

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

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

NOMBRE: CLAUDIO R. LUNA

ILLADES
FECHA: 20 SEP 2005

FIRMA: Claudio Luna

**PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN EN SERINAS DEL
RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO NMDA EN LA
MEMORIA GUSTATIVA.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE LICENCIADO EN PSICOLOGIA**

P R E S E N T A

LUNA ILLADES CLAUDIO ROMAN

**DIRECTOR DE TESIS
DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS
MÉXICO, 2005.**

m348279

אין העולם מתקיים אלא בשל הבל פיהן של תינוקות של
בית רבן... שבועות קי"ט ב'.

**La existencia misma del mundo descansa en el aliento de un niño en el
salón de clases.**

Talmúd Babilónico: Shabat, 119b.

המחקר המדעי והישגיו אינם עוד עניין אינטלקטואלי
מופשט בלבד... אלא גורם מרכזי... בחי" עם תרבותי...

דוד בן גוריון, תשב"ב.

**La investigación científica y sus logros ya no son meramente un asunto
intelectual abstracto... sino un factor central... en la vida de todo pueblo
civilizado...**

David Ben-Gurión, 1962.

I. Agradecimientos

A mis padres Perla y Román, por su apoyo y fe en todo lo que hago; a ellos debo todo lo bueno que hay en mí.

A mis abuelos Enrique y Consuelo, por su paciencia y ayuda en los momentos más difíciles.

A mis amigos y maestros de la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Alma Mater.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Juan José Sánchez Sosa, a la Dra. Dolores Rodríguez Ortiz, a la Lic. Karin Wriedt Runne y a la Mtra. Rita Velásquez Lerma por su apoyo incondicional y confianza en mi trabajo.

A mis profesores, compañeros y al personal de apoyo del Instituto de Fisiología Celular de los cuales aprendí mucho académica y personalmente.

Al Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoytia por darme la gran oportunidad de trabajar bajo su tutela, además de su guía, paciencia y apoyo académico durante mi estancia en su laboratorio.

Faltan palabras para agradecerle a la Dra. Beatriz Jiménez Andréu pues se convirtió en mi "mamá académica", mi asesora y mi amiga; es justo decir que gracias a su dedicación y enseñanzas, encontré en el trabajo de laboratorio, la respuesta y satisfacción a mis aspiraciones profesionales.

A la Dra. Herminia Pasantes Morales y al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por toda la ayuda que recibí como estudiante.

Mi más sincero agradecimiento por su amistad y apoyo al Dr. J. Adolfo García Sainz, científico excepcional.

A mi maestro y amigo el Dr. Antonio Zainos Rosales, a quien le debo no solamente ser mi consejero académico, sino también mi terapeuta regular.

A mis revisores de tesis por todos sus comentarios y recomendaciones: a la Dra. Martha Escobar, al Dr. Víctor Ramírez y muy especialmente a la Mtra. Gabriela Orozco.

Para cerrar este apartado, quiero agradecerle y dedicar este trabajo a un tipo increíble: mi hermano menor.

Quien sin lugar a dudas es mi mejor crítico y a la vez mi más grande apoyo... Gracias César.

Ciudad Universitaria, Otoño de 2005.

Índice

I. Agradecimientos	4
II. Resumen.	6
III. Introducción.	7
Aprendizaje y Memoria	7
Aprendizaje gustativo.	10
Neofobia	10
Condicionamiento aversivo a los sabores	11
Sensación del sabor.	12
Anatomía de las papilas, células gustativas.	13
Detección de la información gustativa.	15
Vía gustativa.	16
Núcleo basal magnocelular (NBM).	18
Corteza insular (CI).	18
Papel del sistema colinérgico.	18
Receptor muscarínico a la acetilcolina (ACh).	20
Papel del sistema glutamatérgico.	21
Receptor NMDA al glutamato (Glu).	21
Fosforilación de proteínas.	22
Proteínas cinasas.	23
IV. Planteamiento del problema y objetivos.	27
V. Metodología.	29
Sujetos.	29
Procedimiento conductual.	29
Técnicas.	30
VI. Resultados	34
VII. Discusión.	45
VIII. Conclusiones .	49
IX. Referencias.	50

II. Resumen.

En este trabajo se investigó el papel de la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del receptor glutamatérgico NMDA, en la consolidación de la memoria gustativa. Se utilizó la neofobia como paradigma conductual para determinar la familiaridad del estímulo presentado, y se expuso a los animales a diferentes intensidades del estímulo gustativo que consistió en una solución con una concentración porcentual de sacarina que varió de 0.05% a 0.25%; el estímulo gustativo novedoso se presentó en una, dos o tres veces según el diseño experimental. Se encontró que las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA participan en la consolidación de la memoria gustativa, ya que presentaron modificaciones cuando se estimuló a los sujetos experimentales con el gusto novedoso. Estos cambios en el receptor disminuyeron al volverse familiar el estímulo y por lo tanto, sugieren la consolidación del recuerdo en la memoria a largo plazo. Por otro lado, la intensidad de la estimulación repercutió en las modificaciones del receptor con lo que se puede inferir su participación en la neofobia. Experimentos de control para otros proyectos revelaron posteriormente que existieron problemas importantes con la metodología utilizada. En un primer momento, se creyó que los efectos observados se debían a la fosforilación en serinas del receptor NMDA, sin embargo datos posteriores sugirieron que realmente no se realizó una inmunoprecipitación, sino solo la precipitación de grandes segmentos membranales. Dados los alcances de este trabajo, no se puede afirmar si los cambios observados experimentalmente fueron el resultado de la reagrupación de los receptores NMDA en microdominios lipídicos dinámicos (MLD) o en densidades postinápticas (DP); sin embargo, existe evidencia reciente en la literatura, que apoya y otorga un papel fundamental a los MLD y a las DP en el aprendizaje y la memoria, y por consiguiente en el procesamiento de la información.

III. Introducción.

Aprendizaje y Memoria.

Como primer antecedente en el estudio del aprendizaje y la memoria podemos mencionar al conductismo radical de Skinner, quien describió ampliamente la relación entre estímulo - respuesta; hizo énfasis en el valor de la conducta por la capacidad de esta de ser cuantificable. Por otro lado, mantuvo al sistema nervioso en la noción de una "caja negra" en la cual lo que importa es la información que ingresa y la respuesta conductual que produce, y no lo que sucede dentro de ella (Anderson, 1995).

En segundo plano, y como reacción a Skinner, tenemos las ideas de Edward Tolman, quien con sus experimentos sobre aprendizaje espacial dio una nueva interpretación al concepto conductual del aprendizaje. En su trabajo experimental, Tolman (1946) encontró que los animales generan un mapa cognitivo de su entorno. A esa conclusión llegó al comparar la cantidad de errores entre tres grupos de ratas en una tarea de aprendizaje espacial.

La tarea consistió en que el animal tenía que encontrar un punto determinado en un laberinto y asociarlo con alimento. Tolman (1946) manejó tres grupos: en el primero se privó a los animales y después se les entrenó durante 17 días para encontrar comida (reforzador) en un punto determinado; en el segundo grupo, los animales recorrieron el laberinto sin algún objetivo durante los primeros 11 días, a partir del día 12, comenzaron con el entrenamiento arriba descrito; finalmente el tercer grupo no se le recompensó cuando encontraban el lugar objetivo.

Tolman encontró que el grupo que fue entrenado a partir del día 12 tenía una cantidad similar de errores que el grupo que fue entrenado desde el principio lo cual sugirió "aunque los animales no mostraron conducta alguna en los primeros once días, desarrollaron representación espacial, y fue hasta que necesitaron utilizar la información, que el aprendizaje se hizo evidente a través de la conducta. Esto lo llevo a postular que, aunque la conducta es en si el

resultado del aprendizaje, lo que se debe considerar como aprendizaje, es el cambio en el sistema nervioso central traducido en un mapa cognitivo.

La idea de que un cambio fisiológico en el sistema nervioso sea el sustrato de la cognición no es nueva. Ya en su proyecto de psicología para neurólogos (previo al psicoanálisis) Freud (1850) menciona que el paso de la energía libidinal por grupos de neuronas generaban un cambio a nivel celular, esto lo llevó a clasificar en diferentes grupos las neuronas (alfa, beta u omega) y las relacionó con la conducta.

Más adelante con la descripción de la sinapsis por parte de Sherrington y el trabajo neurofisiológico de Lorente de No, Donald Hebb integró sus ideas en una teoría del sustrato neurofisiológico del aprendizaje y la memoria.

Hace más de treinta años Hebb se propuso explicar cómo se procesa la información sensorial a partir de dos fenómenos que en su momento llamó ensamble y secuencia de fase. Postuló que tras la estimulación sensorial, un grupo de neuronas elevaría su actividad como respuesta a las características e intensidad del mismo, y uno de los mecanismos que mantendría activas estas conexiones le llamó reverberancia.

Hebb describió la relación entre neuronas conocida como "sinapsis hebbiana": "Cuando el axón de la célula A está lo suficientemente cerca para excitar a la célula B, y repetida y persistentemente forma parte de esta excitación, algunos procesos de crecimiento o cambios metabólicos tienen lugar en una o en ambas células, de tal manera que la eficacia de A como una de las células que excitan a B se incrementa" (Hebb, 1949).

Hebb también postuló que las conexiones sinápticas son fortalecidas cuando la neurona presináptica y postsináptica se activan simultáneamente. Este fortalecimiento podría llevarse a cabo por cambios en el metabolismo celular o la liberación de un factor retrógrado que viaja de la post a la presináptica para facilitar la liberación del neurotransmisor con el fin de mantener la comunicación sináptica activa.

Por otro lado, le llamó ensamble a la forma en que el sistema nervioso representa los estímulos de su entorno. Además, Hebb propuso que esto sucedía gracias a la respuesta coordinada y secuenciada de un grupo o grupos de neuronas. La importancia del mantenimiento de un ensamble se debe a que éste conserva la representación de las cualidades de un estímulo en el sistema nervioso central. En su teoría Hebb manifestó la necesidad e la ocurrencia de cambios estructurales para que se mantenga la memoria formada como consecuencia del aprendizaje.

Tal como ya lo describió Hebb en su modelo del aprendizaje, la investigación contemporánea en psicobiología, ha propuesto que el almacenamiento de la información ocurre a través de cambios en la eficiencia de la comunicación sináptica. Un modelo de plasticidad cerebral es la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) que es un incremento sostenido en la fuerza de la comunicación sináptica debido a la activación repetida de una vía y que se ha sugerido que subyace el almacenamiento de la información. Por ejemplo, para inducir LTP se aplica a una vía aferente excitatoria, breves episodios de estimulación de alta frecuencia (100 Hz); esta estimulación, llamada tetánica de la vía, trae como consecuencia un incremento duradero y estable en la magnitud de la respuesta sináptica, que puede durar horas o hasta días en animales intactos (Balderas, et. al. 2004).

Como vemos, la LTP es una forma de plasticidad sináptica dependiente de actividad que se ha investigado principalmente en el hipocampo y la neocorteza, donde probablemente residen las modificaciones que subyacen a ciertas formas de aprendizaje y memoria (Balderas, et. al. 2004).

Los eventos plásticos también pueden incluir cambios en la estructura, la distribución y el número de las sinapsis, y se ha sugerido que dichos cambios podrían relacionarse con la formación de la memoria. Los receptores NMDA se han relacionado con la regulación de cambios funcionales y morfológicos en la comunicación sináptica, lo cual podría relacionarse con los mecanismos celulares en la consolidación de la memoria (Balderas, et.al. 2004).

