hacia CI, (fig. 3) (Bermúdez-Rattoni, 2004).

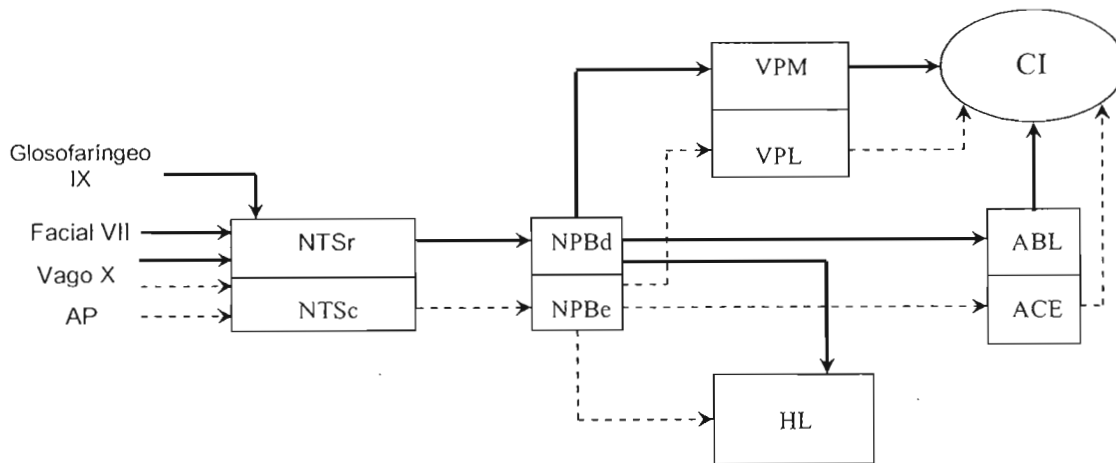


Fig. 3. Resumen de las vías de procesamiento del estímulo gustativo (flechas continuas) y del estímulo visceral (flechas discontinuas). Ver texto, NTSr = núcleo del tracto solitario rostral, NTSr = núcleo del tracto solitario central, NPBd = núcleo parabraquial dorsolateral, NPBe = núcleo parabraquial externo lateral, VPM = tálamo ventral posteromedial, VPL = tálamo ventral posterolateral, HL = hipotálamo lateral, ABL = amígdala basolateral, ACE = amígdala central, CI = corteza insular. Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004.

2.2 Corteza Insular.

Entre las estructuras que participan en la formación de la memoria gustativa de aversión, una de las más estudiadas es la corteza insular (CI) o neocorteza visceral, que se localiza en la corteza temporal de la rata en la confluencia de la arteria cerebral media y el surco rinal (Miranda *et al.*, 2003). La CI recibe proyecciones colinérgicas y GABAérgicas del núcleo basalis magnocelularis; recibe proyecciones glutamatérgicas del sistema límbico incluyendo la amígdala y el núcleo mediodorsal del tálamo y de la corteza prefrontal (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991a), así como proyecciones noradrenérgicas de un núcleo del área dorsorostral del puente, el *locus coeruleus* (LC), que es la principal fuente de norepinefrina del sistema nervioso central (Saper *et al.*, 1982); en la figura 4 se esquematizan las proyecciones glutamatérgicas y noradrenérgicas en el cerebro de la rata.

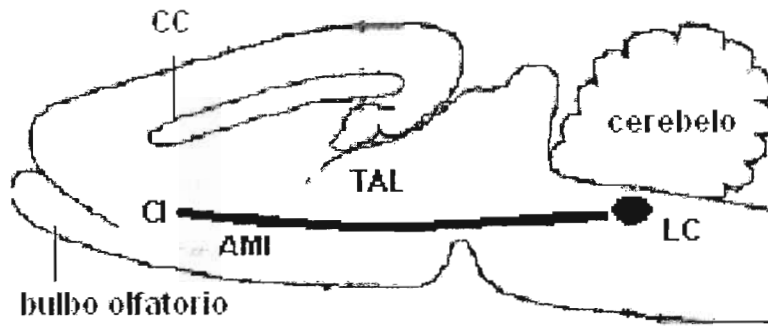


Fig. 4. Esquema de las principales proyecciones glutamatergicas (en gris) y noradrenérgicas (en negro) hacia corteza insular en el cerebro de rata. CI= corteza insular AMI=amígdala, TAL=tálamo, LC=locus coeruleus, CC=cuerpo callosa. Modificado de Siegal, 1999.

Esta corteza está involucrada en reacciones viscerales, estrés (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991b), nocicepción (Ohara *et al.*, 2003) y procesos de aprendizaje y memoria bajo diferentes modelos de estudio, como son prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991b), laberinto acuático de Morris (Gutierrez *et al.*, 1999) y CAS (Bures *et al.*, 1998; Bermúdez-Rattoni, 2004). Particularmente se sabe que la integridad funcional de la CI es importante para la adquisición de la memoria gustativa de aversión (Escobar *et al.*, 2000; Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991a), como lo demuestran trabajos donde se inactiva temporalmente la función de esta estructura por medio de un bloqueador de los canales de sodio sensibles a voltaje, la tetrodotoxina (TTX) antes de la adquisición de la tarea, impidiendo así la formación del CAS (Gallo *et al.*, 1992).

Varios estudios señalan que la CI, está implicada en la primera etapa de la formación de la memoria relacionada al procesamiento del estímulo gustativo, pero no precisamente en su detección, ya que ratas lesionadas en CI son capaces de detectar los estímulos normalmente (Kiefer *et al.*, 1984) y dar respuestas estereotípicas al probar

concentraciones fuertes de diferentes soluciones, como agitar la cabeza, abrir la boca y frotar su patas delanteras contra su hocico (Bures *et al.*, 1998).

En lo que concierne al estímulo gustativo, se ha visto por medio de microdiálisis en libre movimiento¹ que dentro de la CI ocurren cambios en la liberación de acetilcolina (ACh) que correlacionan con la familiaridad de dicho estímulo, es decir, cuando se le da un sabor nuevo al animal, la concentración extracelular de ACh incrementa y cuando ese sabor se va haciendo familiar tras varias presentaciones, la liberación de ACh va disminuyendo (Miranda *et al.*, 2000). Otros estudios han puesto en evidencia el tipo de receptores colinérgicos que están participando a través de manipulaciones farmacológicas, por ejemplo, al microinyectar en la CI escopolamina, un antagonista no selectivo de los receptores metabotrópicos de ACh (llamados muscarínicos) antes de la adquisición del aprendizaje de aversión, afecta negativamente la formación de este aprendizaje y los animales no aprenden que el consumo de ese sabor no es seguro (Ferreira *et al.*, 2002). Los mismos efectos se obtuvieron cuando se microinyectó un antagonista específico de los receptores muscarínicos post-sinápticos, la pirenzepina, pero no se obtuvo ningún efecto con el antagonista de los receptores muscarínicos pre-sinápticos, AFDX 116 (Ramírez-Lugo *et al.*, 2003) permitiendo conocer con mayor detalle los subtipos de receptores involucrados. De manera que la participación de los receptores muscarínicos post-sinápticos en CI se ha relacionado a las primeras etapas de la formación de la memoria gustativa, sobre todo con el procesamiento del estímulo gustativo, puesto que si se inyecta escopolamina después de la presentación del sabor nuevo o tras la inducción del malestar gástrico (Ferreira *et al.*, 2002) y antes de la prueba

¹ La microdiálisis es una técnica que, en este caso, permite obtener muestras de los neurotransmisores que se liberan en una estructura cerebral; se comentan más detalles en la parte experimental.

de aprendizaje (Berman *et al.*, 2000) no tiene efecto sobre el CAS, es decir, los animales logran recordar que el sabor está relacionado con malestar gástrico.

Empleando otro paradigma para el estudio del aprendizaje gustativo, como lo es la atenuación de la neofobia (AN), se obtuvieron evidencias que apoyan el papel del sistema colinérgico en el procesamiento del estímulo gustativo; ya que cuando fueron bloqueados los receptores muscarínicos con escopolamina antes de dar un sabor nuevo, la siguiente vez que fue presentado el sabor, los animales lo consumieron como si fuera desconocido, es decir, restringieron dicho consumo (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Junto con el sistema colinérgico, el sistema glutamatérgico y su papel en la formación del aprendizaje gustativo han sido de los más estudiados; se piensa que estos dos sistemas interactúan en la CI para integrar la señal producida por el estímulo gustativo y la producida por el malestar gástrico donde se propone que la activación de los receptores muscarínicos por la liberación de ACh al dar un sabor nuevo, inician una serie de cambios intracelulares en la CI, como la inducción de la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor tipo NMDA, fosforilación que disminuye después de varias presentaciones del mismo sabor (Rosenblum *et al.*, 1995). Esta fosforilación de NR2B podría facilitar la respuesta a la liberación glutamatérgica debida a la llegada del malestar gástrico (ver más adelante), contribuyendo así a la representación de un sabor aversivo (Bermúdez-Rattoni, 2004).

2.3 Sistema de neurotransmisión glutamatérgico.

El L-glutamato² es el principal neurotransmisor excitador del SNC y juega un papel vital en la transmisión sináptica (proceso por el cual las neuronas se comunican) de tipo excitatoria, donde un impulso eléctrico en la neurona causa un influjo de iones calcio y la subsecuente liberación de un neurotransmisor desde la presinápsis; el neurotransmisor se difunde a través del espacio sináptico y estimula la siguiente neurona al interactuar con los receptores en la post-sinápsis.

El glutamato actúa a través de canales iónicos activados por ligando (receptores ionotrópicos) y receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos). Los receptores ionotrópicos para glutamato están subdivididos en tres grupos: AMPA, NMDA y Kainato basados en diferencias farmacológicas tomando su nombre a partir de las moléculas que actúan como agonistas específicos (AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; NMDA, N-metil-D-aspartato y kainato). Los receptores metabotrópicos (mGlu) se subdividen en tres grupos de acuerdo a la similitud de su secuencia de aminoácidos, farmacología y mecanismos intracelulares de señalización. Los mGlu I, se encuentran acoplados a proteínas G_p, las cuales activan fosfolipasa C (FLC) y los mGlu II y III acoplados a proteínas G_s, que activan adenilato ciclasa (AC) (fig. 5), (Siegal *et al.*, 1999).

La actividad glutamatérgica ha sido implicada en aprendizaje y memoria en algunas estructuras cerebrales, como corteza peririnal (Winters *et al.*, 2005), tálamo

² L-glutamato es el isómero que se encuentra naturalmente en los sistemas biológicos, y de ahora en adelante al mencionar glutamato me estaré refiriendo a la configuración L del mismo.

(Zhang *et al.*, 2005), hipocampo (Naie *et al.*, 2005), amígdala (Linn *et al.*, 2005) y núcleo accumbens (Ferretti *et al.*, 2005). En la CI se ha demostrado la participación del glutamato principalmente en la formación de la memoria de aversión, donde tras la inducción del malestar gástrico por medio de la administración de cloruro de litio (LiCl) vía intraperitoneal se observa un incremento pequeño, pero significativo de glutamato extracelular en la estructura antes mencionada (Miranda *et al.*, 2002). Adicional a lo anterior, se cuenta con evidencia de que se produce un CAS moderado al microinyectar glutamato directamente en CI tras la presentación de un estímulo gustativo (Ramírez Lugo *et al.*, comunicación personal) y que al microinyectar en esta estructura un antagonista competitivo de los receptores tipo NMDA, el ácido DL-2-amino-5-fosfovalérico (AP5) tras la presentación del inductor del malestar gástrico no se produce CAS (Ferreira *et al.*, 2002); ésto nos habla del papel del glutamato como parte de la señalización del malestar gástrico que es uno de los estímulos necesarios para la formación de la memoria gustativa de aversión. Hasta el momento, el seguimiento de la liberación de glutamato que ha proporcionado la información existente al respecto en CI se ha dado cada 15 minutos, que es el tiempo que toma recolectar el volumen de muestra requerido para realizar el análisis del contenido de glutamato con ayuda de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography). Sin embargo existe evidencia de que los cambios extracelulares en la señal glutamatérgica relacionados a la formación del CAS, en otras estructuras cerebrales, se dan en intervalos de tiempo muy cortos, de menos de un minuto (Tucci *et al.*, 1998); de manera que es necesaria una mejor resolución temporal en el monitoreo de la concentración extracelular de glutamato para estudiar con mayor detalle los procesos que se llevan a cabo durante la formación de la memoria gustativa.

