



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

**PARTICIPACIÓN DEL GLUTAMATO Y EL ÓXIDO NÍTRICO
EN EL BULBO OLFATORIO DURANTE EL APRENDIZAJE
AVERSIVO AL OLOR**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A:
BIÓL. ANGÉLICA IVANIA QUIROZ ZALDÍVAR**

TUTOR

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN

México, D. F.

Marzo 2006



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.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la DGEP por el apoyo económico otorgado a través de sus programas de becas para estudios de Maestría, registro No. 167191, dentro del cual fue realizada esta tesis.

A mi comité tutorial:

DR. Gabriel Roldán Roldán

Dr. Oscar Prospero García

Dr. Constantino Macias García

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Dr. Gabriel Roldán Roldán por encaminarme en este arduo trabajo de constante aprendizaje. Por tus largas charlas en tardes lluviosas y experiencias compartidas tanto en el laboratorio como fuera de el, gracias. A ti mi padre académico.

A la Dra. Leticia Verdugo Díaz por el tiempo dedicado a corregir este escrito, por sus comentarios y observaciones.

A la Dra. Gina Lorena Quirarte por su interés en darle mayor calidad a este documento, por sus valiosas sugerencias y aportaciones, así como su apreciable apoyo de que las cosas se deben hacer bien.

Dra. Selva Rivas Arancibia por su ayuda en la revisión de esta tesis.

Dra. Robyn Elizabeth Hudson por su constancia, sugerencias y grandes aportaciones al orden de este escrito, así como sus palabras de aliento.

A mis compañeros del laboratorio sin cuya ayuda nada hubiera sido igual, Héctor, Cesar, Oscar A, Jorge T, Martucha, Eric (mi mejor amiga)..... gracias.

A todos aquellos que sufrieron y vivieron conmigo esta experiencia llamada maestría, Chaparrin, German, Martincillo, Lizzet, Adriana.

A las súper chicas de la coordinación de Fisiología de la Facultad de Medicina, Elvira, Isabel, Adriana por su apoyo y disposición, cuando lo necesite, así como a Lilia y Lolita de la coordinación del Posgrado en Ciencia Biológicas.

A las ratitas que sin deberla y temerla donaron sus vidas a la ciencia.

A MI PADRE ROBERTO

A MI MADRE CONSUELO

POR ENSEÑARME QUE LA VIDA ESTA LLENA DE APRENDIZAJE Y MEMORIA
CONSTANTE.

A MI HERMANO RICARDO

A MI HERMANA ISABEL

POR LA OPORTUNIDAD DE SABER LO QUE ES TENERLOS

A LUPITA

POR EL CONSTANTE APOYO, LA PACIENCIA Y LAS SONRISAS

A WATASHI

POR TODO EL AMOR Y LOS DETALLES BRINDADOS DIA CON DIA, POR
TRAER A MI VIDA A MAYA Y A CUCA

INDICE

1. Abreviaturas	6
2. Resumen.	7
3. Introducción.....	9
4. Sistema Olfatorio.....	11
4.1 Epitelio Olfatorio.....	11
4.2 Transducción de las señales olfatorias.....	13
4.3 El bulbo olfatorio.....	15
5. Glutamato.....	16
5.1 Receptores tipo NMDA.....	17
5.2 Glutamato y aprendizaje olfativo.....	19
6. Óxido Nítrico.....	22
6.1 Papel del ON en el aprendizaje y la memoria.....	25
6.2 ON y aprendizaje olfativo.....	26
7. Justificación del estudio.....	30
7.1 Objetivos.....	31
7.2 Hipótesis.....	31
8. Material y Método.....	32
9. Experimentos	
9.1 Experimento 1.....	34
9.2 Experimento 2.....	37
9.3 Experimento 3.....	40
9.4 Experimento 4.....	43
10. Conclusiones.....	47
11. Apéndice.....	48
12. Bibliografía.....	50

1. ABREVIATURAS

Acido D(-)-2 amino 5 fosfonopentanoico.....	APV
Ácido D-amino-3-hidroxi-5- metil-4-isoxazolepropiónico.....	AMPA
Ácido gamma amino butírico.....	GABA
Adenosin monofosfato cíclico.....	AMPC
Aprendizaje aversivo al olor.....	AAO
Bulbo olfatorio.....	BO
Cloruro de litio.....	LiCl
Depresión a largo plazo.....	DLP
Dihidronicotinamida adenin dinucleotido fosfato.....	NADPH
Glutamato.....	Glu
Guanosin monofosfato cíclico.....	GMPC
Indice de preferencia.....	IP
Kainato.....	KA
L-nitroarginina-metil ester.....	L-NAME
Potenciación a largo plazo.....	LTP
Magnesio.....	Mg
Neurona receptora olfatoria.....	NRO
N-metil de aspartato.....	NMDA
Oxido nítrico sintasa.....	ONS
Oxido nítrico.....	ON
Potenciación a largo plazo.....	PLP
Sistema Nervioso Central.....	SNC

2. RESUMEN

El glutamato, uno de los neurotransmisores más abundantes en el sistema nervioso realiza su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Hasta el momento se han identificado varios tipos de receptores para el glutamato, algunos de ellos son canales iónicos regulados por ligando, mientras que otros, denominados receptores metabotrópicos de glutamato, están acoplados a proteínas G y pueden actuar indirectamente sobre diversos canales iónicos.

Por otro lado, el ON actúa como mensajero retrógrado, regulando la liberación de algunos neurotransmisores implicados en el aprendizaje y la formación de la memoria. Asimismo, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de ON impide el aprendizaje en diversos modelos animales, sin embargo, poco se sabe sobre su participación en la integración de la memoria olfativa y gustativa.

En el presente estudio se evaluó la participación del glutamato y del ON, en el bulbo olfatorio (BO) durante el AAO. Se utilizaron ratas macho de 250 a 350 gramos de la cepa Wistar, fueron canulados bilateralmente mediante cirugía estereotáxica en la zona medial del BO.

En el primer experimento se evaluó el efecto de un bloqueador de los receptores a NMDA (el MK-801) en el BO sobre la adquisición del AAO. Los animales previamente operados fueron privados de agua por 24 horas y habituados a beber en una caja de condicionamiento por dos días. Posteriormente, el día 3, se expusieron a un olor novedoso (esencia de limón) mientras bebían agua y el día 4 (adquisición), se inyectaron intrabulbarmente con 1 μ l de solución salina isotónica o MK-801 en concentración de 10 o 50 μ M, 10 minutos antes de exponerse a esencia de nuez (olor aversivo), mientras bebieron agua por 10 minutos; inmediatamente después se inyectaron intraperitonealmente con LiCl 0.15 M. Dos días más tarde se realizó la prueba de evocación comparándose la cantidad de agua bebida con las esencias inocua (limón) y aversiva (nuez). Los resultados mostraron que dos concentraciones (10 y 50 μ M) de MK-801 provocaron un claro efecto amnésico dependiente de la dosis.

En el segundo experimento se analizó el efecto del MK-801 sobre la consolidación del AAO. Los animales fueron sometidos a un procedimiento similar al descrito, salvo que el día 4 (adquisición), bebieron agua por 10 minutos mientras fueron expuestos a la esencia de nuez; inmediatamente después se inyectaron intraperitonealmente con LiCl 0.15 M y

posteriormente se realizó la infusión intrabulbar de MK-801 en concentración de 50 μM a los 30, 60 y 180 minutos después de la administración del LiCl. El grupo control presentó una fuerte aversión (IP = 7%) lo cual indica un buen aprendizaje, mientras que los grupos tratados con MK-801 a los 30, 60 y 180 minutos presentaron un IP de 76%, 59% y 43% respectivamente, revelando que los sujetos no aprendieron a diferenciar entre el estímulo inocuo y el aversivo.