También se han descrito los procesos moleculares que subyacen a los cambios en la distribución y número de sinapsis, como son: la fosforilación de receptores, la activación de cascadas de cinasas y la activación de genes de expresión temprana.

De lo anterior, podemos definir al aprendizaje como el proceso por el cual ocurren cambios duraderos en el potencial de la conducta como resultado de la experiencia; de la misma manera, podemos definir a la memoria como el registro de la experiencia que subyace al aprendizaje (Anderson, 1995).

Aprendizaje Gustativo.

En organismos relativamente simples como bacterias o protozoarios podemos encontrar mecanismos que responden a la presencia de diferentes compuestos en el medio a través de quimiorreceptores. Este mecanismo le permite al organismo identificar los diferentes aspectos de su entorno, indicándole la presencia de alimento o de sustancias tóxicas. Algunas células del cuerpo de los vertebrados tienen diferentes quimiorreceptores en su membrana que les permiten responder a una gran variedad de estímulos químicos. Los vertebrados tienen sistemas de percepción química: un sentido general que detecta sustancias dañinas y cuyos receptores se encuentran en la piel, en las mucosas de la boca y del sistema respiratorio, un sistema quimiorreceptor interno que participa en la regulación de las funciones viscerales, y los sentidos especializados del olfato y del gusto. Los receptores gustativos de los vertebrados se encuentran en la cavidad bucal y participan en la detección, selección y rechazo de los compuestos químicos asociados con los alimentos (Meisami, 1991).

Neofobia.

Los componentes del aprendizaje en el proceso de selección de alimentos difieren en su importancia a corto y largo plazo. Cuando un animal falla en encontrar un alimento esencial para su dieta, aunque en principio se encuentre amenazado, puede sobrevivir hambriento o con una dieta deficiente

durante un periodo relativamente prolongado. El aprendizaje animal sobre la disponibilidad y valor nutrimental de un alimento, no requiere de decisiones rápidas, sino de una evaluación minuciosa de las consecuencias de su ingesta a nivel visceral (Bures, 1998).

A esta conducta precautoria se le conoce como: Neofobia, que se define como la ingesta cuidadosa de pequeñas porciones de un alimento novedoso, seguido por algunas horas de ayuno (Domjan, 1997 citado en Bures, 1998). Éste mecanismo conductual hace posible que el animal discrimine entre un estímulo novedoso y uno familiar, y también que evalúe su valor nutrimental e inocuidad. El estímulo gustativo novedoso se registra en la memoria a corto plazo, a la espera de las consecuencias viscerales de su ingesta (o la ausencia de ellas) lo anterior permite al animal clasificar el estímulo como seguro o aversivo. La presencia de este recuerdo en la memoria del animal se manifiesta durante las exposiciones subsecuentes al mismo alimento por el proceso de extinción de la conducta precautoria, que se conoce como atenuación de la neofobia. Ésta se define como el incremento gradual en el consumo del alimento novedoso, que pasa a ser un estímulo familiar categorizado como seguro (Bures, 1998).

Condicionamiento Aversivo a los Sabores CAS.

El condicionamiento aversivo a los sabores se desarrollo a partir del paradigma del condicionamiento clásico descrito por Pavlov.

Este consiste en tres fases: un periodo de entrenamiento donde se registra el volumen de liquido que un animal bebe por día. Este registro conductual que se conoce como línea base es muy importante pues será el parámetro para comparar el periodo de prueba. En la segunda fase, el animal se expone a un estímulo gustativo novedoso, seguido por una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl), esto le provoca al animal un malestar gástrico agudo durante las siguientes cuatro horas; a este periodo se le conoce como adquisición. En la tercera fase, se realiza una prueba de la adquisición del recuerdo; veinticuatro horas después se presenta el estímulo gustativo

novedoso y se registra el volumen de líquido que el animal consume. Este es el parámetro conductual que se contrasta con el registro del consumo habitual; la diferencia entre ambos, nos habla de la consolidación del recuerdo y de la fuerza del mismo. El CAS es una excelente herramienta para el estudio de la memoria ya que se pueden diferenciar los diferentes estadios de la memoria al hacer el análisis estadístico del registro conductual; además los resultados describen el papel y estatus del estímulo novedoso en su paso a ser familiar. Finalmente, otra ventaja de este paradigma conductual es su susceptibilidad a manipulaciones farmacológicas que intervienen a nivel neuroquímico y conductual (Bermúdez-Rattoni, 2001) (Fig. 1).

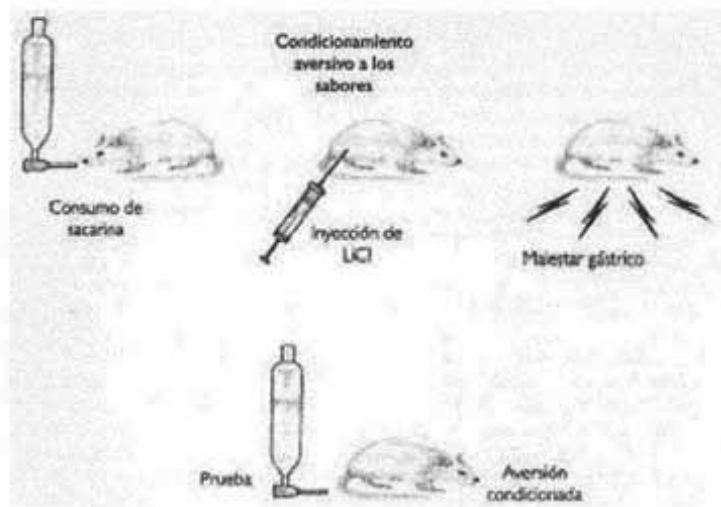


Figura 1. Condicionamiento aversivo a los sabores (Bermúdez, 2001)

Sensación del sabor.

Se han estudiado los mecanismos quimiorreceptores tanto en los vertebrados como en los invertebrados. Algunas características han permanecido muy conservadas durante la evolución, como el uso de células quimiosensibles con cilios o microvellosidades especializadas que permanecen expuestas al medio ambiente. Las investigaciones de los mecanismos

moleculares subyacentes a la quimiorrecepción en diversas especies de invertebrados revelan que, al igual que los vertebrados, la detección de los estímulos quimiosensitivos se hace mediante receptores que se unen a la proteína G. Las moléculas que pueden degustarse son detectadas por las células gustativas que se agrupan en las yemas gustativas de la lengua, el paladar, la faringe, la epiglotis y el tercio superior del esófago. En la lengua, las yemas se encuentran sobre todo en las papilas, que son estructuras rodeadas de epitelio (Meisami, 1991).

Anatomía de las papilas y células gustativas.

En el hombre, las distintas regiones de la lengua poseen tres tipos morfológicos distintos de papilas. Varios cientos de papilas fungiformes se distribuyen por los dos tercios anteriores del órgano. En el tercio posterior se encuentran las grandes papilas caliciformes, cada una de ellas rodeada de un surco. Las papilas foliáceas, situadas en el borde posterior de la lengua, son estructuras con forma de hoja, que también están rodeadas por un surco. Cada papila fungiforme contiene de 1 a 5 yemas gustativas, mientras que las caliciformes y las foliáceas contienen cientos de yemas (Manter y Gatz, 1996).

Cada yema gustativa está formada por cuatro tipos de células morfológicamente distintas: células basales, células oscuras, células claras y células intermedias. Las células basales son pequeñas y redondeadas y se encuentran en la base de las yemas; parecen ser las células precursoras de las que se derivan los demás tipos. La vida de las células gustativas es muy breve y su regeneración es continua. Los tres tipos celulares no basales podrían corresponder a diversos estadios de diferenciación de la célula gustativa en desarrollo, en cuyo caso las más maduras serían las células claras. Otra posibilidad es que las células claras, intermedias y oscuras pertenezcan a estirpes celulares distintas. A las tres se les denomina células gustativas y todas tienen una forma alargada bipolar, extendiéndose desde la apertura epitelial de la yema gustativa hasta su base (Kandel, 2000) (Fig. 2).

Cada yema gustativa tiene una pequeña apertura en la superficie del epitelio llamada poro gustativo. Aproximadamente cien células contenidas en cada yema gustativa extienden sus microvellosidades hacia este poro. Las microvellosidades, donde se produce la transformación sensitiva, son las únicas partes de la célula gustativa expuestas a la cavidad bucal. Las células gustativas están inervadas en su polo basal por neuronas sensitivas (fundamentalmente por fibras aferentes gustativas) (Carlson, 1996).

Aunque las células gustativas son epiteliales no neuronales, sus contactos con las fibras sensitivas tienen las características morfológicas de sinapsis químicas. Además, las células gustativas se excitan con corrientes eléctricas y poseen canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} sensibles al voltaje capaces de generar potenciales de acción (Kandel, 2000).

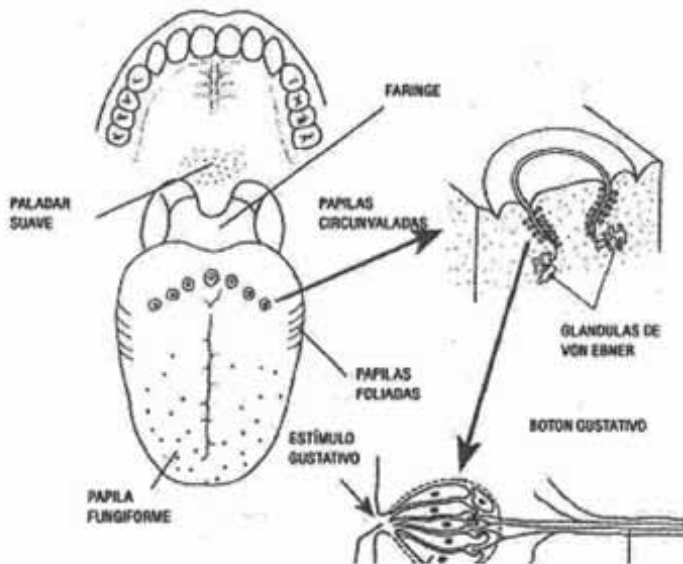


Figura 2. Esquema de la cavidad oral y de los receptores al gusto (Bures, 1998).

Detección de la información gustativa (transducción del estímulo).

El sistema gustativo distingue cuatro estímulos básicos: amargo, salado, ácido y dulce. El glutamato monosódico representa una quinta categoría de estímulo denominado umami (Kandel, 2000).

En general, las sustancias gustativas actúan sobre los canales iónicos o sobre receptores específicos situados en la membrana apical de la célula gustativa (Bermúdez-Rattoni, 2001).

Tomando en cuenta que en este trabajo experimental se utilizó como estímulo gustativo novedoso una solución a diferentes concentraciones de sacarina, se describe brevemente el proceso de transducción de la señal gustativa a lo dulce.

Gusto Dulce.

Éste gusto parece depender de la captación de las sustancias dulces por receptores específicos existentes en la membrana apical de las células gustativas. La transformación de los estímulos ejercidos por las sustancias dulces podría hacerse por mecanismos distintos (Kandel, 2000).

La unión de las sustancias dulces con sus receptores asociados a una proteína G provoca un aumento de AMPc intracelular que activa la cinasa dependiente del AMPc y fosforila los canales de K⁺, inactivándolos. Las pruebas sobre la existencia de esta vía proceden de estudios según los cuales las células gustativas del ratón se despolarizan en respuesta a la sacarosa y esta respuesta puede simularse inyectando en la célula nucleótidos cíclicos o una sustancia química que bloquee específicamente los canales de K⁺ (Carlson, 1996).