2.4 Sistema de neurotransmisión noradrenérgico.

La norepinefrina (NE) forma parte de los neurotransmisores del grupo de las catecolaminas y tiene acciones inhibitoras o excitadoras dependiendo de los receptores adrenérgicos involucrados. Éstos pueden clasificarse en dos tipos: receptores α y receptores β . Los α se subdividen en $\alpha 1$, localizados en la postsinapsis y están acoplados a proteínas Gp, que activan FLC, y $\alpha 2$, localizados en la presinapsis, acopladas a proteínas Gi, es decir inhiben la actividad de la AC. Los β se subdividen en $\beta 1$, de localización postsináptica que activan AC a través de la proteína Gs a la cual se acoplan, y $\beta 2$, que se encuentran tanto pre como postsinápticamente y también estimulan AC (fig. 5), (Siegal *et al.*, 1999).

En el sistema nervioso central, la NE está involucrada en varios procesos fisiológicos como regulación de los ciclos de sueño-vigilia, atención, ansiedad y aprendizaje y memoria (Robbins & Everitt, 2000). Respecto a este último se piensa que el sistema noradrenérgico participa en la adquisición y consolidación de la memoria de eventos emocionales o aversivos (Murchinson *et al.*, 2004) por lo que puede estar implicada en cambios plásticos en la función sináptica a largo plazo (Robbins & Everitt, 2000).

Los estudios realizados hasta el momento para determinar el papel del sistema noradrenérgico en la formación de la memoria gustativa son escasos, se ha descrito que este sistema de neurotransmisión responde a la presentación de un estímulo gustativo nuevo ya que las neuronas del locus coeruleus se activan con la exposición a estímulos desconocidos (Robbins & Everitt, 2000). Particularmente en el aprendizaje gustativo de

aversión, se ha visto que al lesionar la CI antes de la adquisición del CAS con una neurotoxina catecolaminérgica (6-hidroxidopamina)³, la formación del CAS se ve afectada (Fernández *et al.*,1993). Más específicamente la microinyección de propanolol, un antagonista β -adrenérgico, en esta estructura antes de la adquisición, también afecta la formación de la memoria gustativa de aversión indicando que las catecolaminas, entre ellas, la noradrenalina, son necesarias para este tipo de aprendizaje (Berman *et al.*, 2000). Dado que estas manipulaciones farmacológicas se han hecho previas a la adquisición, no permiten discernir sobre qué etapa de la formación de la memoria está participando la señal noradrenérgica en la CI ni si interviene en el procesamiento de la información gustativa o visceral.

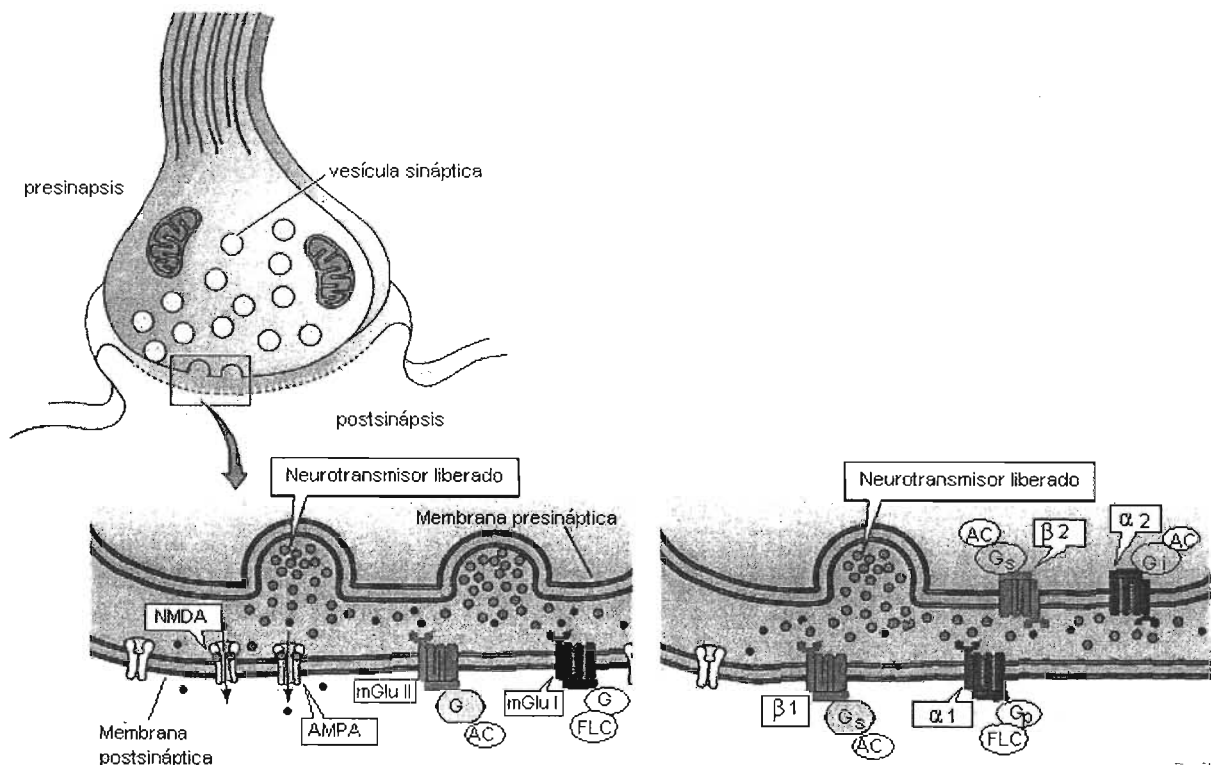


Fig. 5. Esquema de dos sinapsis donde se muestran los tipos de receptores glutamatergicos y noradrenérgicos. Ver texto para mayor detalle. Modificada de Siegal, 1999.

³ La 6-hidroxidopamina elimina a las neuronas que emplean alguna catecolamina como su neurotransmisor.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO

Se cuenta con evidencias acerca de la participación tanto del sistema glutamatérgico como del noradrenérgico dentro de la CI en la formación de la memoria gustativa de aversión; si bien el papel del glutamato en la señalización del malestar gástrico ha sido evaluado a través de estudios farmacológicos y de liberación del neurotransmisor *in vivo*, hasta el momento, los cambios en la liberación se han observado mediante monitoreos de fracciones que comprenden 15 minutos ya que la cuantificación se ha llevado a cabo con ayuda de HPLC y el volumen mínimo de muestra requerido es de 20-30 μL ; bajo estas condiciones, si se da un cambio de liberación en un intervalo de tiempo muy pequeño, esta respuesta se diluirá dentro del tiempo de colecta de la fracción haciéndola parecer menor de lo que realmente es, de modo que empleando la electroforesis capilar como herramienta para la cuantificación de los neurotransmisores de interés, por requerir un volumen mínimo de muestra, será posible dar un seguimiento más fino del fenómeno obteniendo muestras en intervalos más cortos, lo que permitirá proporcionar una mejor descripción del mismo.

Con respecto a la norepinefrina, no existen datos acerca de su cinética de liberación asociada a los estímulos que llevan a la formación de la memoria gustativa de aversión ni en qué etapa de la misma está involucrada; por lo que se desea conocer cómo está participando este sistema de neurotransmisión en dicha formación de la memoria a través del estudio de cambios en la concentración extracelular de norepinefrina en la CI; además de que hasta el momento no existen estudios donde se cuantifique

norepinefrina y glutamato simultáneamente, desaprovechando las ventajas que esto implica.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la liberación de glutamato y norepinefrina en muestras de líquido cefalorraquídeo de rata obtenido de la CI por medio de microdiálisis en libre movimiento durante la exposición a dos estímulos cuya asociación da lugar a la formación de la memoria gustativa de aversión, analizando la posible participación de estos neurotransmisores en su señalización.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar de manera simultánea en la muestra la concentración de glutamato y norepinefrina durante la exposición a un estímulo gustativo nuevo para la rata como es una solución de sacarina al 0.1%.
- Cuantificar de manera simultánea en la muestra la concentración de glutamato y norepinefrina durante un estímulo visceral que corresponde a la inducción de malestar gástrico por medio de una inyección intraperitoneal de LiCl.
- Disminuir al mínimo el tiempo de recolección de la fracciones de muestra para dar un seguimiento más detallado de la liberación de los neurotransmisores de interés.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. Animales

Se emplearon 20 ratas Wistar machos de 90 días de nacidas y 270 - 300 g de peso al momento de la cirugía, se colocaron en cajas individuales en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular bajo un ciclo de 12 horas luz/obscuridad con alimento y agua *ad libitum* excepto en los procedimientos experimentales (ver más adelante). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el reglamento en materia de Salud (Secretaría de Salud de México) y con aprobación del comité de cuidado animal local del Instituto de Fisiología Celular a cargo del bioterio.

2. Implantación de cánulas guía.

El objetivo de este procedimiento quirúrgico es colocar un aditamento intracraneal que permite la correcta localización de la membrana de microdiálisis en la estructura que se desea estudiar el día del experimento. Los animales fueron anestesiados con ketamina a una dosis de 84 mg/kg (Anesket, PiSA agropecuaria, México) y xilacina (Procin, PiSA agropecuaria, México) a una dosis de 0.4 mg/kg vía intraperitoneal y colocados en un aparato estereotáxico⁴ similar al que se observa en la figura 6A (Stoelting 51600, Illinois, E.U.A.); posteriormente se inyectó xilocaína en el área de la cabeza para disminuir el sangrado al retirar la piel que cubría el cráneo. El lugar de implantación de la cánula guía

⁴ El aparato estereotáxico permite la correcta colocación de la cabeza del animal y el acceso al cerebro mediante un sistema de barras calibradas. Este instrumento se basa en el hecho de que es posible predecir la localización de una estructura cerebral a partir de puntos de referencia externos, visibles cuando el investigador sitúa al animal en el aparato esterotáxico y practica un pequeño corte en la piel que recubre el cráneo, hasta que este queda expuesto.

se determinó de acuerdo a coordenadas obtenidas del atlas Paxinos⁵ (fig. 6B) donde el punto de referencia antero-posterior (AP) es la unión de las suturas de los huesos craneales, llamada Bregma, la línea media sagital como referencia lateral (L) y la superficie del cráneo como la referencia de profundidad (DV), (fig. 6C).