El tercer experimento se hizo con el fin de evaluar el efecto del MK-801 en la evocación del AAO. Los animales se sometieron al mismo procedimiento del primer experimento, salvo que el día de la adquisición no se hizo ninguna manipulación intrabulbar, es decir, se entrenaron libres de drogas, y el día 6 (retención), se inyectaron intrabulbarmente con MK-801 50 μM , 15 minutos antes de la prueba de evocación. El análisis de los resultados hizo evidente que el MK-801 no afecta en absoluto el recuerdo del olor aversivo, puesto que los animales lo distinguen perfectamente del inocuo, a partir de lo cual podemos inferir que para evocar un olor aprendido no se precisa de la participación del glutamato en el BO.

Finalmente, en el cuarto experimento se estudió la participación del ON en la adquisición del AAO, siguiendo el mismo diseño de los experimentos anteriores, excepto que el tercer día se expusieron a un olor novedoso (esencia de Vainilla) mientras bebían agua, el cuarto día se inyectaron intrabulbarmente con 1 μl de solución salina isotónica (grupo control) o L-NAME en una concentración de 100, 200 o 400 μM , 10 minutos antes de ser llevados a la caja de registro, donde fueron expuestos a la esencia de almendra, mientras bebieron agua por 10 minutos. Se observó un IP de 3% para el grupo control, mientras que en los tres grupos tratados con L-NAME, el IP es prácticamente idéntico (12%). Esto indica que no existe una relación entre la dosis administrada y la respuesta obtenida, y sugiere que la inhibición de la síntesis de ON en el BO no provoca efecto alguno sobre el AAO.

Concluimos que la señalización nitrérgica en el BO no es esencial para la adquisición del AAO, y que la neurotransmisión glutamatérgica mediada por los receptores a NMDA participa tanto en la adquisición como en la consolidación del AAO, pero no es indispensable para la evocación de este tipo de memoria aversiva.

3. INTRODUCCIÓN

Históricamente uno de los mayores retos de las neurociencias ha sido entender cómo es que los organismos adquieren información, la almacenan y la evocan, modificando consecuentemente su conducta ante una variedad de estímulos ambientales; en otras palabras, en qué consisten los procesos de aprendizaje y memoria a nivel sistémico, celular y molecular.

Específicamente, se ha postulado que las experiencias modifican al sistema nervioso central (SNC) de tal manera que los arreglos neuronales conforman circuitos que codifican los conocimientos y habilidades adquiridos. Este proceso de codificación o "almacenamiento" y por lo tanto de reorganización del SNC, comienza desde el desarrollo intrauterino, continúa de manera muy acentuada en el periodo postnatal, a lo largo de toda la infancia y va declinando paulatinamente en la madurez, sin embargo, nunca se pierde esta capacidad del todo. En este sentido, sería correcto decir que el propio proceso de maduración del SNC depende de la estimulación externa y sufre severas atrofas si se priva de dichos estímulos, a veces de forma irreversible (Zuo y cols. 2005).

Una herramienta importante en la búsqueda de los mecanismos neuronales del aprendizaje y la formación de la memoria es la selección de un modelo conductual apropiado que nos permita desde la identificación de los distintos circuitos celulares hasta los mecanismos moleculares a lo largo del proceso de aprendizaje. El aprendizaje asociativo de tipo olfativo puede ser un modelo idóneo para este fin, pues permite el análisis espacial y temporal de la formación de una huella de memoria olfativa tanto en mamíferos como en invertebrados a todos los niveles (Brennan y cols. 1997; Eichenbaum 1998; Roman y cols 2004;

McLean y cols 2004). El olfato es uno de los sentidos menos comprendidos y estudiados, y hasta hace muy poco la codificación de los olores era un verdadero misterio (Buck y Axel, 1991); asimismo, es una modalidad sensorial muy antigua y está basada en principios de organización neuronal y funcional, que parece ser similar en los distintos *phyla* de animales, en los cuales se pueden encontrar características comunes (Shirsat y cols 1993; Eisthen 1997).

Las funciones olfativas se pueden situar básicamente en dos contextos distintos: el sociosexual y reproductivo por un lado, y el alimenticio, por el otro. En el primer caso, la percepción de los olores de conspecíficos les permite a los organismos determinar el sexo, la jerarquía social y el período reproductivo de una pareja potencial e incluso el estado de salud y consanguinidad de sus congéneres. El aprendizaje olfativo es determinante para establecer vínculos de pareja (Brennan y cols. 1995) y de tipo madre cría (Kendrick y cols 1997) en diversas especies. Para la mayoría de los mamíferos los olores constituyen el principal estímulo sexual. En cuanto al contexto alimenticio, la detección de los olores es fundamental para la formación de los hábitos de consumo; el olfato, incluso más que el gusto, confiere a la comida cualidades afectivas de agrado o desagrado sobresalientes. Debido a esto, el olfato resulta quizá aún más importante que el gusto en la selección del alimento. De hecho, cuando un animal ha ingerido una comida que le provocó malestar, a menudo muestra una sensación de asco y repugnancia con solo olerla en una segunda ocasión. Otros olores que hayan resultado desagradables en el pasado pueden también provocar esta sensación (Rusiniak y cols 1982; Sandner 2004).

El sistema olfativo de los mamíferos es quizás el detector químico más complejo que existe. Este es el discriminador entre una inmensa y diversa variedad de olores. Existen más de 10,000 moléculas olorosas agrupadas en muchas clases químicas y estructuras químicas, desde cadenas simples de

moléculas orgánicas alifáticas hasta largas y complejas moléculas aromáticas con múltiples grupos funcionales. En muchos casos el cambio de un solo átomo de carbono hace la diferencia entre un olor y otro, en otros, las interacciones químicas producen percepciones olfativas similares entre moléculas muy diferentes (Purves, 2001). El sistema olfativo humano es capaz de discriminar miles de sustancias olorosas. Sin embargo, cuando se compara esta modalidad sensorial con la visual o la auditiva quedaría como una modalidad pobre en cuanto al provecho que para el organismo representa en su desenvolvimiento y relación con el medio externo.

Las neuronas receptoras olfativas son las primeras células sensoriales que detectan y discriminan entre una diversa gama de ligandos químicos odoríferos. Desde mediados de los años 80 mediante la aplicación de modernas técnicas en fisiología, imagenología, biología molecular y genética se ha llegado a un modelo de señalización olfativa relativamente fidedigno (Buck y Axel, 1991).

4. SISTEMA OLFATORIO

Se han distinguido tres sistemas para el procesamiento de los olores: un sistema para percibir los reflejos olfativos básicos, también llamado área olfativa medial que consiste en un grupo de núcleos situados en las porciones mediobasales del cerebro delante del hipotálamo; los septales - los más estudiados- forman parte de una serie de núcleos de la línea media que terminan en el hipotálamo y en otras estructuras primitivas del sistema límbico del cerebro, el cual se ocupa del comportamiento reflejo. Le sigue un sistema antiguo, o área olfativa lateral, que está compuesto principalmente por la corteza piriforme junto con la porción cortical de los núcleos amigdalinos; una característica importante del área olfativa lateral

es que muchas vías que parten de ésta se proyectan directamente en otra zona más antigua de la corteza cerebral en la porción anteromedial del lóbulo temporal; finalmente un sistema más reciente para la percepción consciente de la olfacción comparable a la mayoría de los demás sistemas sensoriales y corticales que pasa por el tálamo, en concreto por los núcleos dorsomediales y después llega al cuadrante posterolateral de la corteza orbitofrontal (Guyton, 2001).