Además, la sacarosa produce una elevación proporcional a la dosis del AMPc en las yemas gustativas caliciformes intactas. La observación de que el incremento de la concentración de AMPc inducido por las sustancias dulces

requiere la presencia de GTP apoya la existencia de receptores que se unen a la proteína G, específicos para moléculas dulces (Manter y Gatz, 1996).

El hallazgo de que algunos edulcorantes artificiales favorecen el aumento del IP_3 indica la existencia de un segundo mecanismo de transformación del sabor dulce en los roedores. Por analogía con las cascadas de transformación de la señal en las que interviene la inducción de IP_3 en algunos otros tipos celulares, puede pensarse que algunos receptores del sabor dulce transforman las señales mediante interacciones con una o varias proteínas G que modifican las concentraciones intracelulares del IP_3 , en lugar de actuar sobre el AMPc. Es probable que estos incrementos del IP_3 induzcan la liberación de Ca^{2+} a partir de los depósitos intracelulares (Kandel, 2000).

Vía Gustativa.

Cada célula gustativa está inervada en su base por las ramas periféricas de las fibras gustativas primarias, y cada fibra sensitiva se ramifica muchas veces e inerva numerosas yemas gustativas y, dentro de cada yema, varias células gustativas. Por tanto, la actividad eléctrica recogida en una sola fibra sensitiva representa aferencias procedentes de muchas células gustativas. Como ya se dijo, la liberación de un neurotransmisor por las células gustativas sobre las fibras sensitivas induce la aparición de potenciales de acción en esas fibras y la transmisión de señales hacia el encéfalo.

Las yemas gustativas de los dos tercios anteriores de la lengua (las papilas fungiformes) están inervadas por neuronas sensitivas del ganglio geniculado, cuyas ramas periféricas viajan con la cuerda timpánica, una rama del nervio facial (VII par craneal). Las yemas del gusto del tercio posterior de la lengua están inervadas por neuronas sensitivas del ganglio petroso, cuyas ramas periféricas viajan con la rama lingual del nervio glossofaríngeo (IX par craneal). Las yemas gustativas del paladar están inervadas por la rama petrosa superficial mayor del VII par craneal y las yemas de la epiglotis y el esófago lo están por la rama laríngea superior del X par craneal. Algunos de estos nervios transportan también vías aferentes somatosensitivas que inervan las regiones

de la lengua situadas en torno a las yemas gustativas. Las fibras sensitivas que reciben aferencias procedentes de las células gustativas y que discurren con los pares craneales VII, IX y X penetran en el haz solitario del bulbo raquídeo, donde establecen sinapsis con una fina columna de células situada en el área gustativa de la parte rostral y lateral del núcleo del haz solitario (Fig. 3) (Bures, 1998).

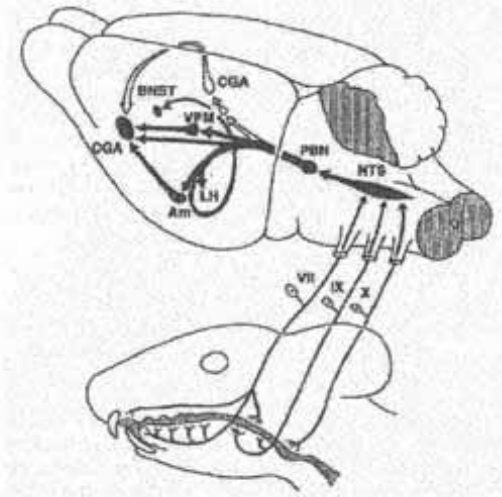


Figura 3. Esquema de la vía gustativa en la rata. Ésta va de las papilas gustativas al núcleo del tracto solitario, al tálamo y después se distribuye a todo el manto cortical. Abreviaturas: Am Amígdala, PBN Núcleo para braquial, NTS Núcleo del tracto solitario, CGA Corteza gustativa, BSNT Núcleo terminal del estriado, LH Hipotálamo lateral, VMP Núcleo ventral posteromedial del Tálamo, (Bures, 1998).

Las neuronas del área gustativa se proyectan al tálamo, donde terminan en la región de células pequeñas (parvocelular) del núcleo medial posterior ventral. Allí las células que forman parte de la vía gustativa se agrupan separadas de las neuronas de las demás modalidades sensitivas procedentes de la lengua. Las neuronas de la región parvocelular del tálamo que reciben aferencias gustativas se proyectan sobre neuronas situadas a lo largo del límite entre la ínsula anterior y el opérculo frontal de la corteza cerebral homolateral. Esta región ocupa una posición rostral con respecto a la representación

somatosensitiva de la lengua (es decir, el tacto, el dolor y la temperatura). Parece ser que esta proyección proporciona la percepción consciente y la discriminación de los estímulos gustativos (Fig. 3) (Manter y Gatz, 1996).

Núcleo Basal Magnocelular (NBM).

El núcleo basal magnocelular (núcleo basal de Meynert en el humano) se localiza en el telencéfalo basal, junto con el septum y el núcleo de la banda diagonal de Broca que son los principales proveedores de acetilcolina para el manto cortical. Es decir, tienen proyecciones colinérgicas hacia todas las estructuras corticales (Manter y Gatz, 1996).

Corteza Insular (CI).

Se ha sugerido que la corteza insular juega un importante papel en la integración y almacenamiento de la información visceral y gustativa. Los núcleos talámicos tienen proyecciones que van hacia la corteza insular y éstos se encuentran localizados a lo largo del surco rinal. La corteza insular se define como el tramo que va de la corteza frontal a la peririnal en dirección rostrocaudal limitando de manera ventral con la corteza somatosensorial y la corteza piriforme en dirección dorsoventral (Bures, 1998).

Papel del sistema colinérgico en el aprendizaje y la memoria.

Se ha descrito un incremento en la liberación de acetilcolina en la corteza, como resultado de tareas que involucran al condicionamiento, cuando el animal lleva al cabo la asociación, liberación que no se presenta cuando el animal realiza la misma acción de activar la palanca (respuesta condicionada) una vez que ha sido entrenado, lo cual sugiere una participación importante del sistema colinérgico en las primeras etapas del aprendizaje (Orsetti et. al., 1996).

También se ha demostrado una relación directa entre las habilidades cognitivas de un animal y la actividad de la colina-acetil transferasa (ChAT,

enzima encargada de sintetizar acetilcolina). Se utilizaron ratas criadas en ambientes enriquecidos, es decir, con una mayor cantidad de estímulos (rampas y juegos) y ratas criadas en ambientes pobres (con pocos estímulos). Al compararlas, las primeras tenían mayor actividad de la ChAT en el núcleo caudado y una mejor ejecución en tareas cognitivas (Park et al., 1992)

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

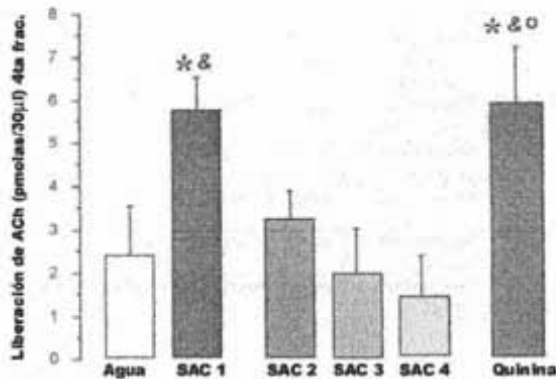


Figura 4. Liberación de acetilcolina en el NBM como producto de la exposición a un estímulo gustativo novedoso. La muestra se obtuvo por microdialisis y se cuantificó en cromatografía líquida de alta resolución (Miranda et al., 2000).

En el caso de la memoria gustativa, también se ha observado un incremento considerable en la liberación de acetilcolina en la corteza insular (CI) asociada a la presentación de un estímulo gustativo novedoso, el cual

desaparece una vez que la novedad del estímulo se pierde por medio de presentaciones consecutivas (Miranda et.al., 2000) (Fig. 4).

Lo anterior concuerda con trabajos previos que indican una participación importante de la ACh en la CI para la adquisición del Condicionamiento Aversivo a los Sabores, así como la importancia de la novedad del estímulo gustativo, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos en la CI, impide el aprendizaje de esta tarea (Naor, 1996). Este efecto sólo se ve al aplicar el fármaco en la CI, ya que impide la señalización del sabor novedoso, efecto que se observa al probarlo en la tarea de inhibición latente (tarea conductual basado condicionamiento clásico), ya que también se ve afectada por la inyección de la escopolamina que es un antagonista muscarínico antes de la presentación del estímulo gustativo, indicando que la ACh en la CI participa en el reconocimiento del sabor novedoso y la formación de la memoria gustativa (Naor, 1996). Como ya se mencionó, también se ha demostrado la participación del sistema colinérgico en la CI en la atenuación de la neofobia a sabores (Miranda et.al., 2000).

Receptor muscarínico a la Acetilcolina (ACh).

Los receptores colinérgicos de tipo muscarínico se han localizado sobre todo en el sistema nervioso central; intervienen en funciones motoras, en la función vestibular, en los procesos de la memoria y en mecanismos relacionados con la conciencia y la conducta (Carlson, 1996).

Se han identificado por clonación molecular cinco subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos y todos se pueden localizar en el SNC. Las interacciones con los miembros de la familia de proteínas G y, por tanto, los cambios en las funciones de las distintas moléculas efectoras ligadas a la membrana, median las funciones básicas de estos receptores. Los subtipos M1, M3 y M5, activan a la proteína Gq que es la encargada de la estimulación de la fosfolipasa C. Una segunda vía para la mediación de las reacciones a los agonistas muscarínicos es la evocada por la activación de los receptores M2 y

M4. Estos receptores interactúan con un grupo definido de proteínas Gi que inhiben la adenilil ciclasa (Goodman y Gilman, 1996).

Papel del sistema glutamatérgico en el aprendizaje y la memoria.

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC. Durante la última década se ha producido muchísima información relativa a la neurobiología de la transmisión glutamatérgica, gracias al desarrollo de sustancias con propiedades agonistas y antagonistas de los diferentes subtipos del receptor al glutamato (Kandel, 2000).

Esto ha llevado a relacionar al glutamato tanto con el desarrollo del aprendizaje como con la consolidación de la memoria. En especial se ha descrito el papel de los receptores ionotrópicos del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) en los fenómenos plásticos que se cree son el correlato fisiológico de éstos procesos cognitivos (Bermúdez-Rattoni et.al., 2004).

Lo anterior se ha descrito en diferentes paradigmas conductuales como el laberinto acuático (Ramírez-Amaya et. al., 2001), los condicionamientos aversivos al sabor y al contexto (Ferreira et.al., 2002), inclusive se sabe de la participación de los NMDA en la potenciación a largo plazo (Escobar et. al., 2002).

Receptor NMDA al glutamato (NMDARs).

El NMDA es un receptor de tipo ionotrópico, cuyo canal es permeable a cationes Ca^{+} , Na^{+} y K^{+} . Su permeabilidad al calcio lo diferencia claramente de los canales asociados a otros tipos de receptores. El receptor NMDA está localizado sobre todo en el hipocampo, particularmente en el área CA1, así como en la corteza y en los ganglios basales (Manter y Gatz, 1996).