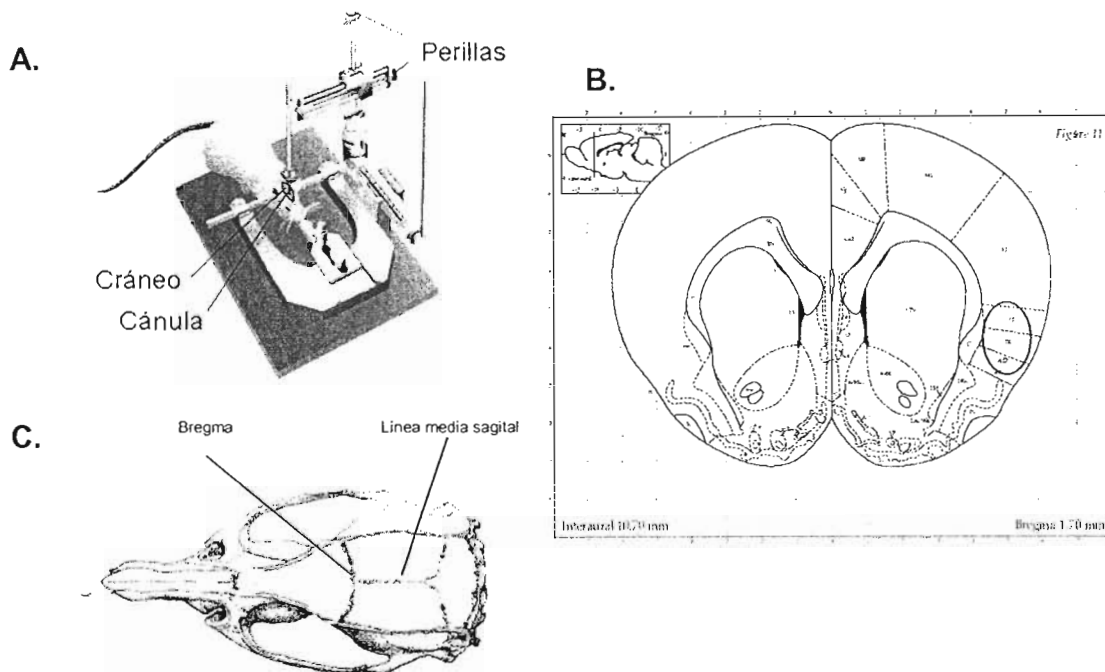


Fig. 6. (A) Esquema del aparato estereotáxico, (B) Sección coronal correspondiente a un atlas estereotáxico del cerebro de rata donde se remarca la localización de la CI, (C) Imagen del plano superior de un cráneo de rata, observándose la línea media sagital y el punto de referencia Bregma (A) y (B) modificados de <http://www.us.es/dfba/programas/practicas/TecExpFisiolAnimal-P1.pdf> y (C) Paxinos & Watson, 1998.

Las coordenadas empleadas para CI fueron AP = +1.2 mm, L = + 5 mm y DV = - 4.5 mm. Tras la implantación de la guía cánula, ésta se sujetó al cráneo con acrílico dental y dos tornillos. Por último se aplicaron antibióticos tópicos para prevenir infección del área.

⁵ El atlas estereotáxico es un conjunto de dibujos esquemáticos donde se representan secciones seriadas del cerebro de una determinada especie animal. Se suelen presentar secciones coronales (frontales o transversales), sagitales (o laterales) y horizontales.

3. *Habitación a la cámara de microdiálisis.*

Después de la cirugía los animales se recuperaron en sus cajas individuales durante cinco días; transcurrido este tiempo fueron privados de agua por 24 horas y luego colocados individualmente por cinco días durante cinco horas (10:00 a.m. a 3:00 p.m.) dentro de la cámara de microdiálisis correspondiente (Bioanalytical systems, Inc., E.U.A.), como se muestra en la figura 7A, donde se acostumbraron a beber 10 mL de agua de una probeta graduada en periodos de 15 minutos al día. Por la tarde, estando los animales en el bioterio, se les daba acceso a 20 mL más de agua para hidratarlas. Durante su estancia en la cámara de microdiálisis los animales fueron manipulados y habituados al contacto frecuente del experimentador.

4. *Microdiálisis en libre movimiento.*

Esta técnica permite monitorear la liberación extracelular de neurotransmisores en una estructura en particular; el principio de la microdiálisis se basa en la difusión de las moléculas a través de poros de diámetro pequeño en una membrana semipermeable unida a una sonda constituida de dos tubos concéntricos (fig. 7B); al tubo de entrada se conecta una bomba de perfusión que infunde líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 2.5 mM, NaHCO_3 19 mM, Glucosa 3.3 mM), éste se equilibra con el fluido en el exterior por difusión en ambas direcciones, como se esquematiza en la figura 7C, y así el LCRA recuperado por la tubería de salida contiene los neurotransmisores que lograron atravesar la membrana; de manera que un análisis cuantitativo de las moléculas recolectadas en las fracciones de microdializado refleja su patrón de liberación temporal en el fluido extracelular (Orlowska-Majdak, 2004; Ungerstedt, 1991).

La recuperación de sustancias del fluido extracelular depende de varias condiciones como la longitud de la membrana, la velocidad de perfusión, la difusión de cada sustancia a través de la membrana y en menor proporción a las propiedades de la membrana (Ungerstedt, 1991).

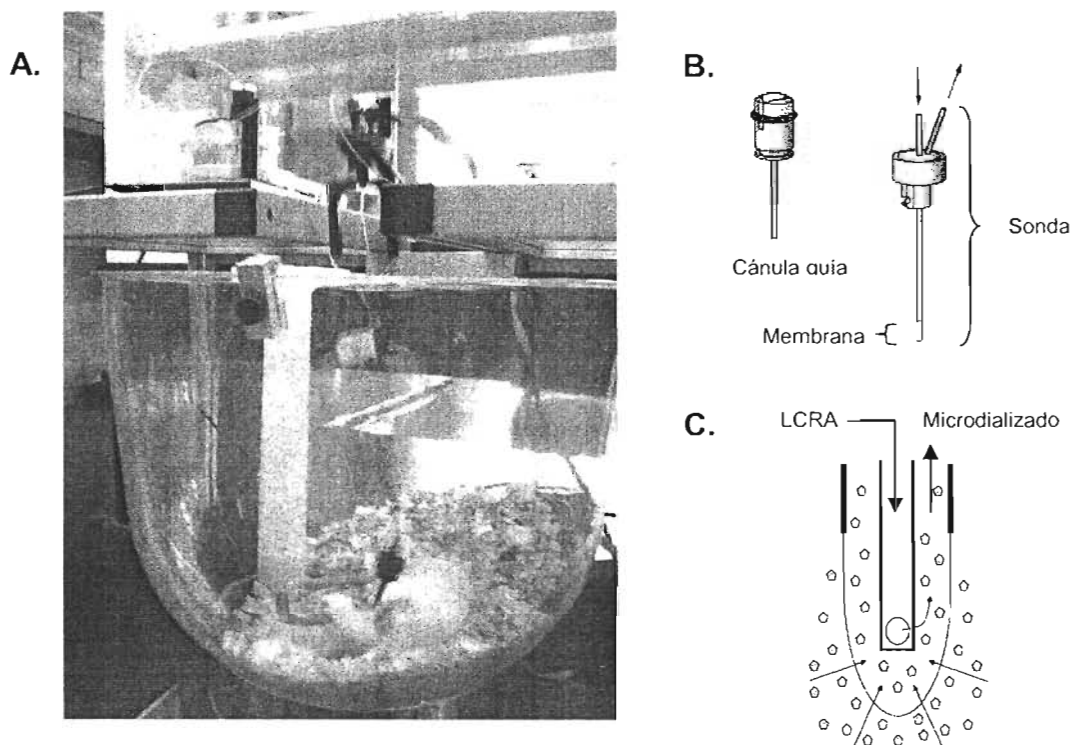


Fig. 7. (A) Difusión de las moléculas a través de la membrana de microdiálisis; (B) Fotografía del procedimiento de microdiálisis en libre movimiento donde se observa en la parte superior derecha la bomba con las jeringas que contienen LCRA y en la parte superior izquierda el colector de las fracciones de microdializado; la rata se encuentra sujeta por un gancho del cuello que gira cuando la rata se mueve para evitar que las tuberías de entrada y salida se enreden; (C) Cánula guía y sonda de microdiálisis.

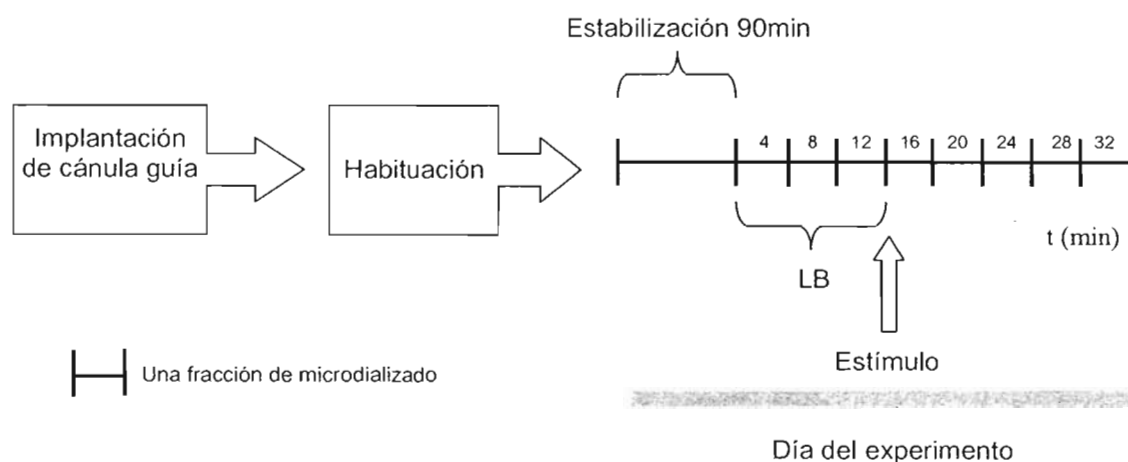
Para alcanzar el objetivo propuesto se realizaron experimentos de microdiálisis en libre movimiento separando las ratas en cuatro grupos:

- 1) SAC (n=5), Consumo de 10 mL de una solución de sacarina sódica 0.1 %. La finalidad de este grupo fue conocer la respuesta de liberación glutamatérgica y noradrenérgica en CI ante un estímulo gustativo nuevo.

- 2) AGUA (n=5), Consumo de 10 mL de agua. Este grupo correspondió al control del anterior ya que las ratas se encontraban en las mismas condiciones experimentales siendo la única variable la presencia de un sabor nuevo en el caso del grupo SAC.
- 3) LiCl (n=5), Inyección intraperitoneal de LiCl 0.4 M (7.5 mL/kg). La finalidad de este grupo fue conocer la respuesta de liberación glutamatérgica y noradrenérgica en CI ante la inducción de un malestar gástrico.
- 4) NaCl (n=5), Inyección intraperitoneal de NaCl 0.4 M (7.5 mL/kg). Este grupo correspondió al control del anterior ya que las ratas se encontraban en las mismas condiciones experimentales siendo la única variable la inyección de una solución salina que no produce un CAS tan evidente como el LiCl a la misma concentración y dosis.

El día del procedimiento experimental la sonda de microdiálisis fue perfundida a una velocidad de 2 μ L/min por 30 min con LCRA filtrado (membrana de filtración de 0.20 μ m) a temperatura ambiente con ayuda de una microbomba (CMA/100 pump) conectada a través de tubería de propileno etileno fluorinado para eliminar el glicerol en el cual se conserva la membrana. Tras verificar la ausencia de burbujas en el sistema se disminuyó la velocidad de perfusión a 1 μ L/min y se le colocó a la rata la sonda (BAS, Bioanalytical systems, INC) con una membrana de 3 mm de largo. Los primeros 90 minutos de recolección fueron descartados y después se recolectaron muestras cada 4 minutos recibiendo el microdializado en tubos tipo eppendorf de 200 μ L que contenían 1 μ L de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25 mM, Na₂EDTA 0.27 mM, ácido acético 0.1 M), las fracciones fueron inmediatamente guardadas en el ultracongelador a - 80 °C hasta el momento del análisis.