4.1 Epitelio Olfatorio

El epitelio olfatorio incluye varios tipos celulares distintos (Figura 1). El más importante desde el punto de vista funcional es la neurona receptora olfatoria (NRO), una neurona bipolar que da origen en su superficie basal a un axón amielinico de pequeño diámetro que transmite la información olfatoria hasta el encéfalo. En su superficie apical, la neurona receptora da origen a una prolongación única que se expande en una profusión similar a un botón desde la cuál se extienden microvellosidades llamadas cilios olfatorios, en la capa gruesa de moco que reviste la cavidad nasal y controla el medio iónico de los cilios olfatorios. El moco es producido por glándulas de Bowman que están distribuidas en todo el epitelio. Se presentan otras dos clases de células, las basales y las sustentaculares. Todo este aparato, constituido por la capa de moco y el epitelio con las células neurales y de sostén, se denomina mucosa nasal olfatoria. La organización de la mucosa nasal olfatoria no permite a las neuronas receptoras el acceso directo a las moléculas odoríferas, a pesar de estar tan expuestas.

Asimismo las NRO se encuentran uniformemente distribuidas sobre la mucosa olfatoria nasal. Esta región se distingue claramente del resto del epitelio por el color café amarillento. El área ocupada por el epitelio es de

unos cuantos cm^2 en el caso del hombre, ocupando una mayor área en animales de mayor agudeza olfatoria. Sin embargo, la estructura de las células sensoriales es esencialmente la misma en todos los vertebrados (Eisthen 1997) .

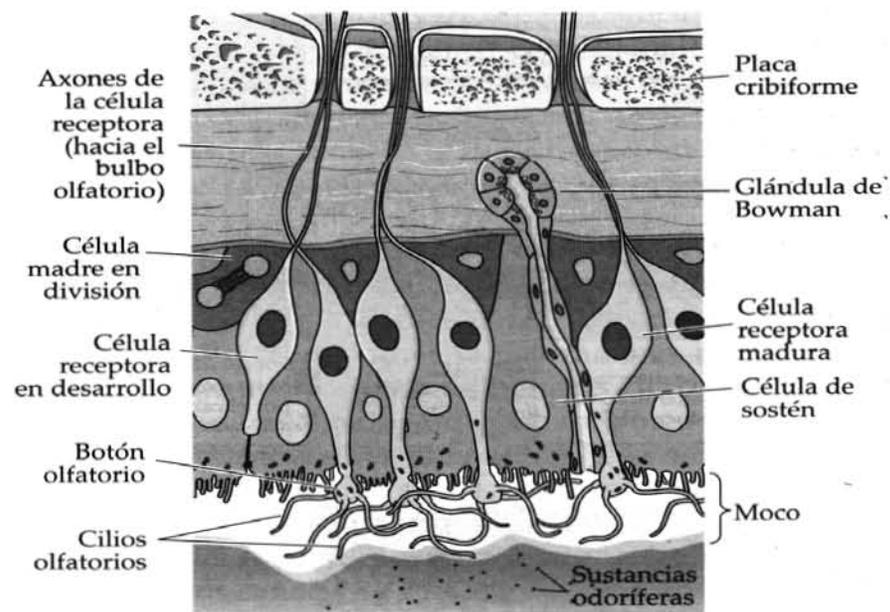


Figura 1. Estructura del epitelio olfatorio, muestra los principales tipos celulares y la proyección de las neuronas receptoras olfatorias hacia el bulbo olfatorio. (Tomado de Purves. 2001)

4.2 Transducción de las señales olfatorias

La maquinaria celular y molecular para la transducción olfatoria está localizada en los cilios olfatorios; los odorantes interactúan con los receptores específicos de los cilios de las NRO; esta interacción puede ocurrir directamente por medio de proteínas en el moco que “secuestran” la sustancia odorífera y la unen al receptor membranal. Varios pasos adicionales generan un potencial de receptor al abrir canales iónicos. Por lo menos dos vías de segundos mensajeros median este proceso. Las neuronas receptoras contienen una proteína G específica del sistema olfatorio (G_{olf}) la cual activa una adenilato ciclasa específica también de este sistema. El incremento resultante en el AMP cíclico (AMPc) abre un canal que permite el ingreso de Na^+ y Ca^{2+} , despolarizando así la neurona. Esta despolarización amplificada por una corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} , es conducida pasivamente desde los cilios hasta la región del cono axónico de la neurona receptora olfatoria, donde se generan y transmiten al bulbo olfatorio los potenciales de acción (Figura 2).

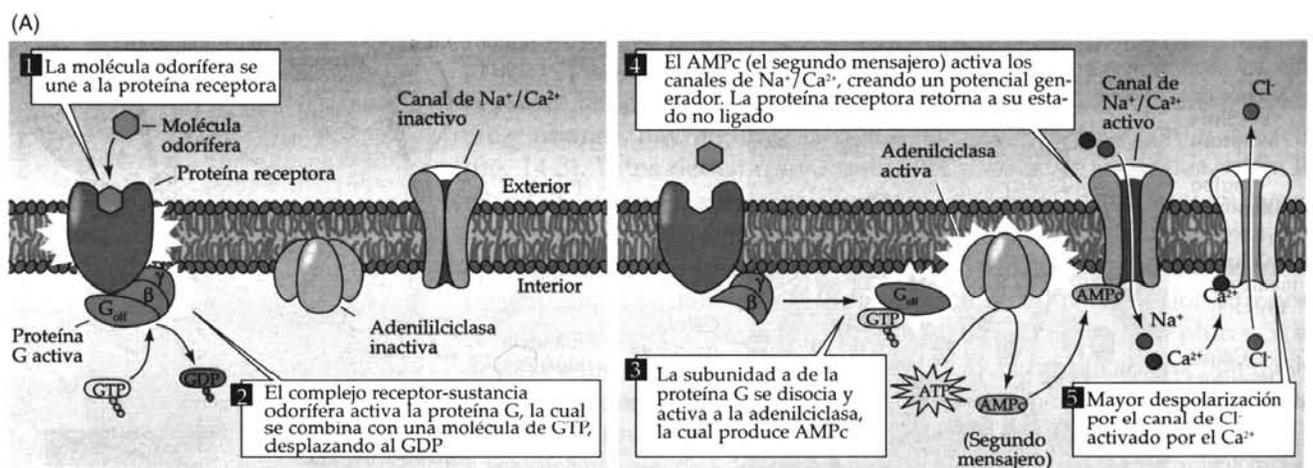


Figura 2. Transducción olfatoria. Tomada de Purves 2001

En 1991 Linda Buck y Richard Axel clonaron los primeros genes que codifican proteínas receptoras olfativas, logrando con esto proveer las bases moleculares para el entendimiento de la codificación olfativa. Gracias a sus estudios ahora sabemos que: los receptores de esta súper familia se caracterizan estructuralmente por poseer 7 dominios transmembranales y funcionalmente por acoplarse a proteínas G para su señalización (estos son llamados receptores acoplados a proteínas G o GPCRs, por sus siglas en inglés). Los receptores olfativos están relacionados con otros receptores, como aquellos necesarios para la fototransducción (rodopsina), la neurotransmisión (receptores de aminas biogénicas) y muchos otros procesos celulares. Los receptores olfativos comprenden una gran familia de aproximadamente 1000 genes separados donde cada gen codifica para un receptor distinto; esta diversidad hace que sea la familia de receptores la más grande del sistema nervioso.