El receptor NMDA presenta una estructura tetramérica (Schorge et. al., 2003) o pentamérica (Hawkins et. al., 1999) que esta compuesta por dos subunidades NR1 y dos o tres subunidades NR2. Adicionalmente es probable

que las subunidades NR3 puedan formar canales en asociación con las subunidades NR1 y NR2 (Al-Hallaq et. al., 2002).

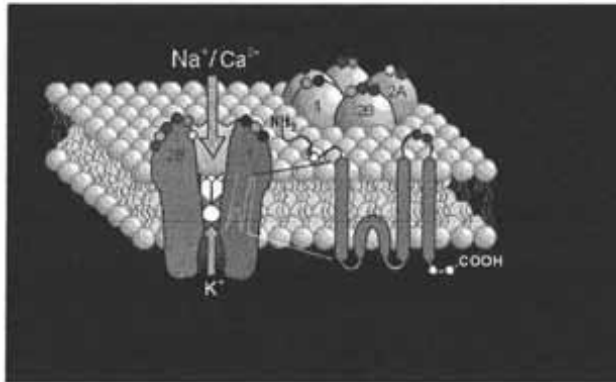


Figura 5. Receptor ionotrópico al glutamato del tipo N-metil-D-aspartato, donde se muestran las subunidades NR2A y NR2B.

La función del receptor está directamente influenciada por el arreglo de sus subunidades; en la corteza cerebral de la rata adulta la mayoría de los receptores está conformada por una subunidad NR1 y dos subunidades NR2 (NR2A y NR2B) (Al-Hallaq et.al., 2002) (Fig. 5).

Fosforilación de proteínas.

La fosforilación de proteínas es un mecanismo generalizado en la regulación de la actividad biológica (Nestler y Greengard, 1994). Una proteína cinasa, su sustrato y una fosfatasa, constituyen un sistema de fosforilación y defosforilación de proteínas. Las estructuras sinápticas son muy ricas en tales sistemas y existen múltiples evidencias de que muchos aspectos de la función sináptica son regulados por fosforilación reversible de proteínas sinápticas (Rodnight y Wofchuk, 1992).

Las proteínas cinasas son clasificadas de diferentes maneras, una de ellas se hace a partir del aminoácido al cual estas enzimas unen covalentemente el grupo fosfato. Es decir, se conocen como proteínas cinasas de serina y treonina, las que fosforilan sustratos proteicos sobre residuos de

serina y treonina, o como proteínas cinasas de tirosina, aquellas que fosforilan a sus sustratos en residuos de tirosina. La mayoría de las fosforilaciones de proteínas ocurren en residuos de serina (más del 95%), una pequeña cantidad sobre residuos de treonina (3 a 4%); y muy poca (menos del 1%) en residuos de tirosina. En todos los casos, la cinasa cataliza la transferencia del grupo fosfato γ -terminal del ATP al grupo hidroxilo del residuo de aminoácido respectivo con requerimiento de Mg^{2+} para que se lleve al cabo la reacción. Y es a partir de estos requerimientos, que se constituye otra clasificación, que aquí se toma como base para describir a las siguientes cinasas, principalmente aquellas que presentan mayor importancia para la fisiología del cerebro (Nestler y Greengard, 1994).

Proteínas cinasas.

En el cerebro de los mamíferos existen dos tipos distintos de proteínas cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). La PKA es un tetrámero compuesto de dos tipos diferentes de subunidades. Dos reguladoras (R) y dos catalíticas (C). La unión del AMPc a las subunidades R provoca su disociación del tetrámero. lo que libera las subunidades con capacidad catalítica. El cerebro contiene altos niveles de esta enzima y entre las proteínas neuronales fosforiladas por ella están: la sinapsina I, la proteína III, el receptor nicotínico de acetilcolina, el receptor β - adrenérgico, la tirosina hidroxilasa, neurofilamentos, la guanilato ciclasa, la fosfodiesterasa y los nucleótidos cíclicos. Así como también, canales de potasio sensibles a voltaje (Robles-Flores, et. al, 1993).

El cerebro contiene cinco tipos de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, con diferentes propiedades. Estas son, la fosforilasa cinasa, la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina II (CAMPK II), fosforilan un número limitado de sustratos bajo condiciones fisiológicas y por lo tanto intervienen en pocas de las respuestas mediadas por Ca^{2+} en el sistema nervioso (Nestler y Greengard, 1994).

La CAMPK II tiene una amplia distribución en el cerebro y se le denomina "proteína cinasa multifuncional", ya que regula gran parte de las respuestas mediadas por calcio en buen número de tipos neuronales. Esta enzima contiene un dominio regulador, que en estado de reposo, se une e inhibe al sitio catalítico. Esta inhibición desaparece cuando el complejo Ca^{2+} /calmodulina se une al dominio regulador. Se han encontrado varias isoformas de esta enzima con masa entre 50 kDa y 60 kDa (Nestler y Greengard, 1994).

En contraste con las otras cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, las isoenzimas de la CAMPK II presentan muchos sustratos. Éstos incluyen a la sinapsina I, la proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2), la glicógeno sintetasa, la proteína tau, la tirosina y triptófano hidroxilasas, la proteína mielínica básica, la proteína ribosomal s6 y las fosfodiesterasa de nucleótidos sensible a Ca^{2+} y calmodulina (Robles-Flores, 1993).

Otras proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} , son las activadas por Ca^{2+} junto con diacilglicerol, fosfatidilserina u otros fosfolípidos; a estas se les denomina proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y diacilglicerol o proteínas cinasas C (PKC). Se han clonado múltiples formas de PKC y se conoce que en el cerebro existen, al menos siete subespecies de esta enzima. Estas variantes presentan diferentes propiedades reguladoras y de distribución celular. Por ejemplo, tienen distinta afinidad por Ca^{2+} y diacilglicerol. Sin embargo, estas enzimas son consideradas isoformas, ya que presentan la misma especificidad de sustratos. La PKC, existe bajo condiciones fisiológicas como un polipéptido de 80 kDa. Cada polipéptido contiene un dominio regulador, que en estado de reposo se une al dominio catalítico, y se inhibe. Esta inhibición es revertida cuando el Ca^{2+} y el diacilglicerol se unen al dominio regulador (Nestler y Greengard, 1994).

Además de las proteínas cinasas reguladas por Ca^{2+} , AMPc y GMPc, se han identificado otras clases de proteínas cinasas de serina/treonina (Nairn y cols, 1985). Estas son reconocidas regularmente por los sustratos que fosforilan, pero no han mostrado tener influencia significativa en los fenómenos

de regulación neuronal. Ejemplos de estas proteínas cinasas son: las cinasas de caseína I y II, las cinasas asociadas a microtúbulos I, II y III, la cinasa de rodopsina, la cinasa de neurofilamentos, etc. (Nestler y Greengard, 1994).

Finalmente se hará mención de las cinasas de tirosina. En este grupo existen tanto enzimas citosólicas como las src, proteínas nucleares, como la cinasa de la descarboxilasa de ornitina y proteínas que son receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de tirosina. Estos últimos son los mejores caracterizados de la familia y tienen una topología molecular similar. Esto es, presentan un dominio extracelular de unión al ligando, una sola región transmembranal hidrófoba y un dominio citoplasmático, en el que reside la actividad de cinasa de tirosina (Robles-Flores, 1993).

El estado de fosforilación de los sustratos depende tanto de la actividad de las cinasas como de la actividad de las fosfatasas. Con base en el residuo aminoácido sobre el cual actúan, las fosfatasas como las cinasas, se dividen en dos tipos: las que hidrolizan el fosfato unido a serina o treonina y las que hidrolizan al fosfato unido a tirosina. Además, la subunidad catalítica de la familia de las fosfatasas de serina y treonina es totalmente diferente a la de las fosfatasas de tirosina, y por ende, no parecen estar relacionadas (Robles-Flores, 1993).

Una fosfatasa de proteínas, es una fosfoesterasa. Esta enzima, cataliza la hidrólisis de un grupo fosfato unido a un residuo de aminoácido hidroxilado de una proteína. Las fosfatasas de serina y treonina se agrupan en dos clases: las fosfatasas de proteínas tipo 1 y las tipo 2. Las fosfatasas tipo 1, desfosforilan la subunidad β de la fosforilasa cinasa y son inhibidas por concentraciones nanomolares del inhibidor de fosfatasas tipo 1 o 2, mientras que las fosfatasas de proteínas tipo 2, desfosforilan selectivamente la subunidad α de la fosforilasa cinasa y son insensibles a los inhibidores tipo 1. Este tipo de fosfatasas, también son identificadas por sus requerimientos de cationes divalentes (Robles-Flores, 1993).

Nestler y Greengard (1994) que determinaron cuatro tipos de actividad de fosfatasa en el músculo, también las encontraron en el cerebro. Se han aislado cuatro fosfatasas del cerebro, entre las cuales está una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (posiblemente fosfatasa 2B) y una dependiente de Mg^{2+} y ATP (presumiblemente fosfatasa 1). La fosfatasa mejor caracterizada en el cerebro es la fosfatasa 2B, también llamada calcineurina (Robles-Flores, 1993).

La calcineurina ha sido aislada de homogenados de cerebro de bovino. Tiene una masa molecular de aproximadamente 80,000 daltones y está compuesta de dos unidades, una subunidad de 60,000 daltones y otra subunidad de 20,000 daltones. La subunidad de 60 kDa (acceptora de Ca^{2+}) pero también puede unirse a la calmodulina (Robles-Flores, 1993).

Se ha sugerido que la subunidad de 60 kDa es la subunidad catalítica de la enzima y que puede ser activada de dos formas: por calcio en interacción con la subunidad de 20 kDa o por un complejo Ca^{2+} /calmodulina; en cuyo caso, este complejo se une directamente a la subunidad catalítica, es decir, la de 60 kDa (Robles-Flores, 1993).

IV. Planteamiento del problema de investigación y objetivos.

Considerando que el trabajo de Miranda y Cols. (2000) describió que un estímulo gustativo novedoso desencadena una liberación significativa de acetilcolina en el núcleo basal magnocelular y al considerar que el NBM es el mayor proveedor de acetilcolina del manto cortical, se puede inferir que esta respuesta alcanzaría la corteza insular, donde en primer lugar activaría receptores muscarínicos.

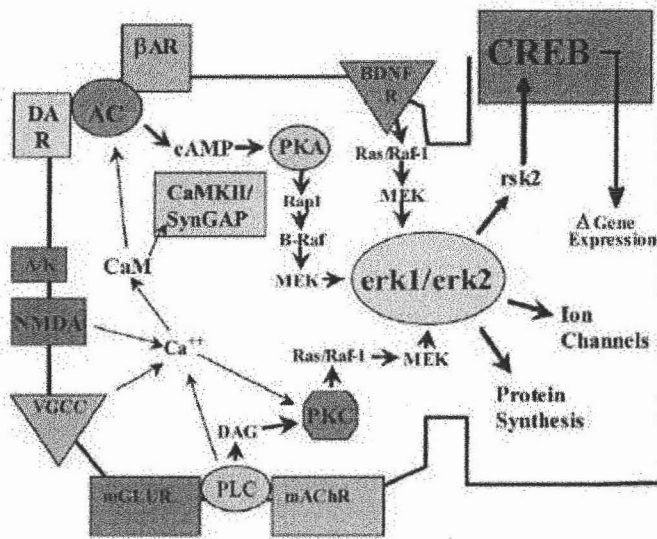


Figura 6. Integración de diversos mecanismos citoplasmáticos de señalización (Sweatt, 2001) mAChr receptor muscarínico a acetilcolina, mglu receptor metabotrópico al glutamato, NMDA receptor glutamatérgico ionotrópico, erk1 y 2 cinasa regulada extracelularmente, CREB (cyclic reponse element binding) factor de transcripción.