Para establecer la línea basal de liberación (LB) se recolectaron tres fracciones tras la cuales se dio el estímulo correspondiente: a las ratas de los grupos SAC y AGUA se les dio acceso a 10 mL de sacarina 0.1% o agua, permitiéndoles beber durante 12 minutos, es decir durante la recolección de tres fracciones; a las ratas de los grupos LiCl y NaCl se les aplicó una inyección intraperitoneal de LiCl 0.4 M o de NaCl 0.4 M, y se continuaron las recolecciones durante 20 minutos más, (ver esquema 1).



Esquema 1. Protocolo experimental que incluye la implantación de la cánula guía, habitación de las ratas a la cámara de microdialisis y el proceso general de obtención de muestras de microdializado. LB = línea basal.

5. *Análisis de las muestras.*

5.1. Cuantificación de glutamato y norepinefrina por electroforesis capilar.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica instrumental de separación, la cual permite la identificación y cuantificación de los analitos una vez separados al acoplarse al detector adecuado. La separación en EC se basa en la migración de especies cargadas que se encuentran disueltas o suspendidas en una solución electrolítica dentro de un tubo capilar de diámetro muy pequeño al aplicar un voltaje, (fig.8) (Landers *et al.*, 1997).

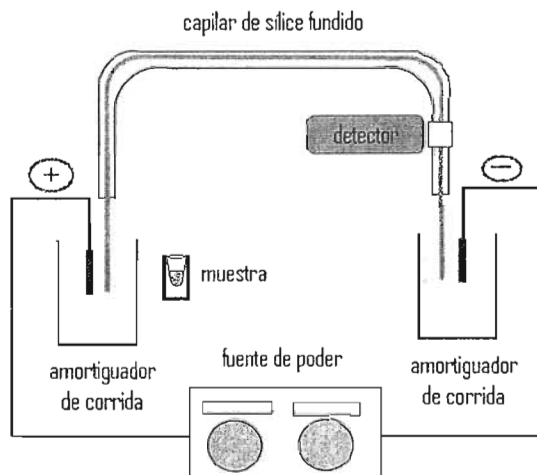


Fig. 8. Esquema de la instrumentación básica de un equipo de electroforesis capilar.

Dada la complejidad de la muestra biológica en cuanto al gran número de moléculas que pueden estar presentes fue necesario implementar un método que permitiera separar, identificar y cuantificar simultáneamente los niveles de glutamato y norepinefrina presentes en el microdializado. Puesto que una de las grandes ventajas de emplear EC como herramienta para el análisis es que se requiere un volumen muy pequeño de muestra comparado con los 20 o 30 μL requeridos para el análisis por HPLC, se buscó mejorar la resolución temporal del patrón de liberación de las moléculas de interés al disminuir el tiempo de recolección de las fracciones hasta donde el método analítico lo permitiera, es decir, hasta recolectar el volumen mínimo de microdializado necesario para poder cuantificar los neurotransmisores antes mencionados. La respuesta a la detección de los compuestos se traduce en un pico dentro de una gráfica llamada electroferograma.

5.1.1 Desarrollo del método analítico y búsqueda de las condiciones óptimas para el análisis.

5.1.1.1 Procedimiento de derivatización.

Debido a que se requería una alta sensibilidad, el mejor sistema de detección a nuestro alcance era la detección por fluorescencia inducida por láser (DFIL), la cual se basa en hacer reaccionar las moléculas de interés con un compuesto fluorogénico adecuado para las condiciones instrumentales de análisis, es decir, que el producto de la reacción de derivatización⁶ tenga una longitud de onda máxima de excitación ($\lambda_{\text{max exc}}$) acorde a la de excitación del láser de ionización de argón.

El compuesto fluorogénico elegido fue el FQ, ((3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído, Molecular Probes Invitrogen, E.U.A.) que reacciona en presencia de cianuro con el grupo amino primario de las moléculas presentes en la muestra por una reacción de Sustitución Nucleofílica (fig. 9), lo que permite derivatizar al mismo tiempo catecolaminas y aminoácidos.

⁶ La derivatización es una reacción que modifica la estructura de los compuestos a analizar para hacerlos susceptibles a cierto tipo de detección, en este caso DFIL.

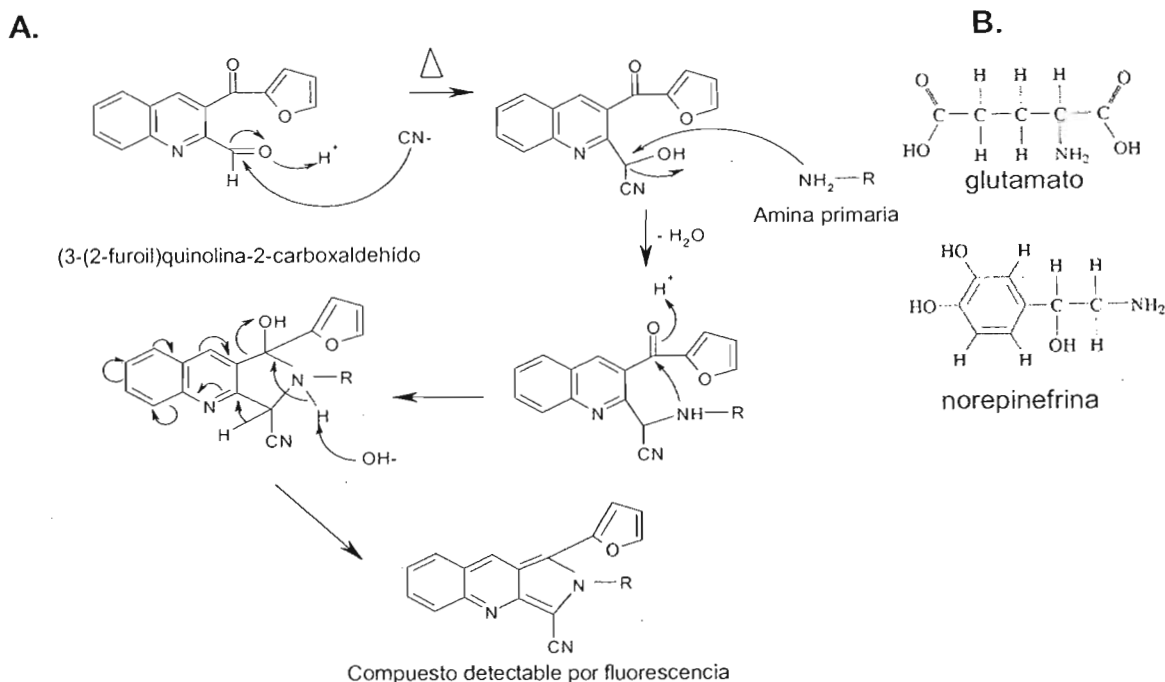


Fig. 9. (A) Reacción de derivatización para la formación de productos detectables por fluorescencia. (B) Estructura del glutamato y de la norepinefrina.

Los productos son moléculas hidrofóbicas insolubles en agua y con movilidades muy similares, por lo que fue necesario aplicar una modalidad de electroforesis capilar conocida como cromatografía electrocinética micelar (MEKC, por sus siglas en inglés, Micellar Electrokinetic Chromatography) que se basa tanto en principios cromatográficos como electroforéticos y con la cual se pueden separar conjuntamente compuestos iónicos y neutros en función de sus movilidades electroforéticas y su partición entre una fase móvil y otra semiestacionaria compuesta por micelas.

Existen en la literatura varias referencias en las cuales se emplea el FQ para la detección de proteínas, péptidos y aminoácidos en diferentes tipos de muestras (Asermely *et al.*, 1997 ;Liu *et al.*, 1991;Liu *et al.*, 1990), sin embargo son escasas las referencias que indican el uso del FQ para el análisis de aminoácidos y catecolaminas simultáneamente

en muestras de microdializado (Chen *et al.*, 2001). Por este motivo fue necesario buscar las condiciones óptimas de reacción para analizar pequeños volúmenes de muestra sin diluir mucho su contenido de neurotransmisores durante el tratamiento. Dentro de los aspectos que se variaron estuvieron la temperatura y tiempo de reacción, concentración y volumen de KCN, cantidad de FQ, mínima cantidad necesaria de microdializado y proporción de metanol (MeOH)/agua (H₂O) en la matriz de reacción; ésta se tuvo que variar porque, como se mencionó, los productos de la derivatización son insolubles en agua y debió agregarse metanol en una proporción tal que no provocara la deformación de los picos durante la separación. La tabla 1 indica las diferentes condiciones que se probaron; se comenzó por explorar algunas recomendaciones del proveedor y otras encontradas en diferentes citas

Cantidad de microdializado		Concentración de KCN		Volumen de KCN		Cantidad de FQ		
4 μ L	8 μ L	25 mM	50 mM	2 μ L	4 μ L	100 nmol	200 nmol	350 nmol

Tiempo de reacción			Temperatura de reacción		Proporción %MeOH/%H₂O en la matriz de reacción		
40 min	60 min	80 min	Ambiente	40 °C	50/50	60/40	40/60

Tabla 1. Condiciones involucradas en la reacción de derivatización probando diferentes combinaciones de las mismas para optimizar el análisis de las muestras de microdializado. FQ = (3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído), KCN = cianuro de potasio, MeOH = Metanol.

El procedimiento de derivatización elegido consistió en lo siguiente: Alícuotas de 10 μ L de FQ 10 mM (100 nmol) fueron secadas al vacío (el reactivo se encontraba disuelto en metanol); se agregaron 2 μ L de KCN 25 mM, los 5 μ L presentes en el tubo eppendorf de recolección (4 μ L de microdializado y 1 μ L de mezcla antioxidante) y 1 μ L

de estándar interno (O-metil-L-treonina 7.5 mM), la mezcla se hizo reaccionar en la obscuridad por 40 min a 40 °C en un baño termostatzado, inmediatamente después se colocaron los tubos en hielo para parar la reacción.