El genoma de los mamíferos consta e de 50,000-100,000 genes de los cuales entre el 1 y 2 % son genes olfativos (Firensen, 2001).

4.3 El Bulbo Olfatorio

Los receptores a olores se localizan en los cilios de las NROs que se encuentran en la mucosa olfatoria; en estos cilios es donde se lleva a cabo la excitación. Los impulsos olfatorios viajan por los axones de las células bipolares hasta el bulbo olfatorio donde hacen sinapsis en la capa glomerular con las dendritas de las células mitrales y en menor medida con las células en penacho (Figura 3).

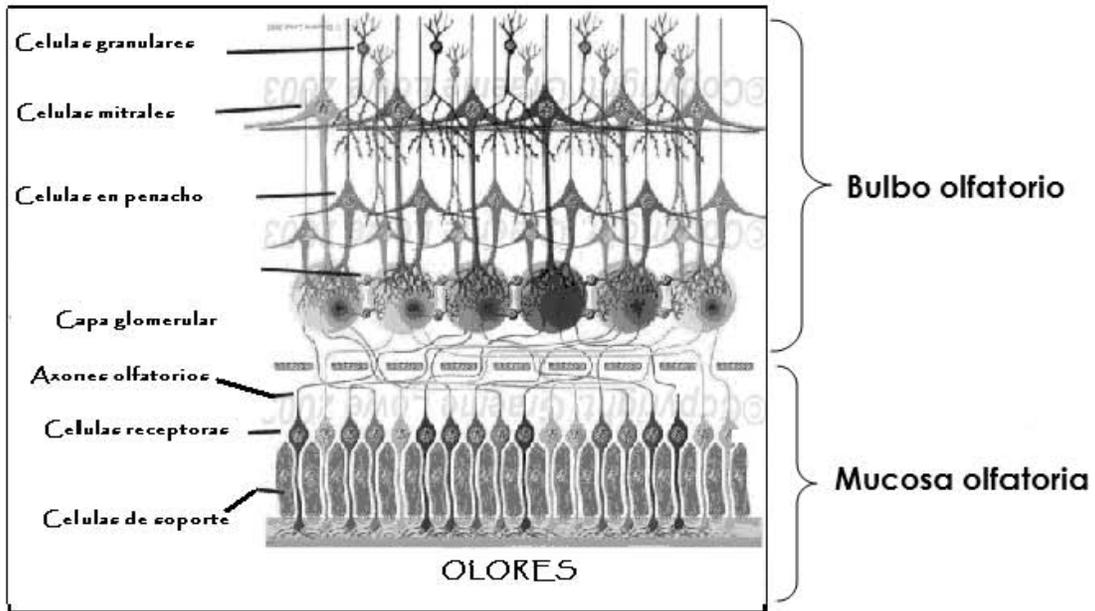


Figura 3. Estructura del bulbo olfatorio (Imagen obtenida de flavor.monell.org)

Los axones de dichas células abandonan el bulbo olfatorio hacia otras regiones del SNC y no hacen relevo en el tálamo sino que viajan directamente al núcleo olfatorio accesorio, el tubérculo olfatorio, las cortezas piriforme y entorrinal y la amígdala (Figura 4).

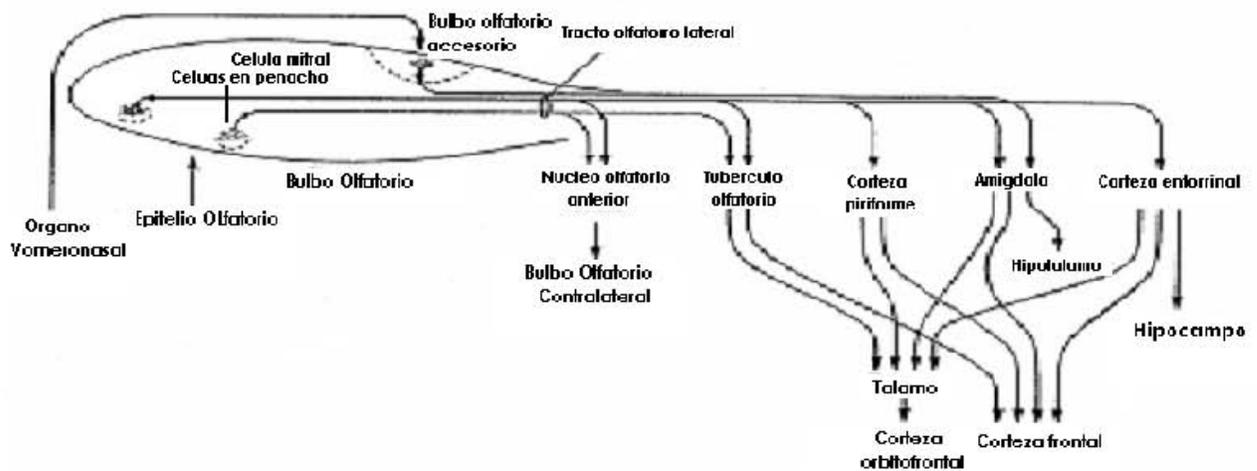


Figura 4. Tomada de Kandel y cols. 2000

5. GLUTAMATO

El glutamato, uno de los neurotransmisores más abundantes en el sistema nervioso, realiza su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Hasta el momento se han identificado una gran diversidad de receptores para el glutamato, algunos de ellos son canales iónicos regulados por ligando, mientras que otros, denominados receptores metabotrópicos, no son canales iónicos aunque pueden actuar indirectamente sobre ellos a través de segundos mensajeros activados por proteínas G. A los primeros también se les denomina receptores ionotrópicos ya que la unión del neurotransmisor con el receptor provoca la apertura del canal con el consiguiente paso de los iones. Este tipo de receptor forma canales catiónicos no selectivos, permeables tanto para el Na^+ como para el K^+ , de manera que la unión del glutamato sobre éste provoca una despolarización de la membrana postsináptica. Uno de los aspectos trascendentes de este tipo de receptores es que permiten el paso de los iones Ca^{2+} , además del Na^+ y K^+ , lo que implica un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la neurona postsináptica cada vez que el receptor se activa (Figura 5).