Desde hace ya algunos años, se ha demostrado la participación de los receptores al glutamato y la acetilcolina en la memoria y por consiguiente en la formación y consolidación de sus diferentes tipos (Ferreira et.al.,2002; Naor,

1996). Tras la activación de los receptores muscarínicos, Rosenblum (1997) encontró que la subunidad NR2B del receptor NMDA era fosforilada en residuos de tirosina como consecuencia de la presentación de un estímulo gustativo novedoso y como proceso involucrado en la formación del recuerdo.

De manera similar y de acuerdo con la propuesta del trabajo de Sweatt (2001) la estimulación gustativa novedosa activaría otros sistemas de neurotransmisión que incluyen el glutamatérgico, adrenérgico y dopaminérgico tras la activación de la amígdala. (Fig. 6).

Con la activación de los receptores metabotrópicos al glutamato, así como los beta-adrenérgicos y los dopaminérgicos (D1) estimularía la acción de la proteína cinasa A y la proteína cinasa C, que al fosforilar las serinas de las subunidades 2A y 2B potenciaría la respuesta del receptor a los agonistas y lo anterior mantendría más tiempo activo el canal (Sweatt 2001 y Jiménez y Tapia, 2004).

Lo anterior facilitaría el flujo de cationes de calcio hacia el interior de la neurona, esto resultaría en una mayor activación de la proteína cinasa C, de la fosforilación de la CaMKII, así también de la activación de la cascada de las MAP cinasas, que tendría como efector la activación de factores de transcripción como CREB, c-Fos y c-Jun.

Considerando la información ya presentada, el trabajo experimental realizado en esta tesis se enfocará al papel de la fosforilación en serinas de las subunidades NR2A y NR2B en la atenuación de la neofobia.

V. Metodología.

Sujetos.

Se utilizaron 45 ratas macho de la cepa Wistar facilitadas por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M. con peso 280-310 g al inicio del experimento. Se mantuvieron en cajas individuales en un ciclo normal de 12 hrs. luz por 12 hrs. oscuridad. Todas las manipulaciones y procedimientos conductuales se llevaron al cabo durante la fase de luz. Las ratas contaron con agua y comida ad libitum excepto durante los procedimientos conductuales. El protocolo de investigación fue regulado por el personal del bioterio, además de ajustarse a los artículos 77, 78, 79 y 80 del Código ético del Psicólogo para el manejo de animales (SMP, 2003).

Procedimiento conductual (entrenamiento).

El primer día se le retiró el bebedero a los animales y se ajustaron a un régimen de privación de agua durante 24 hrs. Al finalizar este periodo, se les sometió al siguiente entrenamiento: pudieron beber libremente durante 15 min. cada día por un periodo de tres días (línea base).

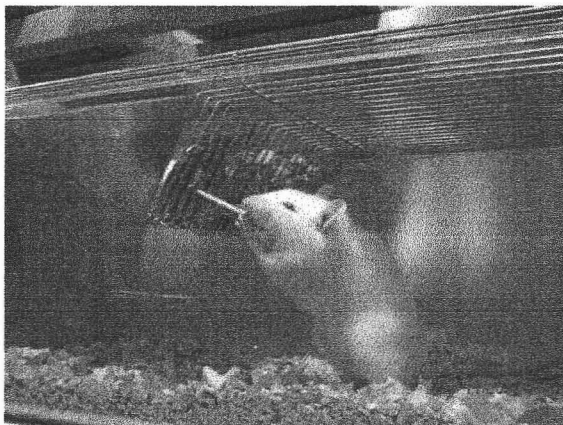


Figura 7. Rata bebiendo de una probeta graduada.

A continuación y de acuerdo al grupo experimental, se les cambió el agua, por una solución de sacarina.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Grupo	Entrenamiento			Adquisición			
G sac 3	Priv	LB 1	LB 2	LB 3	Sac 1	Sac 2	Sac 3
G sac 2	*	Priv	LB 1	LB 2	LB 3	Sac 1	Sac 2
G sac 1	*	*	Priv	LB 1	LB 2	LB 3	Sac 1
G H2O	*	*	Priv	LB 1	LB 2	LB 3	H2O

* Ningún tratamiento.

Priv Privación de líquidos.

LB Línea base de consumo de líquido.

Sac Presentación de sacarina

Se utilizaron las siguientes concentraciones de sacarina (intensidad del estímulo):

Sacarina 0.05%

Sacarina 0.10%

Sacarina 0.25%

Técnicas utilizadas.

Decapitación / Tratamiento del tejido cortical.

El séptimo día se mantuvo el protocolo habitual de los días anteriores, con la variante que quince minutos después de retirado el bebedero, es decir, media hora después de la presentación del mismo, los animales fueron decapitados y extraído su cerebro en 45 segundos aproximadamente. Éstos fueron colocados en una solución isotónica de cloruro de sodio para limpiar el tejido de sangre y enfriarlo, también fue necesario mantener el cerebro inmerso en esta solución a cero grados para detener la actividad enzimática y evitar la degradación natural de proteínas.

El material para disección y los tubos Eppendorf donde se almacenaron las muestras se mantuvieron también alrededor de 0°. Después se disectó la corteza insular (considerando la arteria cerebral media, el quiasma óptico y el hipocampo como referencia), ésta se mantuvo en un tubo Eppendorf con un Buffer de lisis # 1 (Kit para inmunoprecipitación, Roche Alemania) adicionado con inhibidores de fosfatasas (ortovanadato y fluoruro de sodio OV-Na y FINa, Sigma) para inhibir la actividad enzimática y preservar en la medida de lo posible la integridad de las biomoléculas.

Ya con la fracción de tejido, se sonicó (Sonifier Siemmens, Alemania) en 95 μ l de Buffer de lisis # 1 y se tomaron 5 μ l para cuantificar proteínas (Protocolo estándar de Lowry).

Inmunoprecipitación de serinas.

Se preincubaron 200 μ l de buffer de lisis con 50 μ l de proteína G-agarosa (Merck, Alemania) mas 5 μ l de anticuerpo contra las fosfo-serinas (Sigma, Aldrich) durante 4 horas. Después se le agregaron 2000 μ g de proteína del homogenado total y más buffer de lisis # 1 para obtener un volumen total de 553 μ l. Se incubó a cero grados durante 18 hrs.

Se hicieron 5 lavados de 15 minutos con buffer de lisis: dos lavados con buffer # 1, dos lavados con buffer # 2 y un lavado con buffer # 3 (Kit para inmunoprecipitación, Roche).

Tras cada lavado, se centrifugó a 12000g por 45 segundos aproximadamente. Se decantó el sobrenadante y se le agregaron 200 μ l más del buffer correspondiente. Una vez que el sedimento fue precipitado, se le agregó 25 μ l de Laemmli buffer con β -mercaptoetanol al 5%.

Ya con la mezcla de proteínas precipitadas y el Laemmli Buffer se calentó durante 3 minutos y se sometió a centrifugación nuevamente (para separar la proteína G). Esta vez lo que se recuperó fue el sobrenadante, no el sedimento.

Cuantificación de proteínas.

Para determinar la cantidad total de microgramos de proteína en las muestras de tejido cortical se utilizó el protocolo estándar de Lowry, este consiste en una medida indirecta de la cantidad de microgramos por microlitros, con una curva patron de albúmina bovina (Sigma, EE.UU.).

Electroforesis.

Se utilizó un gel de poli-acrilamida al 7.5% según el protocolo estándar de Millipore (2003) y se cargó con 20 μ l del precipitado por carril en el gel. Éste se corrió durante 4 horas a 60 volts.

Electrotransferencia (Blotting).

Una vez que se recuperó el gel con las proteínas separadas, se le puso a transferir en una membrana de nitrocelulosa a 23 Volts durante 18 horas, todo el proceso se realizó a una temperatura de 6° C (Protocolo de Transferencia en Tanque, Millipore 2003).

Inmunodetección (anti-NR2A y anti-NR2B).

Ya transferidas las proteínas, la membrana se bloqueó por 1 hora con PBS Tween BSA 1% (Buffer de fosfatos con el detergente Tween y albúmina Bovina, Sigma) para evitar pegado inespecífico de los anticuerpos y se puso a incubar con el anticuerpo primario contra la subunidad NR2 "A" o "B" (monoclonal anti-NMDA 1 o 2, dilución 1:500, Sigma) disuelto en PBS Tween con BSA 1% durante tres horas (técnica por flotación) después se lavó de nuevo tres veces durante 5 minutos con PBS Tween y se le agregó el anticuerpo secundario (IgG anti mouse, dilución 1:10000, Jackson) y se volvió a dejar en flotación durante una hora más.

Al finalizar, se enjuagó la membrana 2 veces con PBS Tween y 1 vez con PBS durante 10 minutos y se incubó la membrana durante 20 minutos en

el reactivo de quimioluminiscencia (Dilución 1:1, West Pico Technologies). Se preparó de 10 a 15 minutos antes de ser utilizado.

Revelado

En un cassette para exposición se colocó la membrana, y en total oscuridad se le expuso al papel fotográfico (Kodak, 2003). Para después, sumergirlo en solución reveladora, agua, solución fijadora y agua (en ese orden) . Finalizado el proceso, se puso a secar el papel fotográfico a temperatura ambiente.

Densitometría

Las placas del revelado se digitalizaron con un scanner (Hewlet Packard, Scanjet EE.UU.) y las imágenes se analizaron con el programa Image J (NIH Software, EE.UU.).

Análisis Estadístico

Para analizar los datos y determinar su significancia estadística se utilizó el paquete estadístico Statview versión 5.0 (BiotechSoftware, EE.UU.)

VI. Resultados.

Se evaluó la correlación entre los datos de los geles y los ensayos conductuales. Se analizó el volumen de líquido que bebieron los animales durante los tres primeros días del entrenamiento y su media se consideró la línea base en relación al consumo durante la fase experimental. Por otro lado, el consumo de cada animal durante el experimento, ya sea en una, dos o tres ocasiones, fue el parámetro conductual que indicó la familiaridad del estímulo gustativo y la consolidación del mismo. También se analizaron las modificaciones del receptor NMDA a través del western .

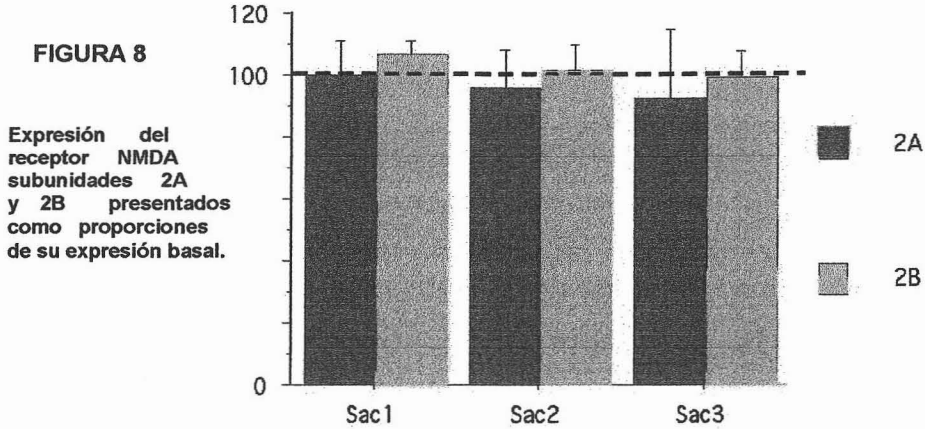
En el análisis tanto de las densidades ópticas como de la ingesta de líquidos se utilizó un ANOVA factorial para evaluar las interacciones entre las diferentes condiciones experimentales, determinar si existen diferencias estadísticamente significativas y con qué grado de confiabilidad estadística.