5.1.1.2 Separación y detección.

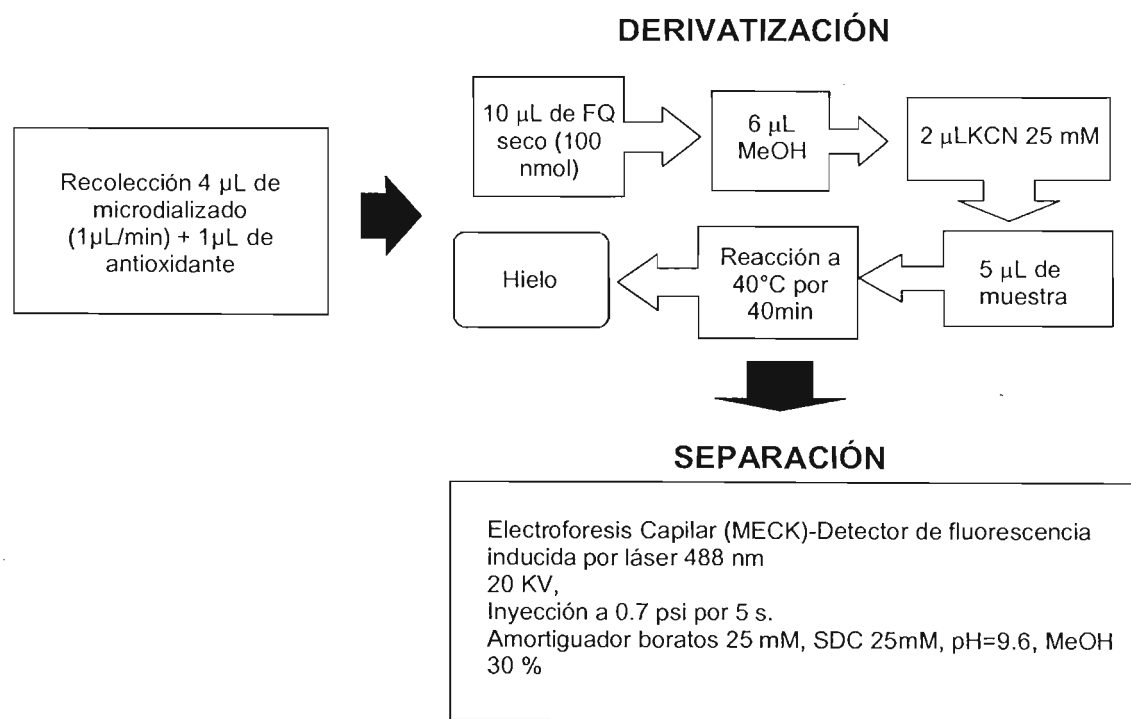
Como se mencionó antes, se aplicó la modalidad de MEKC para separar los compuestos derivatizados; ésta involucra la adición de un surfactante en el amortiguador de corrida para la formación de micelas que constituyen la fase semiestacionaria por la cual tienen afinidad los productos de la reacción de derivatización. Para hacer una separación más eficiente se varió la naturaleza de la fase acuosa con la adición de un disolvente orgánico en el amortiguador de corrida que permitió modificar la partición de los compuestos derivatizados y mejorar su resolución. En la tabla 2 se pueden ver también otras variables que se exploraron para este fin, como la presión de inyección, el voltaje de separación y la longitud del capilar al detector que influyen en la separación de los compuestos, la cual se hizo en un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ Glycoprotein system.

Tipo de surfactante		Concentración de surfactante		Modificador orgánico		% Modificador orgánico		
SDS	SDC	25 mM	35 mM	ACN	MeOH	10	27.5	30

pH del amortiguador		Presión de inyección		Voltaje de separación		Longitud del capilar al detector		
9.6	9.3	0.5 psi	0.7 psi	20 kV	16 kV	30 cm	40 cm	50 cm

Tabla 2. Condiciones involucradas en la separación de los compuestos derivatizados probando diferentes combinaciones de las mismas para optimizar el análisis de las muestras de microdializado. SDS = duodecilsulfato de sodio, SDC = deoxicolato de sodio, ACN = Acetonitrilo, MeOH = Metanol.

El amortiguador de corrida empleado para la separación de los neurotransmisores de interés contenía boratos 35mM, deoxicolato de sodio (SDC) 25mM, 30% de metanol grado HPLC, pH final 9.6. La inyección fue hecha hidrodinámicamente aplicando 0.5 psi (pounds per square inch, libras por pulgada cuadrada) de presión durante 5 s en el contenedor de la muestra para llenar una porción del capilar (sílica fundida, 75 μ m de diámetro interno y 40 cm de largo) y la separación se hizo aplicando una corriente de 16 kV. Para la detección de los compuestos se empleó DFIL con un láser de ionización de argón con luz a 488 nm (Beckman Coulter). La fluorescencia fue filtrada con un filtro de paso de banda centrado a 590 nm y detectado por un tubo fotomultiplicador; la respuesta de detección para cada compuesto apareció como un pico dentro de una gráfica llamada electroferograma. El resumen del método analítico se presenta en el esquema 2.



Esquema 2. Resumen del análisis de las muestras de microdializado para la cuantificación de glutamato y norepinefrina.

5.1.1.3 Cuantificación.

Al obtener las condiciones adecuadas de análisis para cuantificar glutamato y norepinefrina en los microdializados se utilizó una curva patrón de 6 puntos para cada compuesto de interés (Anexo 1). Tanto a los estándares como a las muestras se les añadió un estándar interno (*O*-metil-*L*-treonina 7.5 mM), un aminoácido que no se encuentra naturalmente en la muestra y que sirve como referencia para corregir variabilidad en la inyección de la muestra y en la reacción de derivatización; el área bajo la curva de los picos generados en el electroferograma fue interpolada para obtener la concentración correspondiente. Todos los resultados del análisis se convirtieron a porcentaje de línea basal de liberación ($\% \text{ LB} = \text{fracción} \times 100 / \text{promedio de las tres primeras muestras}$).

6. Histología

Un día después de finalizar el experimento de microdiálisis los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos transcárdialmente con solución salina isotónica para retirar la sangre del cerebro, el cual fue retirado y colocado en una solución de paraformaldehído al 4 %, posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa al 2% y conservados a 4 °C hasta ser cortados en secciones coronales de 50 µm de grosor a través de las áreas circundantes a la inserción de la sonda. Por último los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo para observar con el microscopio si la localización de la membrana era correcta.

7. Análisis estadístico.

Todos los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar. Para el análisis estadístico se empleó una t de Student no pareada; un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa StatView versión 4.5.

IV. RESULTADOS

1. Verificación de la localización de la membrana y de la cánula guía

De acuerdo a la observación de los cortes histológicos, se eliminaron dos animales para el análisis estadístico, uno correspondiente al grupo al que se le dio sacarina 0.1% y otro correspondiente al grupo al que se le dio agua debido a que en estos casos la trayectoria de las cánulas guía no se localizó justo arriba de la CI y la membrana de microdiálisis no abarcó el área de la CI.

2. Liberación de glutamato durante la presentación de un estímulo gustativo.

Los datos indican que no hay diferencias entre las fracciones que comprenden la línea base de liberación en ambos grupos (no significativo, NS). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las fracciones el grupo control, al que se le dio agua (AGUA), y el grupo al que se le dio una solución de sacarina 0.1%. (SAC), es decir, la exposición a un estímulo gustativo no genera cambios en la liberación de glutamato en CI dentro del tiempo en el cual se monitoreó (fig. 10).

3. *Liberación de norepinefrina durante la presentación de un estímulo gustativo.*

Como se observa en la figura 11, al presentar la solución de sacarina se dio un incremento estadísticamente significativo de norepinefrina en las fracciones correspondientes a los 16 y 20 min de la cinética de liberación del grupo SAC, que son las que representan la respuesta tras el consumo del sabor nuevo ($t = -3.546$, $p < 0.05$ y $t = -2.486$, $p < 0.05$) con respecto al grupo AGUA, que no tuvo cambios. Esto indica que un estímulo gustativo nuevo produce cambios noradrenérgicos en CI, pero no así un estímulo familiar como el agua.

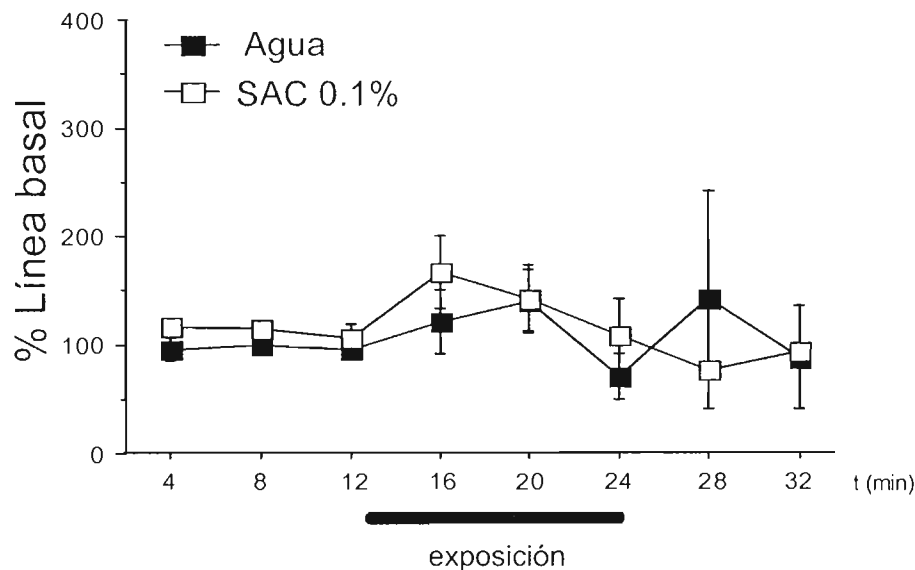


Fig. 10. Cinética de la liberación que muestra los cambios en el porcentaje de glutamato durante la presentación de una solución de sacarina al 0.1% y de agua. No se encontró diferencia significativa entre ambos grupos. Los datos se graficaron como porcentaje de línea basal de liberación y son expresados como la media $\pm$ error estándar. Los cuadros negros corresponden a la cinética de liberación de glutamato del grupo al que se le dio agua, los cuadros blancos corresponden a la cinética de liberación de glutamato del grupo al que se le dio sacarina 0.1%. La barra negra corresponde al tiempo de exposición al agua o a la sacarina. Para ambos grupos $n = 4$.

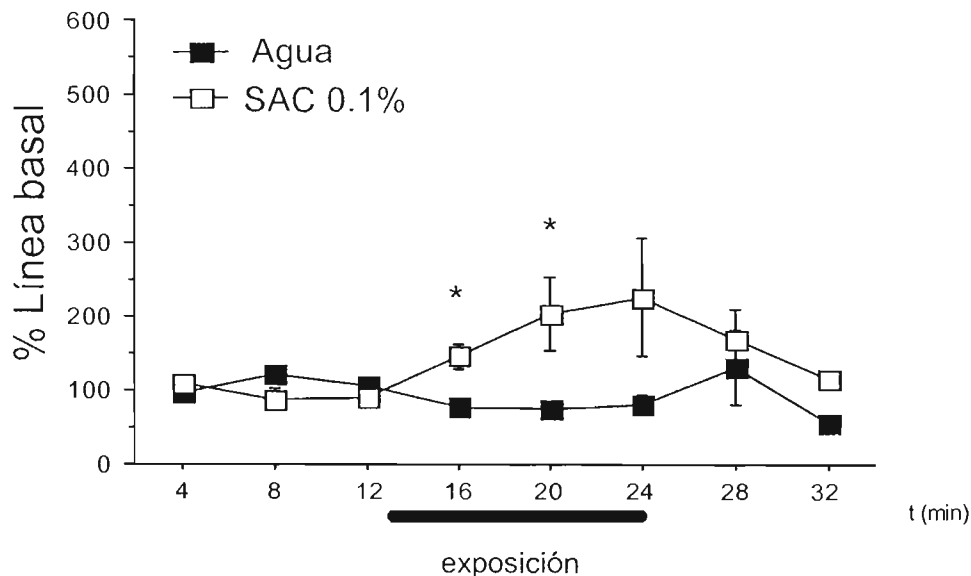


Fig. 11. Cinética de la liberación que muestra los cambios en el porcentaje de norepinefrina durante la presentación de una solución de sacarina al 0.1% y de agua. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las fracciones correspondientes a 16 y 20 min. Los datos se graficaron como porcentaje de línea basal de liberación y son expresados como la media $\pm$ error estándar. Los cuadros negros corresponden a la cinética de liberación de norepinefrina del grupo al que se le dio agua y los blancos al grupo al que se le dio sacarina 0.1%. La barra negra corresponde al tiempo de exposición al agua o a la sacarina. * $P < 0.05$. Para ambos grupos $n = 4$.