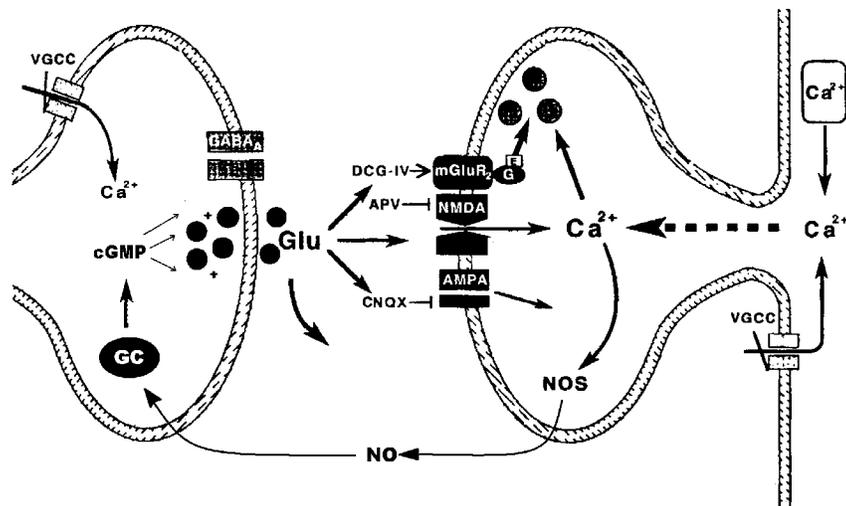


Figura 5. Transmisión glutamatérgica y nitrérgica

5.1 Receptores tipo NMDA

Los receptores a NMDA son receptores glutamatérgicos ionotrópicos que se sabe están involucrados en una diversa gama de procesos de plasticidad neuronal. Su nombre se debe al agonista sintético que los activa selectivamente: N-metil-D-aspartato (NMDA); la forma ácida del NMDA fue sintetizada a principios de los 60s y se descubrió como un potente excitador de neuronas espinales; dicha excitación se asoció a un tipo particular de receptores sensibles a glutamato, conocidos ahora como receptores NMDA. Sin embargo, fue a partir de 1977 que se empezaron a reconocer y a caracterizar las funciones del receptor a NMDA (Figura 6). Asimismo, con el uso de antagonistas se pudo evidenciar el papel de estos receptores en la transmisión sináptica en el sistema nervioso, así como en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos (Watkins 1994)

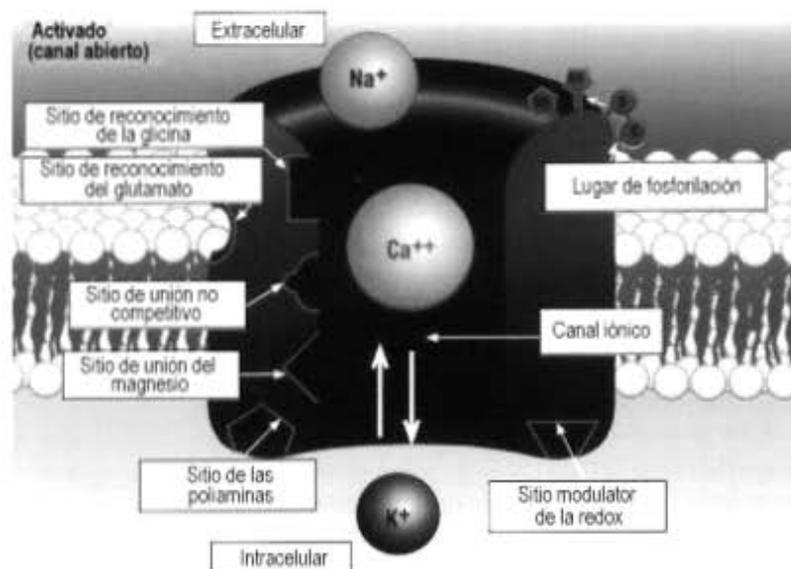


Figura 6. Esquema del receptor a NMDA y sus diferentes sitios de unión
(Imagen obtenida de hipocampo.org)

Dávila en 2004 publicó que los receptores NMDA además de ser muy abundantes en el sistema nervioso, están implicados en numerosas funciones, algunas de ellas tan importantes como el aprendizaje y la memoria, mientras que en otras ocasiones participan en mecanismos de muerte neuronal o en enfermedades como la epilepsia.

El receptor NMDA es una proteína muy compleja y altamente regulada. Su conductancia al Ca^{2+} es notablemente alta y es ésta quizá su característica más destacable y la responsable de muchas de sus funciones; otra característica especial del receptor NMDA es que para que el canal se abra necesita, además del glutamato, la presencia de un coagonista (la glicina).

El glutamato y los receptores NMDA están involucrados en numerosas funciones dentro del sistema nervioso. Uno de los procesos más estudiados en el que los receptores NMDA parecen jugar un papel clave es la plasticidad sináptica. La maduración de los circuitos nerviosos (establecimiento de conexiones neuronales) durante el desarrollo, y también en el adulto, depende de la activación y consolidación de ciertas sinapsis, mediante mecanismos de plasticidad. Como hemos señalado, los receptores NMDA juegan un papel fundamental en la plasticidad sináptica, la cual es el mecanismo para que se lleve a cabo el aprendizaje y la memoria. Por ejemplo, la duración de la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Collingridge 1983 y Robinson 1992) y en la amígdala (Maren

y Fanselow 1995), así como la duración de la depresión a largo plazo en estas áreas se sabe depende de los receptores NMDA (Dudek y Bear 1993; Wang y Gean 1999).

5.2 Glutamato y Aprendizaje Olfativo

La literatura científica concerniente a la participación del glutamato en los procesos mnémicos es muy abundante y comprende estudios desde el nivel celular hasta el sistémico, en diversos organismos vertebrados e invertebrados y en una gran variedad de preparaciones *in vitro* y modelos conductuales.

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

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

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

Se han realizado diversos estudios que establecen una relación entre el aprendizaje olfativo y los receptores NMDA. Por ejemplo, se ha observado que varias regiones del cerebro relacionadas con la olfacción son especialmente ricas en receptores NMDA; en particular se han encontrado altos niveles de estos receptores en la corteza olfativa primaria, el núcleo olfatorio anterior, los tubérculos olfatorios, el núcleo de la cintilla olfatoria y en el BO. En núcleos específicos de la amígdala y en ciertas regiones del hipocampo también se localiza una alta concentración de este tipo de receptores (Monaghan y Cotman, 1985), lo que sugiere que los receptores a NMDA tienen una participación importante en el procesamiento olfativo y probablemente también en el aprendizaje de olores.

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

Otras investigaciones han demostrado que se requiere la activación de estos receptores para un aprendizaje olfativo normal en ratas neonatas, ya que cuando estos se bloqueaban farmacológicamente antes o inmediatamente después del entrenamiento hay un deterioro en la preferencia a un estímulo olfativo condicionado (Lincoln y cols., 1988; Weldon y cols., 1997). Inclusive en ratas adultas la infusión intracerebral de antagonistas del receptor a NMDA retarda significativamente el aprendizaje de discriminación olfativa (Staubli y cols., 1989). Asimismo, se ha reportado en ratas adultas que los receptores a NMDA están involucrados en la adquisición de tareas de discriminación de estímulos olfativos (Barkai y cols, 2001).

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

Por otro lado en algunos estudios se han empleado técnicas genéticas, para tratar de determinar el papel de los receptores a NMDA en ciertos modelos de aprendizaje olfativo; un ejemplo de ello son los ratones *knockout* CA1-KO (carecen del receptor a NMDA en la región CA1 del hipocampo) los cuales tienen afectada significativamente la memoria de discriminación olfativa, sugiriendo que la actividad de estos receptores en la región CA1 es fundamental en la formación de memoria dependiente

del hipocampo, como es el caso de algunas tareas olfativas (Rampon y cols., 2000).

6. ÓXIDO NÍTRICO (ON)

A principios de la década de 1980 con los trabajos de Furchgott y Zawadzky se describe la primera función del ON en el organismo identificándose un factor producido por el endotelio de los vasos sanguíneos que provocaba la relajación de las paredes del músculo liso. En un primer momento la sustancia que producía tal efecto fue llamada "factor relajante dependiente del endotelio" (FRDE) pero este nombre se suprimió cuando Moncada y colaboradores (1989) reveló su identidad química casi una década después.