Para determinar entre que condiciones existen estas diferencias se utilizó la prueba post hoc de Fisher. En las siguientes gráficas se presenta la significancia estadística entre grupos de la siguiente manera:

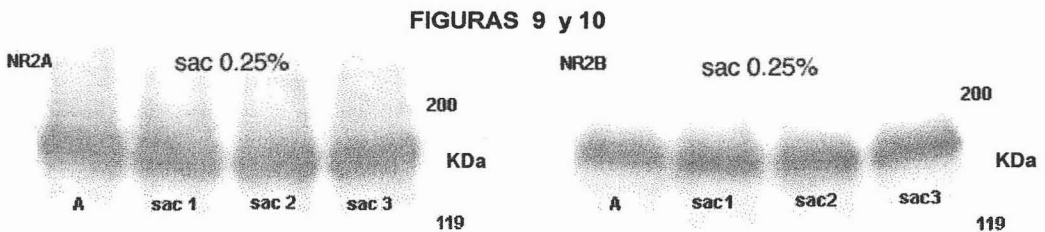
*	P< 0.05	95% de certeza estadística
**	P< 0.01	99% de certeza estadística
***	P< 0.0001	99.99% de certeza estadística

Primer Experimento

Grupo Control para determinar la expresión total del receptor NMDA durante las condiciones experimentales.



La gráfica 8 representa la cuantificación de las densidades ópticas obtenidas de los geles (figs 9 y 10) que se muestran abajo, éstas son representativas de cuatro experimentos que se realizaron para determinar si la cantidad total de receptor y sus subunidades variaba durante el entrenamiento y experimentación; los datos se muestran como porcentajes de la basal y estas representan la cantidad total del receptor NMDA precipitado durante las tres condiciones temporales: el día uno, dos y tres; además de la presencia o no del estímulo novedoso. Como se observa en las gráficas no hay cambio significativo en la cantidad del receptor por efectos del entrenamiento y la estimulación.



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

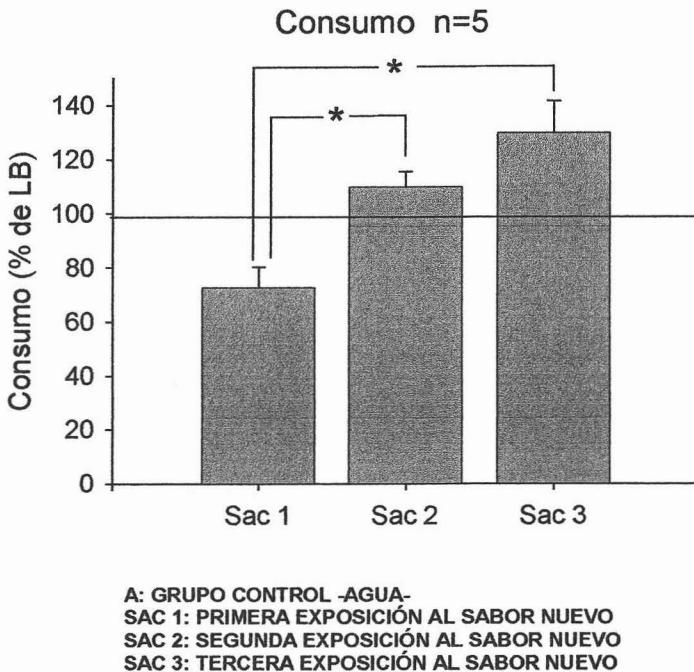
Segundo Experimento

Condiciones Experimentales

Intensidad del Estímulo: Concentración de Sacarina 0.05%

Exposición en una, dos y tres ocasiones al estímulo novedoso.

FIGURA 11



En la figura 11 se muestra el consumo de líquido de cinco grupos de animales durante las tres exposiciones de éstos al sabor novedoso, en este caso la dilución de sacarina fue al 0.05%, los datos se presentan como porcentajes de su consumo basal, es decir, el promedio que bebieron durante los tres primeros días del entrenamiento (LB línea base). Se observa una caída en el consumo en un treinta por ciento el primer día, que se recupera al segundo e inclusive supera la basal el tercer día en un veinticinco por ciento.

FIGURA 12

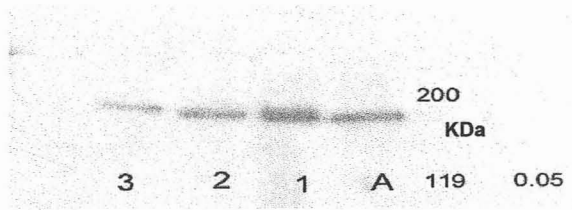
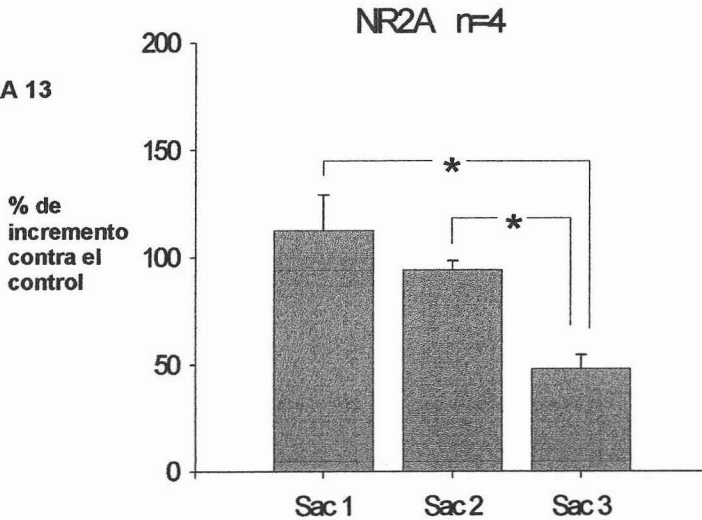


FIGURA 13



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

En la figura 12 se muestra un gel representativo de cuatro experimentos que se realizaron para la inmunodetección de la subunidad 2A; se puede apreciar un aumento en la banda que representa el primer día de estimulación y un decremento sucesivo. Abajo en la figura 13 se graficaron las densidades ópticas de los cuatro experimentos y se encontró que había una modificación importante en la subunidad 2A durante la fase experimental y que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ya que la fosforilación se incrementa cien por ciento en el primer día, se mantiene un ochenta por ciento arriba de la basal el segundo día y se mantiene cincuenta por ciento arriba de la actividad normal el tercer día

FIGURA 14

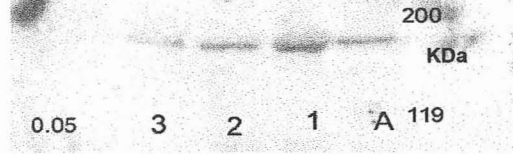
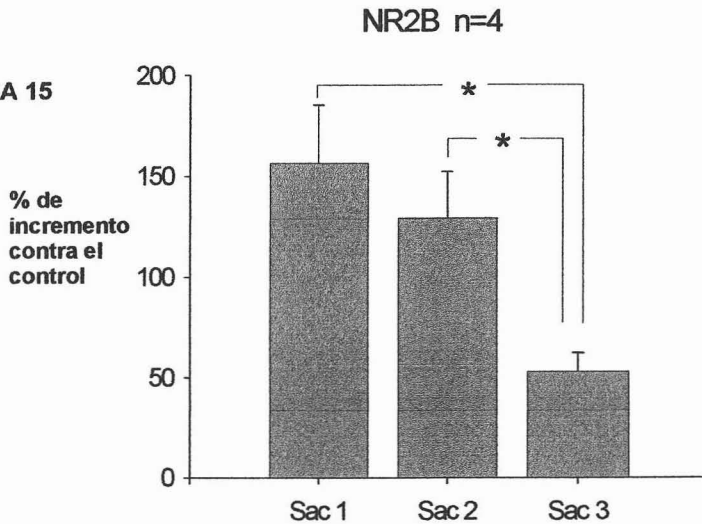


FIGURA 15



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

En la figura 14 se muestra un gel representativo de cuatro que se realizaron para la inmunodetección de la subunidad 2B; se puede apreciar una aumento en la banda que representa el primer día de estimulación y un decremento sucesivo. Abajo en la figura 15 se graficaron las densidades ópticas y se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas pues el primer día de estimulación la actividad de la subunidad 2B aumento ciento cincuenta por ciento, el segundo día disminuyo a ciento veinte y el tercer día disminuyo a un cincuenta por ciento, en todos los casos el incremento que se observa es superior a la basal de agua.

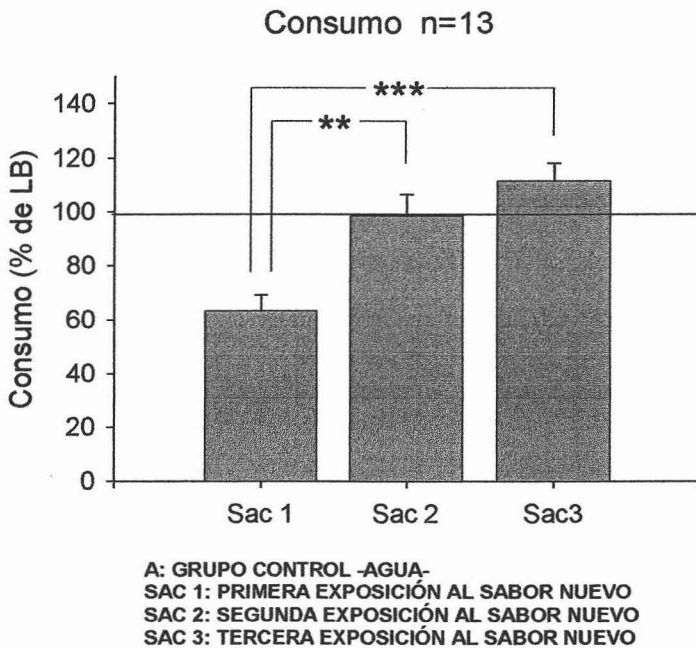
Tercer Experimento

Condiciones Experimentales

Intensidad del Estímulo: Concentración de Sacarina 0.10%

Exposición en una, dos y tres ocasiones al estímulo novedoso.

FIGURA 16



En la gráfica 16 se muestra el consumo de líquido de trece grupos de animales durante las tres exposiciones de éstos al sabor novedoso, en este caso la dilución de sacarina fue al 0.10%, los datos se presentan como porcentajes de su consumo basal, es decir, el promedio que bebieron durante los tres primeros días del entrenamiento (línea base). En el primer día los animales solo bebieron un sesenta por ciento de lo normal, su consumo se recuperó casi a los niveles normales el segundo día y se incrementó quince por ciento el tercer día.