4. *Liberación de glutamato tras la inyección del inductor de malestar gástrico.*

La figura 12 nos muestra que cuando se aplicó la inyección de LiCl 0.4 M el glutamato incrementó alrededor del 350 % de la línea base de liberación, incremento que no se presentó en el grupo al cual se le inyectó NaCl 0.4 M. La diferencia entre los grupos es estadísticamente significativa en la fracción que corresponde a los 16 min, es decir la que indica la respuesta a la inyección de LiCl ($t=-4.251$, $p< 0.05$), lo que sugiere que la respuesta glutamatérgica en CI es debida al inductor de malestar gástrico específicamente puesto que la solución de sodio que no induce tal malestar no produce tal incremento.

5. *Liberación de norepinefrina tras la inyección del inductor de malestar gástrico.*

En el grupo al cual se le aplicó la inyección de LiCl 0.4 M la norepinefrina incrementó más del 400 % de la línea base de liberación y se presentó casi el mismo incremento de norepinefrina en el grupo al cual se le inyectó NaCl 0.4 M. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las fracciones de ambos grupos como se puede ver en la figura 13, lo que indica que la respuesta noradrenérgica debida a la inyección de LiCl no es específica y puede deberse a otros factores que se discutirán más adelante.

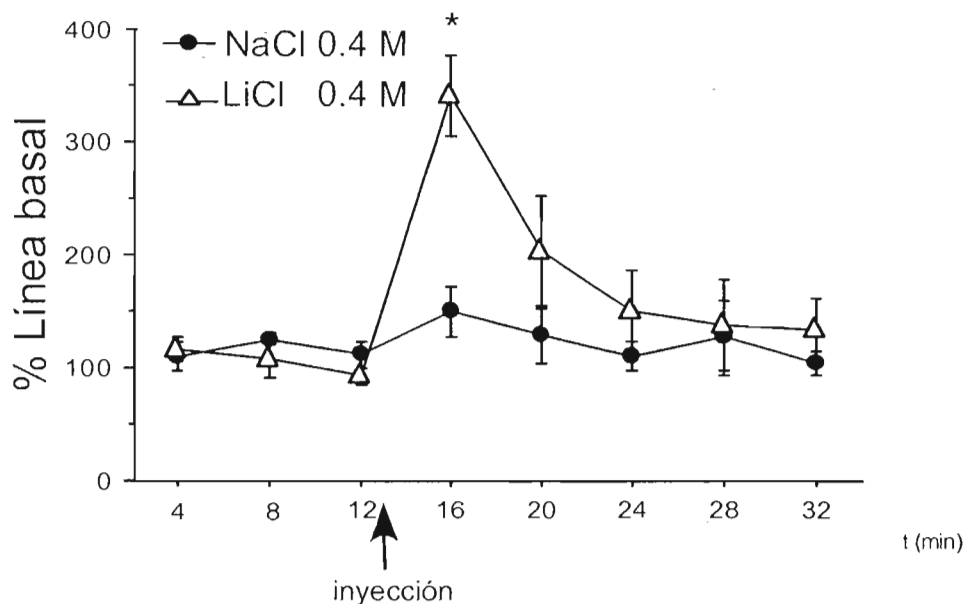


Fig. 12. Cinética de liberación que muestra los cambios en el porcentaje de glutamato tras la inyección de LiCl 0.4 M para un grupo y NaCl 0.4 M para otro. Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en la fracción que indica la respuesta a la inyección. Los datos se graficaron como porcentaje de línea basal de liberación y son expresados como la media $\pm$ error estándar. Los círculos negros corresponden a la cinética de liberación de glutamato del grupo al que se le inyectó NaCl 0.4 M (7.5 mL/kg) y los triángulos blancos al grupo al que se le inyectó LiCl 0.4 M (7.5 mL/kg); la flecha indica el momento de la inyección. * $P < 0.05$. Para ambos grupos $n = 5$.

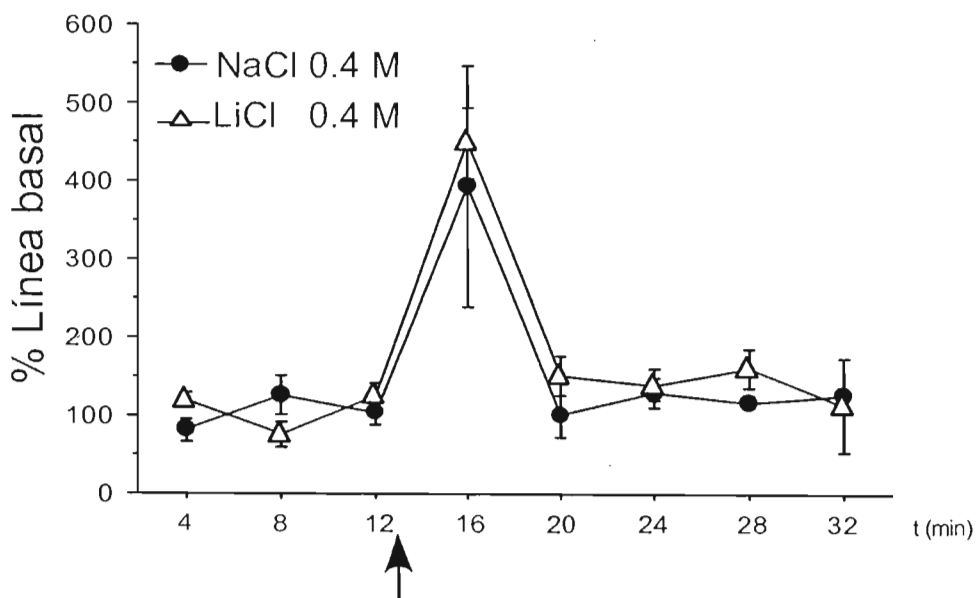


Fig. 13. Cinética de liberación que muestra los cambios en el porcentaje de norepinefrina tras la inyección de LiCl 0.4 M para un grupo y NaCl 0.4 M para otro. No se encontraron diferencias significativas entre los dos. Los datos se graficaron como porcentaje de línea basal de liberación y son expresados como la media $\pm$ error estándar. Los círculos negros corresponden a la cinética de liberación de glutamato del grupo al que se le inyectó NaCl 0.4 M (7.5 mL/kg) y los triángulos blancos al grupo al que se le inyectó LiCl 0.4 M (7.5 mL/kg); la flecha indica el momento de la inyección. * $P < 0.05$. Para ambos grupos $n = 5$.

V. DISCUSIÓN

La posibilidad de describir ciertos aspectos de la formación del aprendizaje gustativo de aversión a través de cambios en la liberación basal de neurotransmisores permite evaluar el papel de los mismos en la señalización de estímulos particulares, en este caso, del estímulo gustativo y del malestar gástrico, que al asociarse dan lugar al aprendizaje gustativo que resulta básico para la supervivencia de los animales, incluido el hombre. Con el paso del tiempo han surgido herramientas que nos ayudan a realizar estudios que se aproximan cada vez más a una representación real de lo que sucede en el cerebro; una de las herramientas mas útiles dentro de las neurociencias ha sido la microdiálisis en libre movimiento que se ha aplicado ampliamente en el estudio de la liberación de neurotransmisores conjuntamente con el análisis por medio de HPLC; sin embargo, las características de éste no han permitido, hasta el momento, una resolución temporal más detallada, como la conveniente para el estudio de la conducta y los cambios extracelulares relacionados a la misma. Por lo cual, el desarrollo de técnicas de cuantificación que permiten el análisis de pequeñas cantidades de muestra, como la electroforesis capilar, resultan muy útiles pero son escasas; de ahí la importancia de implementar una metodología cuya aplicación nos brinde la posibilidad de mejorar la resolución temporal, es decir, poder analizar fracciones obtenidas en intervalos más pequeños. Otra gran ventaja del método que se desarrolló y que está basado en la electroforesis capilar es que fue posible analizar simultáneamente y en la misma muestra varios neurotransmisores de interés, ya que se pudo cuantificar al mismo tiempo glutamato y norepinefrina. Este hecho no solo permitió disminuir el número de animales necesarios para la experimentación, sino que hizo posible ver la respuesta de liberación de estos neurotransmisores exactamente bajo las mismas condiciones.

Respuesta de liberación debida al estímulo gustativo.

La cinética de liberación de glutamato tras la exposición al estímulo gustativo muestra que no hay cambios significativos en la CI respecto a este neurotransmisor. Ésto concuerda con evidencias previas donde se monitorearon los niveles de glutamato en esta misma estructura durante la exposición a un estímulo gustativo nuevo (Miranda *et al.*, 2002). Sin embargo, era factible esperar cambios de liberación tras este estímulo puesto que hay evidencia de que la infusión de un antagonista de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA, como lo es el AP5, antes de la presentación del estímulo gustativo afecta la formación de la memoria gustativa de aversión a largo plazo (Ferreira *et al.*, 2002), lo cual indicaría actividad glutamatérgica al presentar el estímulo gustativo. Se pensaba que los posibles cambios de liberación relacionados al estímulo gustativo podrían llegar a detectarse debido a que el tiempo de recolección de las fracciones pudo disminuirse prácticamente cuatro veces (4 min) respecto al tiempo de recolección reportado en el trabajo de Miranda y colaboradores (2002), (15 min). Al no haber encontrado variaciones en este neurotransmisor, es de pensarse que la solución de sacarina empleada induce cambios indetectables por este método analítico o que realmente no hay un incremento de la actividad glutamatérgica. Una evidencia que apoyaría esto último es la proporcionada por Giovaninni y colaboradores (2001), donde no se observan modificaciones en la liberación de glutamato en la corteza prefrontal de ratas al colocarlas en un contexto espacial nuevo, ni cuando este contexto ya es familiar (Giovaninni *et al.*, 2001); lo que podría sugerir que el glutamato no participa en la señalización de la novedad de los estímulos. No obstante, para saber si ésto es cierto en el modelo de estudio del aprendizaje que nos ocupa, sería necesario estudiar la liberación de glutamato

presentando diferentes tipos de estímulos gustativos, así como ver si hay variaciones cuando estos estímulos se vuelvan familiares.

Dentro de la CI se ha visto una correlación entre la novedad del estímulo gustativo y la liberación de otro neurotransmisor, la acetilcolina (ACh), incrementando cuando el estímulo es nuevo y disminuyendo gradualmente conforme se vuelve familiar (Miranda *et al.*, 2000); interesantemente, según los resultados de la parte experimental, hay un incremento significativo de norepinefrina tras dar la solución de sacarina que aparentemente se mantiene durante 12 minutos y que no se presenta cuando el animal bebe agua. Este incremento puede obedecer a que el sistema noradrenérgico central participa en mecanismos de atención (Robbins *et al.*, 2000), como aquellos involucrados en la exposición a estímulos nuevos, además está comprobado que las neuronas del LC se activan como respuesta a la novedad de estímulos gustativos (Cole *et al.* 1998); recordemos que el LC tiene proyecciones directas a la CI (Saper *et al.*, 1982), y por lo tanto la activación de este núcleo noradrenérgico provocaría un aumento de norepinefrina en sus estructuras eferentes. Por otro lado, se ha dicho que la actividad noradrenérgica está implicada en ansiedad y estrés (Gray *et al.*, 1982; Redmond *et al.*, 1979) y que estos estados acompañan a situaciones en los que hay ambientes desconocidos (Robbins *et al.*, 2000). Es posible entonces que la respuesta noradrenérgica observada se deba a las implicaciones que tiene el hecho de consumir un alimento nuevo, es decir, el consumir poco del mismo porque no se saben las consecuencias postingestionales, lo que refleja una respuesta neofóbica (miedo a lo nuevo) que podría estar mediada por la actividad de este neurotransmisor y que podría depender de la intensidad del sabor o del tipo de sabor. Presumiblemente la actividad noradrenérgica en CI formaría parte del mecanismo

que permite enfocar la atención en eventos relevantes o en situaciones amenazantes como las que suponen ingerir un alimento desconocido.