El primer indicio de que el ON podría tener relevancia en el SNC lo obtuvo Deguchi en 1982; él observó que la síntesis de ON en el cerebro requiere de arginina. Por otra parte, el grupo de Moncada en 1989 relacionó la presencia de arginina y la síntesis de ON con la formación de monofosfato de guanidina cíclica (GMPc). Él mismo descubrió que en preparaciones de tejido cerebral se producía la síntesis de ON. Por la misma época Garthwaite y cols. (1991) observaron que al estimular cultivos de tejido cerebral administrando glutamato obtenía una sustancia de vida muy corta que posteriormente se identificó como ON. Snyder en 1989 inició una serie de investigaciones sobre el ON y la transmisión sináptica desarrollando una técnica para medir la producción de este gas indirectamente cuantificando la citrulina liberada. Mediante esta técnica pudo observar que al estimular los receptores glutamatérgicos mediante la aplicación de NMDA aumentaba de manera significativa y con una rapidez considerable (comparada con la velocidad enzimática) la producción de ON. Moncada descubrió que para sintetizar ON era necesaria la presencia de Ca^{++} añadiendo una pieza más al rompecabezas ya que este ión está asociado con la calmodulina, que explicaba la relación entre la aplicación de NMDA y el aumento de ON;

siguiendo en esta línea sus experimentos se enfocaron en la localización de la ON sintasa (ONS) en todo el cerebro. Para el marcaje de las células productoras de ON se adoptó la técnica desarrollada por Bollman y Pearse en 1974, que teñía ciertas neuronas de azul al aplicar la NADPH, a la que se les dio el nombre de neuronas diaforásicas; estas mismas neuronas coincidían con aquellas que expresan la ONS mapeadas posteriormente.

Se ha descrito que el ON podría tener una función de mensajero intracelular a nivel local. Este mensajero en las células endoteliales y el cerebro es sintetizado a partir de la L-arginina, de uno o de los dos nitrógenos del grupo terminal guanidino, mediante la ONS; de manera similar, varios investigadores han descrito su actividad en los macrófagos y probablemente en otras células fagocíticas (Bruhwylter y cols, 1993)

El ON tiene diversos orígenes en el cerebro, ya que puede provenir de células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales, de la microglía por inmuno-estimulación y por la activación de receptores a diferentes neurotransmisores principalmente los glutamatérgicos tipo NMDA en las neuronas.

La ruta metabólica principal de la arginina es el ciclo de la urea; en este camino, a partir de la arginina y por medio de la arginasa, se produce ornitina, que a su vez al integrarse a la carbamilfosfatasa da como producto a la citrulina; esta ruta es muy conocida; sin embargo en el cerebro está ausente la enzima carbamilfosfatasa, que es la enzima limitante para la formación de citrulina a partir de la ornitina y por ello se ha propuesto que la ONS actúa como un eslabón para producir ON como un coproducto de la síntesis de citrulina (Garthwaite y cols. 1991). La actividad de esta enzima puede bloquearse con inhibidores competitivos como la L-N^G-metilarginina (L-Mearg), el 7-nitroindazol y el metilester de la L-nitro-arginina (L-NAME) entre otros.

Se han descubierto varias isoformas de la ONS que se dividen en dos grupos: uno dependiente del complejo enzimático calcio/calmodulina; en este grupo se encuentran las isoformas endotelial y neural. El otro grupo es independiente de calcio y es activado por citocinas (Marletta y cols. 1988); este último se encuentra en los macrófagos, donde su activación está determinada directamente por inmuno-estimulación.

La ONS es una enzima altamente regulada, ya que puede ser fosforilada por una proteína cinasa dependiente de AMPc, activada por GMPc en concentraciones fisiológicas (Müller 1996), por proteína cinasa C, y proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina II (Bredt y Snyder 1992). La activación de la isoforma neural de la ONS es dependiente de calcio; debido a que el calcio citosólico no es suficiente para su activación, los receptores a NMDA tienen una función importante al permitir un influjo de Ca^{++} suficiente para activar a la ONS. La relación entre la estimulación de los receptores a NMDA y la biosíntesis de ON se ha demostrado ampliamente (Garthwaite y cols. 1988). El glutamato liberado de las terminales presinápticas actúa en tres tipos de receptores ionotrópicos principalmente: los NMDA, AMPA y KA. Los receptores tipo NMDA forman un canal permeable a calcio y sodio, y la activación de estos provoca una entrada importante de calcio. Se sabe que durante una estimulación de baja frecuencia, los receptores no-NMDA median la excitación sináptica rápidamente, ya que los canales asociados a receptores NMDA son bloqueados por Mg. Una depolarización de la membrana permite expeler el Mg los receptores a NMDA, dejando entrar una corriente de Ca^{++} que activa la ONS, dando como resultado un marcado incremento en la producción de ON (Garthwaite y cols. 1991). Debido a que este gas difunde libremente a través de las membranas por lo cual no se almacena en vesículas sinápticas, sino que se sintetiza de acuerdo a la demanda

metabólica, se ha propuesto que funciona como un mensajero retrógrado (Bredt y cols. 1992). Así, la difusión de ON desde la neurona postsináptica puede alcanzar a la neurona presináptica activar a la guanilato ciclasa (Figuras 5). Price y su grupo (1993) observaron que las neuronas que expresan una gran cantidad de receptores a NMDA son las mismas que expresan ONS, aunque se ha demostrado que existen otros receptores, como los colinérgicos que pueden activar a la ONS (Vincent y Hope 1992).

La vida media del ON varía dependiendo del tejido, pero en el SNC la actividad de éste disminuye al 50% en alrededor de cuatro segundos. Este tiempo es suficiente para que el ON difunda a través de la membrana postsináptica a la presináptica y active a la guanilato ciclasa (Bruhwylar 1993).

Para conocer la distribución en el sistema nervioso central de la ONS se han utilizado técnicas histoquímicas que demuestran una dispersión irregular en todo el cerebro (Vincent y Kimura 1992); así, tenemos una abundancia de la enzima en el cerebelo y en el BO, en el colículo superior e inferior, en el giro dentado, en los islotes de Calleja, en la banda diagonal de Broca y en las capas superficiales de la corteza (Bredt 1999).

Al igual que otros radicales libres, el ON está implicado en diversas disfunciones del SNC. Se ha sugerido su relación con las enfermedades de Alzheimer y de Huntington, así como en los daños provocados por isquemia, entre otras. No obstante su participación en procesos fisiopatológicos, el ON también desempeña un papel fundamental en los fenómenos normales como la diferenciación neuronal, la plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (PLP), la depresión a largo plazo (DLP), y el aprendizaje y la formación de la memoria.

6.1 Papel del ON en el Aprendizaje y la Memoria

La relación entre la producción de ON con el aprendizaje y la memoria en animales íntegros, fue demostrada por primera vez por Chapman y cols. (1992); estos investigadores, administraron L-NAME, i.p., a ratas durante el entrenamiento en un laberinto acuático, o durante el condicionamiento de la membrana nictitante en conejos. El primero, es un aprendizaje complejo de tipo espacial que involucra al hipocampo, mientras que el segundo, es un proceso elemental de asociación en el cual el cerebelo es fundamental. Las ratas y conejos recibieron L-NAME durante los períodos de entrenamiento, mostrando un deterioro en la adquisición. La misma droga a la misma dosis no afectó la expresión de la memoria. Los autores concluyeron que se requiere del ON para la adquisición de ambos tipos de aprendizaje, en tanto que para la retención no es necesario.