FIGURA 17

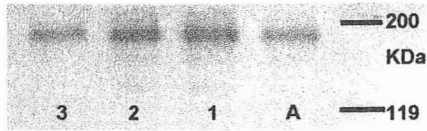
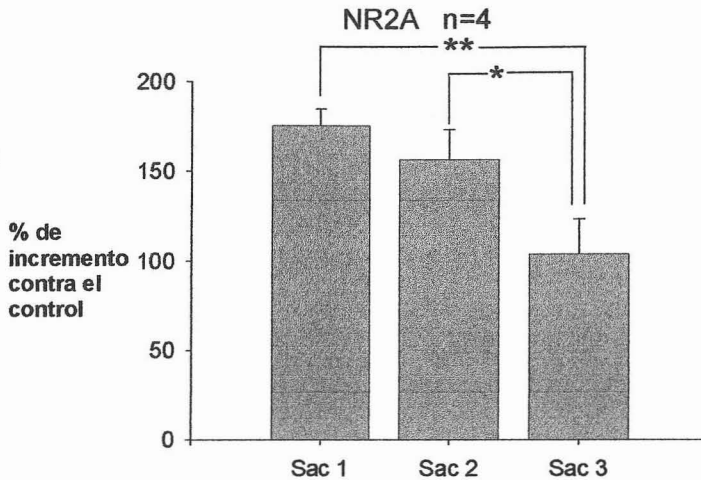


FIGURA 18



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

En la figura 17 se muestra un gel representativo de cuatro experimentos que se realizaron para la inmunodetección de la subunidad 2A; se puede apreciar un aumento en la banda que representa el primer día de estimulación y un decremento sucesivo. Abajo en la figura 18 se graficaron las densidades ópticas de los cuatro experimentos y se encontró que había una modificación importante en el receptor NMDA durante la fase experimental y que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el primer día la subunidad 2A aumenta un ciento setenta y cinco por ciento su actividad, el segundo día muestra un aumento de ciento cincuenta por ciento y en el tercer día recupera su actividad normal.

FIGURA 19

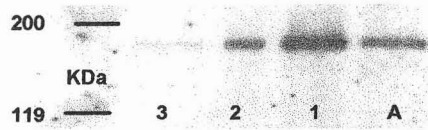
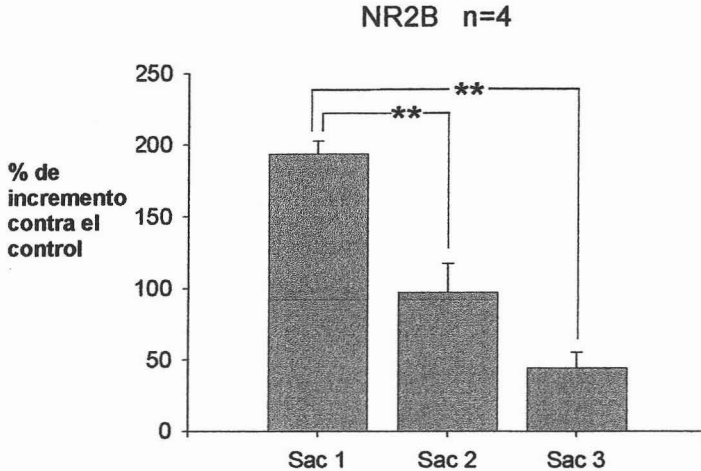


FIGURA 20



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

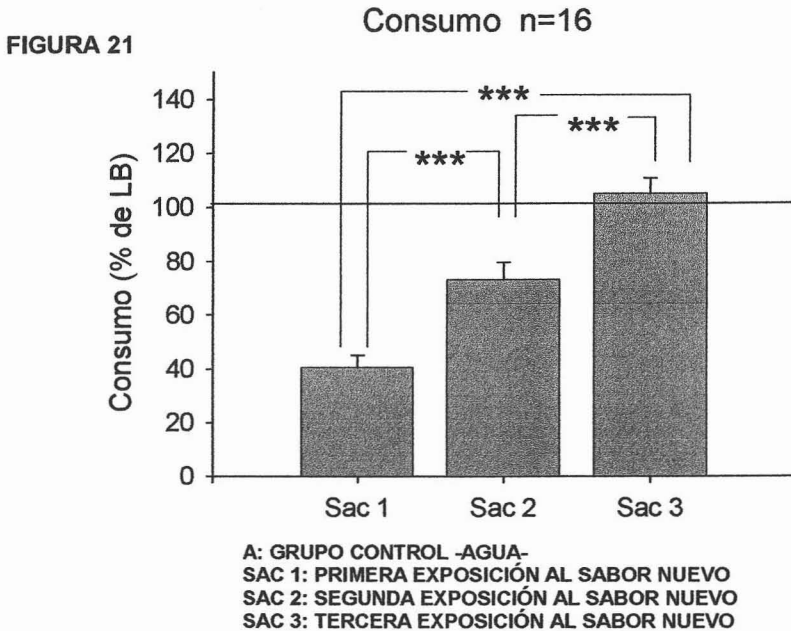
En la figura 19 se muestra un gel representativo de cuatro experimentos que se realizaron para la inmunodetección de la subunidad 2B; se puede apreciar un aumento en la banda que representa el primer día de estimulación y un decremento sucesivo. Abajo en la figura 20 se graficaron las densidades ópticas de los cuatro experimentos y se encontró que había una modificación importante en la subunidad 2B durante la fase experimental y que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se observa un aumento de ciento ochenta por ciento el primer día, su disminución a cien por ciento el segundo día, hasta un cincuenta por ciento por encima de la basal el tercer día.

Cuarto Experimento

Condiciones Experimentales

Intensidad del Estímulo: Concentración de Sacarina 0.25%

Exposición en una, dos y tres ocasiones al estímulo novedoso.



En la gráfica 21 se muestra el consumo de líquido de dieciséis grupos de animales durante las tres exposiciones de éstos al sabor novedoso, en este caso la dilución de sacarina fue al 0.25%, los datos se presentan como porcentajes de su consumo basal, es decir, el promedio que bebieron durante los tres primeros días del entrenamiento (línea base). En el primer día los animales solo bebieron un cuarenta por ciento de lo normal, su consumo aumento al ochenta por ciento de su consumo normal el segundo día y recupero su nivel normal el tercer día del experimento.

FIGURA 22

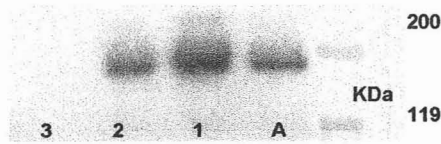
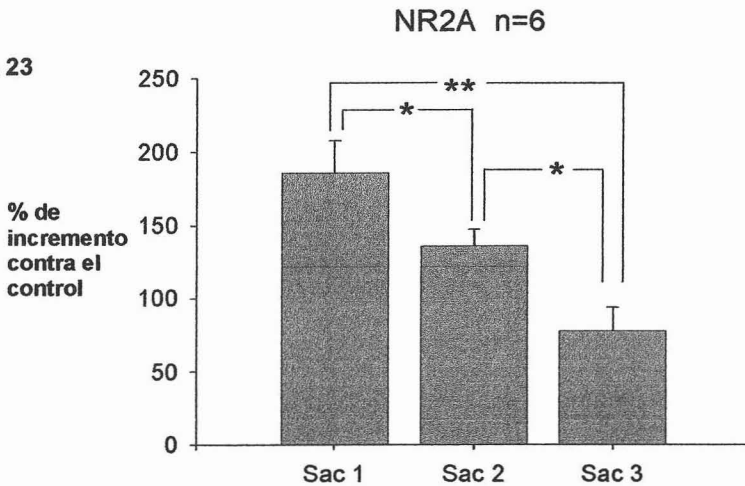


FIGURA 23



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

En la figura 22 se muestra un gel representativo de seis experimentos que se realizaron para la inmunodetección de la subunidad 2A; se puede apreciar un aumento en la banda que representa el primer día de estimulación y un decremento sucesivo. Abajo en la figura 23 se graficaron las densidades ópticas de los seis experimentos y se encontró que había una modificación importante en el receptor NMDA durante la fase experimental y que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el primer día la subunidad 2A aumenta un ciento ochenta por ciento su actividad, el segundo día muestra un aumento de ciento treinta por ciento y en el tercer se mantiene setenta y cinco por encima de la actividad normal.

FIGURA 24

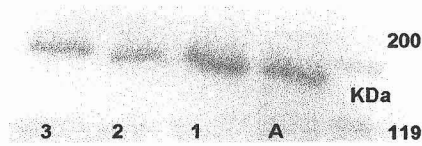
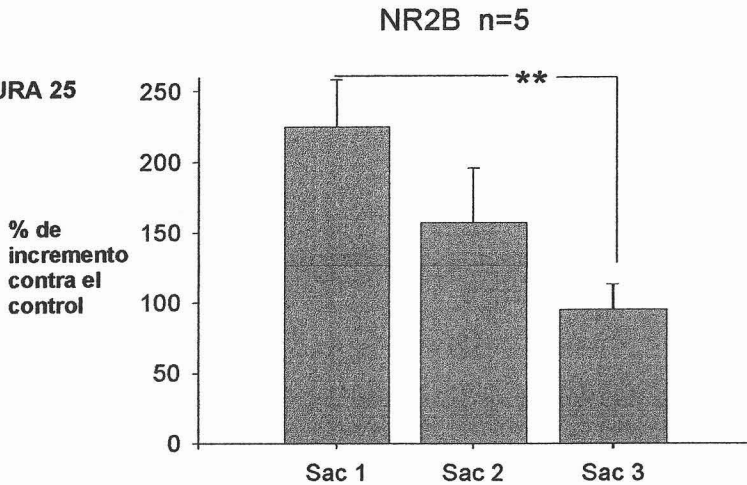


FIGURA 25



A: GRUPO CONTROL -AGUA-
 SAC 1: PRIMERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 2: SEGUNDA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO
 SAC 3: TERCERA EXPOSICIÓN AL SABOR NUEVO

En la figura 24 se muestra un gel representativo de cinco experimentos que se realizaron para la inmunodetección de la subunidad 2B; se puede apreciar un aumento en la banda que representa el primer día de estimulación y un decremento sucesivo. Abajo en la figura 25, se graficaron las densidades ópticas de los cinco experimentos y se encontró que había una modificación importante en la subunidad 2B durante la fase experimental y que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se observa un aumento de doscientos veinticinco por ciento el primer día, su disminución a ciento sesenta por ciento el segundo día, hasta un cien por ciento por encima de la basal el tercer día.

VII. Discusión.

Todos los resultados mostraron modificaciones importantes en el receptor NMDA en ambas subunidades. En todas las concentraciones del estímulo hubo un aumento en la banda que de las subunidades precipitadas en no menos de cincuenta por ciento, lo cual nos habla de la participación del receptor en la memoria de reconocimiento gustativo en la corteza insular, sin embargo, no podemos hablar de que esta actividad se deba a la fosforilación del receptor en serinas pues datos de experimentos posteriores mostraron nueva evidencia que sugirió problemas con la metodología utilizada.

De acuerdo con lo planteado originalmente y con la metodología seguida, en un principio se creyó que las bandas de los geles representaban la fosforilación del receptor NMDA; ya que se pensó que al precipitar las serinas y después marcar el receptor, observaríamos únicamente el receptor fosforilado en la subunidad correspondiente. Sin embargo, estudios posteriores realizados en el laboratorio como controles para otros trabajos, demostraron que la metodología usada para los experimentos de este proyecto tuvo varios errores importantes.

En estos controles, se hicieron precipitaciones con solo la proteína G-agarosa y sin el anticuerpo contra serinas, y aun así, se observó el cambio descrito las bandas. Esto dio el primer indicio de los errores pues la sola presencia de la proteína G facilitaba la coprecipitación de diferentes complejos.