Si bien, hay evidencias que muestran la participación directa de la norepinefrina en los mecanismos de la neofobia, los resultados respecto a su papel modulador suelen ser contradictorios y dependen de las condiciones experimentales bajo las que se llevó a cabo el estudio (Steketee, *et al.*, 1992); además de que no se cuenta con información a este respecto en la CI. De tal manera que el presente trabajo aporta nueva información con la ventaja que ofrece el monitoreo de la liberación por medio de microdialisis en libre movimiento donde el animal está en completa posesión de sus funciones, pero en condiciones controladas que permiten asegurarnos de que el único estímulo nuevo sea el gustativo. Para seguir estudiando en esta estructura el posible papel de la norepinefrina en la señalización de la novedad es necesario conocer si su concentración cambia en relación a la familiaridad del estímulo.

Respuesta de liberación debida a la inyección del inductor del malestar gástrico.

Los resultados de liberación muestran una respuesta glutamatérgica específica a la inducción del malestar gástrico dado que en las ratas a las cuales se les inyectó una solución equimolar de NaCl (0.4 M), que conductualmente no produce un CAS tan evidente como el LiCl a la misma concentración, no se observó una variación significativa en la liberación de glutamato. En un estudio previo se empleó una solución isotónica de NaCl (Miranda *et al.*, 2002) y la condición de NaCl 0.4 M no se había explorado antes para evaluar la respuesta glutamatérgica en CI, de manera que con este grupo control pudimos discernir claramente la respuesta provocada por una sustancia que produce náuseas y dolor gástrico de una que no lo hace. La aparición de toxicidad en el caso del

LiCl está relacionada con la concentración plasmática de litio y la toxicidad aguda se caracteriza por náuseas, diarrea, temblor y ataxia (Goodman *et al.*, 1991).

Dentro de los importantes antecedentes proporcionados por Miranda y colaboradores (2002) se reportó un incremento en los niveles de glutamato con la inyección de LiCl 0.4 M en la CI pero no se apreció tan alto (se reportó menor al 200% de la LB) como indican los resultados de esta tesis (mayor al 300% de la LB); de hecho, en ese trabajo el cambio observado no se hizo evidente en la fracción correspondiente a la respuesta debida a la aplicación de la inyección, como se aprecia en la cinética de liberación de la figura 12, sino 30 minutos después. En el presente trabajo, la disminución en el tiempo de recolección permitió observar cambios muy evidentes en esta estructura que revelan que hay un incremento de la actividad glutamatérgica en CI, hasta donde nos permitió ver la resolución temporal del método, en algún momento dentro de los 4 minutos siguientes a la inyección del inductor del malestar gástrico.

La razón de esta respuesta de liberación glutamatérgica se basa en las proyecciones anatómicas hacia la CI, que sugieren que esta región participa en la integración de la información visceral (Bures *et al.*, 1998), como se mencionó en la introducción, el núcleo talámico ventral posteromedial le envía proyecciones de tipo glutamatérgico, lo cual es trascendente dado que el tálamo constituye un relevo de la información gustativa y visceral que llega a la corteza (Saper *et al.*, 1982). Otra estructura del sistema límbico que envía proyecciones glutamatérgicas a la CI es la amígdala, cuya implicación en la formación del aprendizaje gustativo de aversión es de gran importancia, sobre todo en el procesamiento del malestar gástrico; una evidencia de esto es que su

inactivación funcional con TTX antes de la presentación del estímulo visceral atenúa significativamente la formación del CAS (Bermúdez, 2004).

Si bien es posible hacer la asociación entre el consumo de un alimento con dolor gástrico aunque el malestar llegue varias horas después de la ingestión (de 2-4 horas, Bermúdez, 2004), es de esperarse que una vez que se presenta el dolor, la señal que acompaña a éste llegue a la CI, donde está siendo integrada la información gustativa y la visceral, lo más pronto posible dada la importancia de que el animal aprenda que cierto alimento es dañino.

Son pocos los estudios que han ayudado a establecer qué neurotransmisores están involucrados específicamente en la señalización del malestar gástrico que se induce para el estudio del aprendizaje gustativo de aversión; por una parte, tenemos datos que indican el incremento de glutamato tras la entrada del estímulo visceral, y por otra, se ha visto que la inyección de glutamato en CI, tras haber dado una solución de sacarina, induce aversión moderada a ese sabor en una especie de imitación de la llegada del estímulo visceral antes mencionada (Ramírez-Lugo *et al.*, comunicación personal), lo cual sugiere que al menos parte de la señal que llega a CI debida al malestar gástrico es glutamatérgica. Sin embargo, dado que el glutamato aplicado exógenamente por sí solo no llega a inducir una aversión al sabor tan fuerte como la que provoca la inyección de LiCl, otros sistemas de neurotransmisión deben estar implicados.

Según los resultados de liberación de norepinefrina relacionada al estímulo visceral, la cantidad del neurotransmisor incrementó alrededor de 400% de la línea basal al realizar la inyección de LiCl 0.4 M, pero también aumentó prácticamente en la misma

medida cuando se le inyectó la solución de NaCl equimolar (0.4 M), lo cual reveló que la señal noradrenérgica en la CI dada por el malestar gástrico no es tan específica como en el caso del glutamato y dirige nuestra atención hacia las características que comparte la aplicación de las inyecciones. Una de ellas es la introducción de un volumen de solución hipertónica en la cavidad peritoneal, ya sea de sodio o de litio, que irrita principalmente el peritoneo parietal que es muy sensible y recubre las paredes del abdomen, y que está innervado por nervios aferentes somáticos y viscerales. La lesión o inflamación local del peritoneo parietal origina un espasmo muscular reflejo (Schwartz *et al.*, 1994) que indica una respuesta nociceptiva caracterizada en el animal por la presencia de contracciones abdominales que consisten en astringencia de los músculos laterales asociada a movimientos de los miembros posteriores o estiramiento de todo el cuerpo, (Feng *et al.*, 2003); otra característica común de las inyecciones aplicadas es la inserción de una aguja que podría causar molestia a nivel del peritoneo parietal.

El dolor generado que llega a través del nervio vago envía la información al NTS que proyecta directamente al LC (Hassert *et al.*, 2004), que como se mencionó es un importante núcleo noradrenérgico hacia la CI (Saper *et al.*, 1982). El gran incremento de norepinefrina como respuesta a la inyección de ambos tipos de solución probablemente se debe a que las neuronas del LC están especialmente activas durante estados de ansiedad, incluyendo la exposición a estímulos y ambientes estresantes o dolorosos (Robbins *et al.*, 2000), de manera que es posible que, siendo la CI una corteza visceral que integra este tipo de información, deba recibir una señal noradrenérgica que indique la llegada de un dolor relevante como el provocado al peritoneo parietal.

Dentro del modelo propuesto por Bermúdez-Rattoni (2004) donde integra la respuesta producida por el estímulo gustativo nuevo con la señal producida por la llegada del malestar gástrico, resalta la participación del sistema colinérgico a través de sus receptores muscarínicos en etapas tempranas de la formación de la memoria relacionadas al procesamiento del estímulo gustativo generando cambios intracelulares en la CI ligados a plasticidad sináptica ⁷ que parecen ser de importancia con respecto a la recepción de la señal glutamatérgica producida por el malestar gástrico (ver introducción). Un neurotransmisor que no había sido incluido en este modelo es la norepinefrina, los resultados que arroja esta tesis sugieren que el sistema noradrenérgico también está participando en el procesamiento del estímulo gustativo nuevo y es posible que la activación de los receptores adrenérgicos genere cambios intracelulares que contribuyan a la plasticidad sináptica en la CI relacionada al aprendizaje gustativo pero que aún no han sido tan ampliamente explorados con los ligados al sistema colinérgico; de manera que en este punto queda por explorar la participación de los diferentes tipos de receptores adrenérgicos y si su activación está involucrada en diferentes etapas de la formación de la memoria gustativa (adquisición, consolidación y evocación). Otro aspecto importante que los resultados de esta tesis pusieron en evidencia fue la relación de la norepinefrina en la CI con la inducción del malestar gástrico, que si bien, como se mencionó anteriormente, no es posible discernir con estos datos lo que el incremento de norepinefrina está señalizando específicamente, sí aporta nueva información que hace girar la atención hacia seguir investigando su posible participación. Después de todo, la noradrenalina ha sido implicada en el procesamiento y consolidación de memoria con “carga emocional”, es

⁷ El término plasticidad sináptica se refiere a la variabilidad de la fuerza de una señal transmitida a través de una sinápsis, algunos mecanismos involucran modificaciones covalentes de las proteínas sinápticas ya existentes, como la fosforilación, resultando en alteración de la función sináptica; otros mecanismos involucran la transcripción de genes y cambios en los niveles de proteínas importantes a nivel de sinápsis.

decir modelos de aprendizaje en los que se induce en los animales ansiedad, miedo y estados de alerta (Berman *et al.*, 2000) dentro de los cuales podría considerarse el condicionamiento aversivo a los sabores.

VI. CONCLUSIONES

El estudio de los cambios en la liberación de glutamato y norepinefrina durante el transcurso de estímulos particulares que formarán el aprendizaje gustativo de aversión en un animal en libre movimiento permitió evaluar la posible participación de dichos sistemas en la fisiología de la CI, que es una estructura fundamental para la formación del aprendizaje gustativo.

Estímulo gustativo:

- ☞ La exposición a un estímulo gustativo nuevo no genera cambios apreciables en la liberación de glutamato dentro de la CI.
- ☞ La exposición a un estímulo gustativo nuevo produce un incremento en la liberación de norepinefrina dentro de la CI, ya sea involucrando un proceso de atención debido a la novedad o a la generación de estrés debida a la propia novedad.

Malestar gástrico:

- ☞ La liberación de glutamato en CI incrementa como parte de la señalización del malestar gástrico específicamente.
- ☞ El papel de la norepinefrina en la señalización del estímulo visceral dentro de la CI no queda claro, ya que las respuestas de liberación observadas dan pie a nuevas preguntas para explicar con más detalle su participación en el aprendizaje gustativo.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Asermely KE, Broomfield CA, Nowakowski J, Courtney BC, Adler M (1997). Identification of a recombinant synaptobrevin-thioredoxin fusion protein by capillary zone electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B Biomed Sci Appl* 695, 67-75.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *Journal of Neuroscience*. 20(18):7017-23.
- Bermudez-Rattoni F, McGaugh JL. (1991a). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*. 549(1):165-70. (B)
- Bermudez-Rattoni F, Introini-Collison IB, McGaugh JL. (1991b). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(12):5379-82.
- Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 5(3):209-17.
- Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T, Conditioned Taste aversion, Memory of a special Kind; Oxford University Press, 1998; p.p. 41-43.

Chance, P., Learning and Behavior, 1999, Brooks/Cole Publishing Company, E.U.A.; p.p. 32, 33.

Chen Z., Wu J., Baker G.B., Parent M., Dovich N.J. (2001). Application of Capillary Electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and aminoacids in brain microdialysate and homogenate samples. *Journal of Chromatography A* (914): 293-298.

Cole BJ, Robbins TW. (1988). Lesions of the dorsal noradrenergic bundle simultaneously enhance and reduce responsivity to novelty in a food preference test. *Brain Research* (13): 325-349.