Aunque los estudios realizados en mamíferos son los más abundantes, existen datos interesantes sobre la relación entre el ON, el aprendizaje y la memoria en otras especies. Por ejemplo, Hölsher y Rose (1992) mostraron que la inyección de L-NAME antes de la adquisición de un condicionamiento aversivo en pollos, provocaba un efecto amnésico, que podía revertirse mediante la administración previa de dosis mayores de L-arginina, la cual compite con dicho inhibidor. En peces, se ha reportado que la inyección intracerebral del inhibidor de la ONS, L-NMMA, impide la adquisición del aprendizaje de adaptación del reflejo vestíbulo ocular en forma estereoespecífica y reversible, pero no afecta la fase de retención en esta tarea (Li, 1995). Aunque existen bastantes estudios de la participación del ON en diversas formas de condicionamiento, aun son escasos los que se avocan al estudio del aprendizaje olfativo en un contexto alimenticio.

6.2 ON y Aprendizaje Olfativo

La participación del ON en el aprendizaje olfativo se ha documentado a lo largo de la escala filogenética. Así, existen evidencias en invertebrados que indican que el ON es necesario para el aprendizaje en moluscos y artrópodos. Por ejemplo, el L-NAME bloquea el aprendizaje alimenticio en la *aplysia* (Katzoff y cols. 2002) y el caracol de tierra (Kemenes y cols. 2002). Por otro lado, Jaffe y Blanco (1994) observaron que tanto la estimulación de los receptores a NMDA como la producción de aminoácidos como la alanina, arginina y la glutamina facilitan este aprendizaje en grillos, y Müller (1996), mostró que la inhibición de la ONS deteriora el aprendizaje olfativo en abejas.

Diversos estudios en mamíferos han puesto de manifiesto la importancia del BO, el primer relevo en el procesamiento de la información olfativa, en el aprendizaje y la memorización de los olores (Gervais y cols. 1990, Holley 1992; Kendrick y cols. 1997). Estudios realizados sobre la conducta maternal con ovejas han mostrado que el reconocimiento de la madre hacia su cría ocurre en las dos primeras horas posteriores al nacimiento; este reconocimiento involucra un aprendizaje que a su vez propicia cambios sinápticos en el BO (Kendrick y cols. 1997). Específicamente, las células mitrales incrementan sus respuestas durante el aprendizaje olfativo estimulando la liberación de neurotransmisores como el glutamato y el ácido gamma amino butírico (GABA), activando a las sinapsis recíprocas entre las células mitrales excitatorias y las células granulares inhibitorias (Kendrick y cols. 1997). El ON interviene en plasticidad sináptica en otras regiones del cerebro como resultado de la modulación de los niveles de GMPc, además, se ha observado que la enzima ONS neural se expresa en células tanto mitrales como granulares (Kendrick y cols. 1997), lo cual ha llevado a investigar su papel en otros tipos de aprendizaje olfativo.

En las ovejas parturientas se presenta un incremento en los niveles de glutamato en el BO inmediatamente después del alumbramiento, lo que induce la formación de ON y GMPc que, a su vez, potencia la liberación de glutamato en la sinapsis de la célula mitral a la granular. Esto parece ser indispensable para que la madre reconozca a su cría, ya que la inhibición de ONS neural o de la actividad de la guanilato ciclasa previene la potenciación de la liberación de glutamato y formación de dicha memoria olfativa (Kendrick y cols. 1997). Los efectos de la inhibición de la ONS neural pueden ser revertidos con una infusión de ON dentro del BO. Los autores proponen que el resultado de los cambios en el circuito del BO tiene que ver con la formación de memorias olfativas.

En el cerebro la producción de ON está regulada por el glutamato mediante la activación de los receptores NMDA y AMPA. En el ratón, se requiere de la activación de ambos tipos de receptores para la formación de memorias olfativas feromonales y ambos están presentes en células granulares y mitrales (Kendrick y cols. 1997). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro laboratorio y corroboran la importancia que tiene el ON para que se lleve a cabo el aprendizaje olfativo (Quiroz y cols. 2001). Taniguchi y Kaba en el 2001 plantearon que las sinapsis recíprocas dendrodendríticas entre células mitrales y granulares en el BO accesorio son particularmente importantes para el aprendizaje olfativo en el modelo de bloqueo del embarazo en el ratón. Algunos de sus datos demuestran que los receptores NMDA juegan un papel central en la generación de inhibición en células mitrales, así como en transmisión entre células mitrales y granulares.

Los cambios sinápticos observados tras la formación de esta memoria olfatoria en el modelo del ratón ocurren en el BO accesorio, el primer relevo del sistema vomeronasal. El circuito sináptico del BO accesorio es

comparativamente más simple, pero similar al del BO principal. La formación de memorias feromonales requiere de la neurotransmisión glutamatérgica de las células mitrales a las granulares vía receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Se ha visto que la formación de memorias olfativas está asociada con un incremento en longitud de las sinapsis mitrales glutamatérgicas (Matsuoka y cols. 1997) y un incremento en neurotransmisión GABAérgica (Brennan y cols. 1995).

Asimismo, el BO recibe aferencias centrifugas del núcleo olfatorio anterior (NOA), la corteza piriforme (CPir), el tubérculo olfativo (TO), la banda diagonal de Broca (BDB) y la amígdala (AMI), que participan en el aprendizaje olfativo (Lévy y Meuriss. 1999).

El sistema olfativo participa en el control de una amplia variedad de conductas y de estados fisiológicos, empero, los mecanismos neuroendócrinos mediante los cuales los estímulos olfativos regulan una gran variedad de funciones se encuentran en una etapa de comprensión todavía muy preliminar.

Varias formas de aprendizaje olfativo dependen de la activación de aferentes del BO, especialmente el sistema colinérgico (Ravel y cols. 1994), el noradrenérgico (Brennan y Keverne. 1997) y el sistema serotoninérgico (MacLean y cols. 1996).

Sullivan y Wilson en 2003 usaron una forma de aprendizaje olfativo asociativo tipo condicionamiento clásico en ratas neonatales, donde un olor (estímulo condicionado) es temporalmente pareado con diferentes estímulos incondicionados (por ejemplo leche, estimulación táctil, choques eléctricos), para analizar la anatomía funcional implicada en las respuestas condicionadas al olor. A diferencia de la memoria olfativa en adultos que está asociada con cambios en el hipocampo (Staubli y col. 1986; Álvarez y

cols. 2000), AMI (Rosenkranz y Grace 2002; Tronel y Sara 2002), CPir (Roman y cols. 1987; Litaudon y cols. 1997), corteza perirrinal (Herzog y Otto 1998), y corteza orbitofrontal (Ramus y Eichenbaum 2000; Rolls 2001), en animales recién nacidos, muchas de estas estructuras no están anatómicamente maduras ni se activan efectivamente por los olores durante las primeras semanas postnatales. Estos autores concluyeron que el aprendizaje olfativo temprano (durante la primera de vida) es dependiente de los cambios que ocurren a nivel del propio BO, y que estos cambios, a su vez, requieren la entrada de la aferencias noradrenérgicas desde el locus coeruleus para su adquisición (Sullivan y cols. 1989, 2000), pero no su expresión (Sullivan y Wilson 1991b).