El primer error fue que se utilizó Nonidet, un detergente no iónico. Lo anterior llevo a que ni las densidades sinápticas ni los microdominios lipídicos dinámicos se lisaron propiamente, es decir, las proteínas membranales se mantuvieron en grandes complejos que junto a un exceso en la velocidad de centrifugación (12000g) provocó la precipitación de grandes segmentos membranales, en vez de únicamente los receptores fosforilados en residuos de serina como se hubiera esperado; estos grandes complejos eran finalmente separados con el beta-mercapto-etanol durante el último lavado de la

precipitación cuando se procedía a cargar el gel con lo que se suponía era ya el producto de la inmunoprecipitación específica.

Con los datos anteriores se hicieron modificaciones al protocolo original que llevó a utilizar el SDS (Dodecil sulfato de sodio) que es un detergente iónico y a bajar la velocidad de centrifugación a 2000g; con estos cambios se eliminaron los errores ya mencionados, pues el SDS separa tanto los microdominios lipídicos como las densidades sinápticas, además al bajar a 2000g la velocidad de centrifugación se evitó también precipitar grandes complejos. Una vez más se realizaron los experimentos y éstos revelaron que al menos con la sensibilidad de esta metodología no hay fosforilación del receptor NMDA en serinas, tanto en la subunidad 2A como en la 2B.

Por otro lado, aunque con estos experimentos se descartó la fosforilación como el origen de las modificaciones en los geles aun había que explicar a que se debían las variaciones pues estas eran constantes en todos los casos al variar la estimulación.

Dado que el primer experimento mostró que no había variaciones en la expresión del receptor y de sus subunidades, los cambios que se observan en las diferentes condiciones experimentales, que además muestran un patrón constante (reproducibles), se supondría que se deben a una reagrupación de los receptores.

Con esta evidencia nos remitimos a la literatura publicada y se encontró que hay varios trabajos publicados que analizan la participación de los microdominios lipídicos dinámicos en la fosforilación del receptor NMDA y su reagrupación en las densidades postsinápticas durante el entrenamiento de animales en tareas de aprendizaje (Hering, 2003; Besshoh, 2005).

Los microdominios lipídicos se localizan en la membrana celular y están compuestos principalmente por colesterol y esfingolípidos. Se ha informado la presencia de receptores NMDA organizados en estos dominios lipídicos, los cuales se encuentran asociados a proteínas membranales (Hering, 2003).

Estudios recientes han demostrado que existe una variedad muy grande de microdominios lipídicos, que están compuestos por diferentes grupos y proporciones de lípidos y proteínas, esto implica que pueden tener funciones diferentes (Hering, 2003).

Los receptores NMDA y los receptores AMPA presentan un patrón de flotación similar, apoyando la idea que estas proteínas postsinápticas existen en un tipo de microdominio similar (Hering, 2003).

Aun no se tiene evidencia suficiente para afirmar que lo que se observó en estos experimentos se debió enteramente a la reagrupación de los receptores en microdominios lipídicos dinámicos, los datos obtenidos hasta este momento en el laboratorio con la separación de las muestras en gradientes de sacarosa y experimentos control donde se incluyen en las muestras quelantes de colesterol (que resultan en la eliminación de los MLD) lo sugieren.

Abulrob (2005) describió el papel que las ciclodextrinas (oligosacáridos cíclicos que pueden fungir como quelantes de colesterol) pueden tener durante la isquemia ya que éstas presentaron un efecto neuroprotector. Se ha estudiado ampliamente el papel de los receptores NMDA y AMPA en la muerte neuronal por excitotoxicidad. Al ser el colesterol fundamental para la formación de la estructura de los MLDs y ya que ambos tipos de receptores se reagrupan en MLDs (Hering, 2003), se encontró que durante y después de la isquemia las ciclodextrinas protegían contra la degeneración; esto se atribuyó a la dependencia de colesterol que implica la formación de estos complejos heteroméricos (MLDs y DPs). Lo anterior evitó la sobreexcitación e ingreso masivo de cationes de calcio que finalmente llevarían a la muerte neuronal por excitotoxicidad.

En otros estudios, se encontró que tras una isquemia global transitoria hubo un incremento en la fosforilación en tirosinas del receptor NMDA en sus subunidades NR2A y NR2B y por la proteína cinasa C en la subunidad NR1.

Esto apoya el papel de la formación de los MLD y la fosforilación como eventos relacionados con plasticidad neuronal (Besshoh, 2005).

También se ha encontrado evidencia en la literatura de que esta reagrupación de receptores puede ser un primer nivel de procesamiento de la información. Agnati y colaboradores (2003) propone que tanto el estado de activación o inhibición, como la interacción entre los receptores de tipo canal y los de siete dominios transmembranales, participan y son un factor fundamental en la formación y evocación del recuerdo ya que forman complejos heteroméricos. En este trabajo se toca entre otros temas, la participación e interacción de los receptores NMDA en un aprendizaje motor no asociativo en los ganglios basales.

Por otro lado, las variaciones del receptor y sus subunidades siguieron un patrón común en todas las condiciones, como también en el registro conductual; lo cual sugiere que estos cambios del NMDA están relacionados con la formación de la memoria de reconocimiento gustativo.

Además que se puede observar una relación directamente proporcional entre la magnitud en los cambios observados en los geles, la respuesta conductual y la intensidad de la estimulación gustativa, lo cual nos indica su relación con la neofobia y su atenuación.

Finalmente y dadas las limitaciones de este trabajo, se tiene que continuar trabajando el tema para contar con evidencias claras de la participación de los MLD en este tipo de memoria en la corteza insular.

VIII. Conclusiones.

- 1. El receptor NMDA participa en la formación de la memoria gustativa.**
- 2. La intensidad de la estimulación gustativa (concentración de la sacarina) esta relacionada con los cambios observados en ambas subunidades, ya que presentan una relación inversamente proporcional, a mayor estimulación mayor es el cambio, lo cual sugiere que este proceso esta relacionado con la neofobia.**
- 3. Aunque la hipótesis original no fue confirmada, considerando que los resultados fueron reproducibles y los cambios significativos, se puede sugerir la participación de los MLDs en la formación del recuerdo gustativo.**

IX. Referencias.

Abulrob, A, Tauskela J., Mealing G, Brunette E., Faid K and Stanimirovic D.(2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 92, 1477–1486.

Agnati L., Franzen S., Ferre R., Franco R, Fuxe K. (2003) Possible role of intramembrane receptor-receptor interactions in memory and learning via formation of long-lived heteromeric complexes: focus on motor learning in the basal ganglia. *J Neural Transm (2003) [Suppl] 65: 195–222*

Al-Hallaq R.A., Jarabek B.R., Fu Z., Vicini S., Wolfe B.B., Yasuda R.P. (2002) Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol* 62:1119-1127.

Anderson, R. (1995) Learning and Memory. An integrated approach. Wiley Interscience, EE.UU.

Balderas, I., Ramirez-Amaya V. and Bermúdez-Rattoni F. (2004) Cambios morfológicos asociados a la memoria, *Revista de Neurología* 38 (10) 944-948.

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

Bermúdez-Rattoni F. (2001) Memoria. Donde reside y cómo se forma. Ed. Trillas, México.

Bermudez-Rattoni F. (2004) Molecular Mechanisms of Taste Recognition Memory. *Nature Neuroscience Reviews* (5) 2-10

Besshoh S., Bawa D., Teves L., Wallace C., Gurd J. (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 93, 186–194

Bures Jan (1998) *Conditioned Taste Aversion. Memory of Special Kind*. Oxford University Press, U.K.

Carlson N. (1996) *Fundamentos de Psicología Fisiológica*. Ed. Prentice Hall, México.

Domjan M. (1976) Determinants of the enhancement of flavored -water intake by prior exposure. *Journal of experimental Psychology* 2(1):17-27.

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

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

Freud, S. (1850) *Proyecto de Psicología para neurólogos*. En versión digital en CD -obras completas-. Editorial Paidós, España.

Galef, B. (1977) Mechanisms for the social transmission of acquired food preferences from adult to weanling rats. *Learning mechanisms in food selection*. Baylor University Press, EE.UU., pp 123-148.

Goodman y Gilman (1996) *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Novena Edición. Ed. McGraw Hill Vol. 1, México.

Hawkins L.M., Chazot P.L., Stephenson FA (1999) Biochemical evidence for the co-association of three N-methyl-D-aspartate (NMDA) R2 subunits in recombinant NMDA receptors. *J Biol Chem* 274:27211-27218.

- Hebb, Donald (1949) *The organization of Behavior*. Wiley Editores, EE.UU.
- Hering H. (2003) Lipid Rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines and surface AMPA receptor stability. *The Journal of Neuroscience* 23(8) 3262-3271.
- Jimenez y Tapia (2004) Biochemical Modulation of NMDA Receptors: Role in Conditioned Taste Aversion. *Biochemical Research* (29)1 161-168.
- Kandel E.R. (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* (294) 1030-1038.
- Kandel E.R. Jessel T.M. & Schwartz J.H. (2000) *Principles of neural science*, Fourth Edition, McGraw Hill, EE.UU.
- Manter y Gatz, (1996) *Neuroanatomía y Neurofisiología clínicas*. Ed. Manual Moderno, México.
- Meisami, M. (1991) Chemoreception. *Neural and integrative animal physiology* Willey & Lyss, EE.UU., pp 335-434.
- Miranda M., Ramírez-Lugo L., Bermúdez-Rattoni F. (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research* (759)141-148.
- Naor C. (1996) Transient impariment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioral Brain Research* (79)61-67.
- Nestler E. J., Greengard P. (1994) Protein phosphorylation and the regulation of neural function. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. C.J. Siegel, et. al. Raven Press, EE.UU. 449-474.
- Oh J.D., Edwards R.H., Woolf N. (1996) Choline acetyltransferase mRNA plasticity with Pavlovian conditioning. *Experimental Neurology* (140)95-99.

Orsetti M., Cassamenti F., Pepeu G. (1996) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Research* (724)89-96.

Park G.A., Pappas B.A., Murtha S.M., Ally A. (1992) Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neuroscience Letters* (143)259-262.

Ramírez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar M.L., Bermudez-Rattoni F. (2001) Spatial Long-Term Memory is Related to Mossy Fiber Synaptogenesis. *Journal of Neuroscience* 15:7340-7348

Robles-Flores M. (1993) Las cinasas y fosfatasa de proteínas: enzimas clave en la regulación de la actividad celular. *Comunicación neuroendocrina: bases celulares y moleculares*. C. Clapp y G. Martínez de la Escalera. Editores SMCF y CONACyT, México.

Rodnight R., Wofchuk S.T. (1992) Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays Biochem.* (27)91-102.

Rosenblum K., Berman D. Hazvi S., Lamprecht R., Dudai Y. (1997) NMDA Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of Its 2B Subunit in Taste Learning in the Rat Insular Cortex. *The Journal of Neuroscience*, July 1, 1997, 17(13):5129-5135

Rozin, P. (1977) The significance of learning mechanisms in food selection: some biology, psychology and sociology of the science. *Learning mechanisms in food selection*. Baylor University Press, EE.UU., pp 557-589.

Schorge S., Colquhoun D. (2003) Studies of NMDA receptor function stoichiometry with truncated and tandem subunits. *Journal of Neuroscience* (23)1151-1158.

Sociedad Mexicana de Psicología (2003) Código ético del psicólogo. Ed. Trillas, México.

Sweatt, D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry* (76) 1-10.

Tolman, E., Ritchie, B., and Kalish, D. (1946) Studies in Spatial Learning. I. Orientation and the Short-Cut, *Journal of Experimental Psychology* (36) 13-24.