Escobar ML, Bermudez-Rattoni F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*. 852(1):208-212.

Feng Y, Cui M, Willis W. (2003). Gabapentin Markedly Reduces Acetic Acid-induced Visceral Nociception. *Anesthesiology*. 98(3):729-733.

Fernandez-Ruiz J, Miranda MI, Bermudez-Rattoni F, Drucker-Colin R. (1993). Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behavioral Neural Biology*. 60(3):189-191.

- Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez-Rattoni F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*. 16(6):1139-1145.
- Ferretti V, Florian C, Costantini VJ, Roullet P, Rinaldi A, De Leonibus E, Oliverio A, Mele A. (2005). Co-activation of glutamate and dopamine receptors within the nucleus accumbens is required for spatial memory consolidation in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 179(1):108-116.
- Gallo M, Roldan G, Bures J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*. 52(1):91-97.
- García J., KimmerlD.J., Koelling, R.A. (1955). Conditioned taste aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122: 157-158.
- Goodman y Gilman, Las Bases Farmacológicas de la terapéutica, 8ª ed., 1991, edit. Panamericana, México, p.p. 414-417.
- Gray JA, The Neuropsychology of anxiety, 1982, Clarendon Press, Oxford.
- Gutierrez H, Hernandez-Echeagaray E, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*. 89(3):751-758.

Gutierrez R, Tellez LA, Bermudez-Rattoni F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*. 17(8):1556-1562.

Harley CW..(2004). Norepinephrine and dopamine as learning signals. *Neural Plasticity*. 11(3-4):191-204.

Hassert DL, Miyashita T, Williams CL. (2004). The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdals. *Behavioral Neuroscience*. 118(1): 79-88.

<http://www.us.es/dfba/programas/practicas/TecExpFisiolAnimal-P1.pdf>

Kiefer SW, Leach LR, Braun JJ. (1984).Taste agnosia following gustatory neocortex ablation: dissociation from odor and generality across taste qualities. *Behavioral Neuroscience*. 98(4):590-608.

Landers James P., Handbook of Capillary Electrophoresis, 2a ed. 1997, CRC press, E.U.A.; p.p. 956-978

Linn CH, Lee CC, Huang YC, Wang SJ, Gean PW. (2005). Activation of group II metabotropic glutamate receptors induces depotentiation in amygdala slices and reduces fear-potentiated startle in rats. *Learning and Memory*. 12(2):130-137.

- Liu J, Cobb KA, Novotny M. (1990). Capillary electrophoretic separations of peptides using micelle-forming compounds and cyclodextrins as additives. *Journal of Chromatography* 519, 189-197.
- Liu JP, Shiota O, Novotny M. (1991). Capillary electrophoresis of amino sugars with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 63, 413-417.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20(3):445-468.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F. (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(17):11417-11422.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F. (2003) Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiology of Learning and Memory*. 80(3):211-222.
- Miranda MI, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F. (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*. 882(1-2):230-235.
- Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*;117(1):131-143.

- Naie K, Manahan-Vaughan D. (2005). Pharmacological antagonism of metabotropic glutamate receptor 1 regulates long-term potentiation and spatial reference memory in the dentate gyrus of freely moving rats via N-methyl-D-aspartate and metabotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *European Journal of Neuroscience*. 21(2):411-421.
- Ohara P.T., Granato A., Moallem T.M., Wang B., Tillet Y. Jasmin L. (2003) Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of Neurocytology*, 32, 131-141.
- Orlowska-Majdak M. (2004). Microdialysis of the brain structures: application in behavioral research on vasopressin and Oxytocin. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64: 177-188.
- Paxinos, G & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4a edición, Academic Press, New York.
- Ramirez-Lugo L, Miranda MI, Escobar ML, Espinosa E, Bermudez-Rattoni F. (2003). The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 79(2):184-93.
- Redmond DE, New and old evidence for the involvement of a brain norepinephrine system in anxiety, En: Phenomenology and treatment of Anxiety, 1979, Fann WG, Karacan I, Pokorny D, Williams RL, eds., New York; p.p. 153-203.

Robbins & Everitt; Central Norepinephrine Neurons and Behavior en Psychopharmacology – The Fourth Generation of Progress; American College of Neuropsychopharmacology, 2000. <http://www.acnp.org/>

Rosenblum, K. *et al.* (1995). Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92: 1157–1161

Saper CB. (1982). Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 210(2):163-173

Schwartz, Shires, Spencer, Principios de Cirugía, 6a ed., 1994, Interamericana McGraw Hill, México; p.p. 1497-1498.

Siegal, George J.; Agranoff, Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K.; Uhler, Michael D. Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 6a ed., 1999, Lippincott, Williams & Wilkins; Philadelphia; p.p. 756-770.

Squire L, Kandel E, Memory: From Mind to Molecules, 2000, W.H. Freeman & Company Editions, E.U.A., p.p. 1-21.

Steketee JD, Silverman PB, Swann AC. (1992). Noradrenergic receptor mechanisms in neophobia. *Psychopharmacology* (106): 136-142.

Tucci S, Rada P, Hernandez L. (1998). Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Research*. 813: 44–49.

Ungerstedt U (1991) Introduction to cerebral Microdialysis, En: Microdialysis in the Neurosciences ,Eds.T.E. Robinson and J.B. Justice Jr, Elsevier, p.p. 3-22.

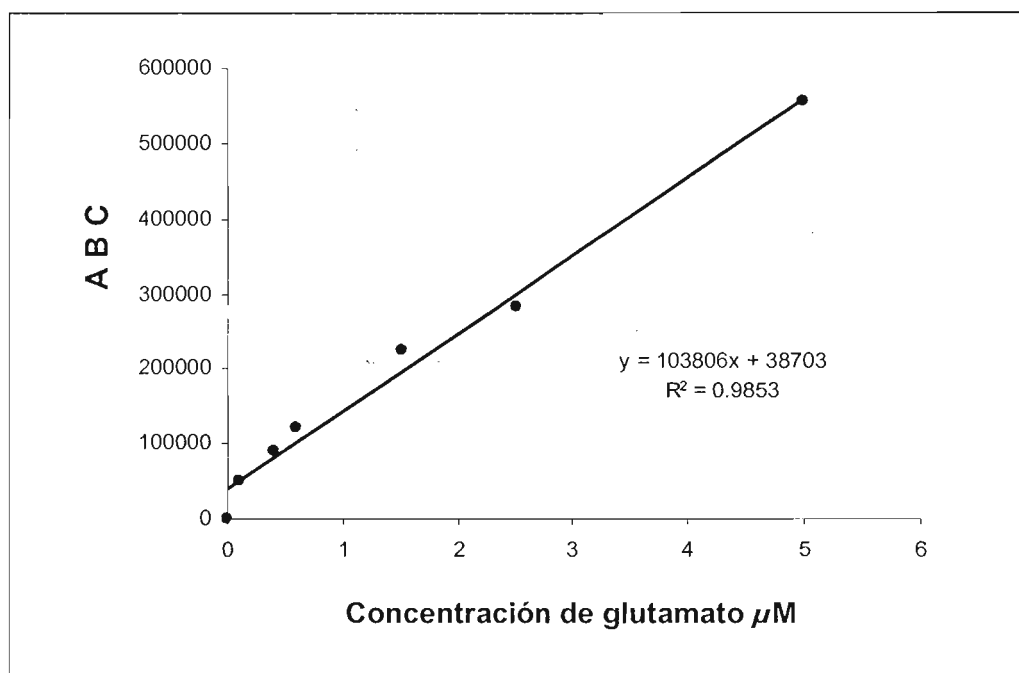
Winters BD, Bussey TJ. (2005). Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *Journal of Neuroscience*. 25(17):4243-4251.

Yamamoto T, Nagai T, Shimura T, Yasoshima Y. (1998). Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol*.76(4):325-348.

Young, J.B. and Landsberg, L., Catecholamines and the adrenal medulla. En Williams Textbook of Endocrinology, 9a ed., 1998; Wilson, J.D. and Foster, D.W., eds, Philadelphia; pp. 680-682.

Zhang, Yueping; Bailey, Kathleen R.; Toupin, Margaret M.; Mair, Robert G. (2005). Involvement of Ventral Pallidum in Prefrontal Cortex-Dependent Aspects of Spatial Working Memory. *Behavioral Neuroscience*. 119(2) 399-409.

Curva patrón para la cuantificación de glutamato en muestras de microdializado de cerebro de rata.

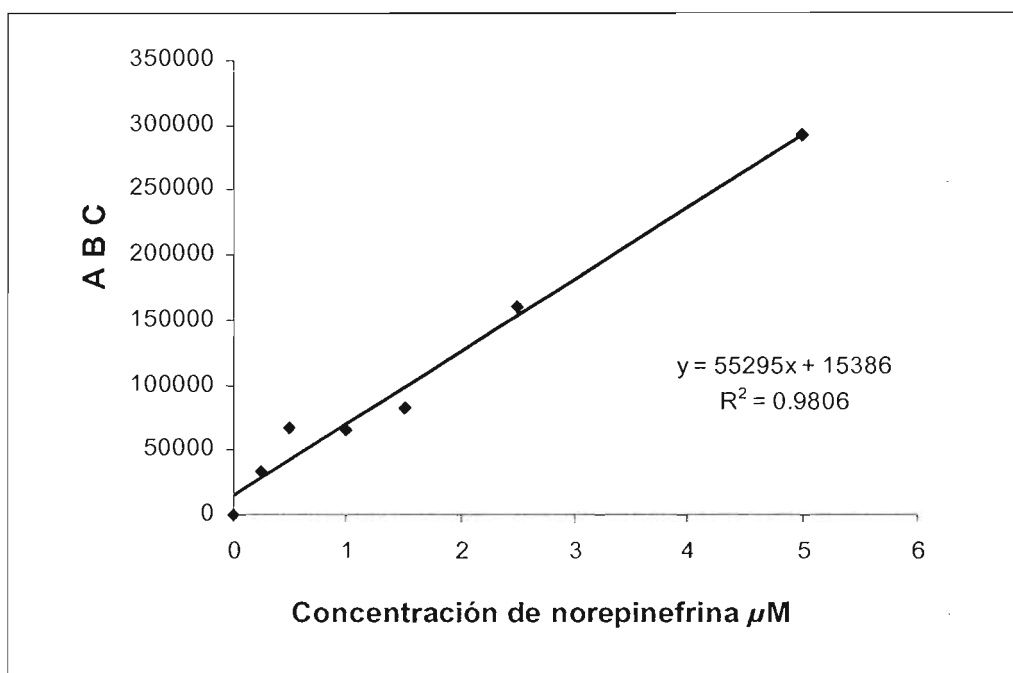


Glutamato μM	ABC
5	554137
2.5	281541
1.5	223628
0.6	120785
0.4	90100
0.1	49169

Tabla A. Concentración y área bajo la curva de los estándares de glutamato disueltos en LCRA.

El límite de detección del método para glutamato fue de 10 nM y la concentración basal en las muestras de microdializado fue de $1.79 \pm 0.544 \mu\text{M}$.

Curva patrón para la cuantificación de norepinefrina en muestras de microdializado de cerebro de rata.



Norepinefrina μM	ABC
5	554137
2.5	281541
1.5	223628
0.6	120785
0.4	90100
0.1	49169

Tabla B. Concentración y área bajo la curva de los estándares de norepinefrina disueltos en LCRA.

El límite de detección del método para norepinefrina fue de 90 nM y la concentración basal en las muestras de microdializado fue de $2.955 \pm 0.468 \mu\text{M}$.