Trabajos previos sobre aprendizaje olfativo temprano han demostrado cambios conspicuos en el BO del neonato (Wilson y Sullivan 1994). Por ejemplo, pareando un olor con un estímulo incondicionado se reduce la habituación de las células mitrales hacia respuestas olfativas durante el entrenamiento (Wilson y Sullivan 1992), y se producen cambio espacio-temporales anatómicos y electrofisiológicos a largo plazo de manera específica hacia olores particulares. Los cambios asociados al aprendizaje aparentemente solo ocurren en la capa glomerular (Wilson y León 1987), y pueden reflejar cambios en sinapsis intraglomerulares y/o reorganización anatómica (Woo y León 1991; Johnson y cols. 1995).

7. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se sabe que la formación de nuevas memorias requiere de un periodo de tiempo largo y que involucra una secuencia de eventos intra e intercelulares. Aunque se ha determinado que los receptores NMDA son esenciales para la adquisición de la memoria, poco se sabe respecto a qué etapa en particular del proceso íntegro del aprendizaje (adquisición, consolidación o evocación) podrían estar regulando dichos receptores; pocos son los estudios dirigidos a estudiar estos aspectos temporales en el aprendizaje olfativo.

Igualmente, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de ON impide el aprendizaje en diversos modelos animales, sin embargo, poco se sabe sobre su participación en la integración de la memoria olfativa; por ello, en el presente estudio analizamos el papel de los receptores a NMDA en el AAO, utilizando un antagonista (MK-801) a distintas dosis y en diferentes intervalos de tiempo, ya que si bien es cierto se han desarrollado varios modelos de memoria olfativa en los que se ha demostrado la participación de estos receptores, no hay hasta la fecha ninguno que se enfoque en aprendizaje en un contexto alimenticio. Asimismo, se evaluó el papel del ON en el AAO.

7.1 OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la administración de un bloqueador de los receptores a NMDA, el MK-801, en el BO en distintas fases del AAO.
- Evaluar el efecto de la administración de un inhibidor de la ONS, L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME), en el BO sobre el AAO.

7.2 HIPÓTESIS

- El bloqueo de los receptores NMDA en el BO impide tanto la adquisición, como las fases tempranas de la consolidación de la memoria aversiva al olor, pero no afecta su evocación.
- La inhibición de la síntesis de ON en el BO provocado por L-NAME deteriora el AAO.

8. MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso, del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM; los animales fueron alojados individualmente en cajas de acrílico tamaño cría con libre acceso a comida (purina Chow) y agua y mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad 12 X 12.

Cirugía. Se anestesiaron con pentobarbital sódico 100mg/kg y se implantaron cánulas bilaterales de acero inoxidable (calibre 23) dirigidas al BO (coordenadas: AP=0.62 DV= 0.40 L=+- 0.15, respecto a bregma) de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson, 1982) utilizando un instrumento estereotáxico "Stoelting" mediante las técnicas convencionales, fijándolas al cráneo con un tornillo de acero inoxidable y acrílico dental. Los sujetos se inyectaron con antibiótico (penicilina/estreptomicina) y se mantuvieron en recuperación por un periodo de siete días después de la operación.

Aparatos. Se utilizaron cajas de condicionamiento hechas de acrílico con medidas de 46.5 x 33 x 15.5 cm. En los costados de 33 cm se realizó una perforación de 2.5 cm de diámetro a una altura de 8 cm de la base de la caja, la cual tiene un tapón con un disco de papel filtro que sirvió para depositar, las esencias. A la altura del tapón que contiene las esencias se colocó una pipeta de 25 ml que fue sostenida por una placa de acrílico para mantenerla verticalmente y facilitar que el animal bebiera agua. Dichas cajas se encuentran ubicadas dentro de un cuarto aislado, con ciclos de 12 horas de luz por 12 de oscuridad, libre de ruido y olores (Figura 7).

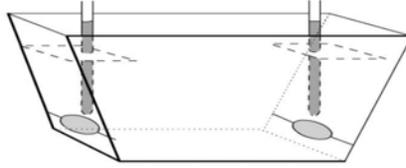


Figura 7. Caja de acondicionamiento

Grupos y Tratamientos. El MK-801 (10 ó 50 μM ; Sigma) y el L-NAME (100, 200 ó 400 μM ; Sigma) fueron administrados intracerebralmente disueltos en solución salina (NaCl 0.9%). La inyección se aplicó bilateralmente por medio de las cánulas guía con una aguja dental (calibre 30) conectada por un tubo de polietileno a una micro jeringa Hamilton de 50 μl . Cada fármaco fue cargado en el tubo de polietileno y se inyectó a razón de 1 μl /min; después de la inyección se dejaron las agujas un minuto más antes de retirarlas para facilitar la difusión libre de los fármacos en el cerebro.

Histología. Una vez completados los experimentos conductuales los animales se perfundieron intracardialmente con solución salina fisiológica seguida de paraformaldehído 4%. Se removió el BO y permaneció una semana en el fijador. Posteriormente los BO fueron seccionados coronalmente y procesados con la técnica de hematoxilina-eosina. Este procedimiento se llevó a cabo con cada uno de los cerebros, con la finalidad de corroborar que las cánulas estaban en el lugar correcto. Solo se incluyeron en el análisis estadístico los sujetos canulados en el BO bilateralmente (ver apéndice) .

Estadística. El índice de preferencia (IP) se obtuvo con la fórmula $A / (A+B) \times 100$ en donde A = consumo de agua con esencia de almendra o nuez, B = consumo de agua con esencia de vainilla o limón respectivamente.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

9.1 EXPERIMENTO 1.

EFFECTO DEL MK-801 SOBRE LA ADQUISICION DEL AAO

Procedimiento

Los animales previamente operados fueron sometidos al siguiente procedimiento experimental:

Día 0: se privaron de agua durante 24 horas previas al inicio de las maniobras conductuales.

Días 1 y 2: se habituaron a tomar agua por 10 minutos en la cámara de condicionamiento.

Día 3: se expusieron a un olor novedoso (esencia de limón) mientras bebían agua.

Día 4 (adquisición): se inyectaron intrabulbarmente con 1 μ l de solución salina isotónica (grupo control) o 1 μ l MK-801 en dosis de 10 y 50 μ M, 10 minutos antes de ser llevados a la caja de registro, donde fueron expuestos a la esencia de nuez, mientras bebieron agua por 10 minutos; inmediatamente después se inyectaron intraperitonealmente con LiCl 0.15 M.

Día 5 (recuperación): solo bebieron agua durante 10 minutos con el fin de rehidratarse de los efectos del LiCl provocados el día anterior.

Día 6 (retención): se realizó la prueba de evocación comparándose la cantidad de agua bebida de la pipeta en cada uno de los extremos donde se encontraban las esencias inocua (limón) y aversiva (nuez).

Resultados

Los resultados de la primera serie experimental (Figura 8) muestran el efecto de dos dosis (10 y 50 μ M) de MK-801 sobre el AAO administradas 10 minutos antes de la presentación del EC; se describe el IP del olor aversivo (esencia de nuez) obtenido a partir de los grupos tratados con esta droga,

más un grupo control al que solo se le administró intrabulbarmente solución salina. El grupo control presentó un IP de 4% lo cual indica una fuerte aversión, producto de un aprendizaje adecuado, mientras que los grupos tratados con MK-801 presentaron IPs de 32 % y 54 % para las dosis de 10 y 50 μ M, respectivamente, es decir, un claro efecto amnésico dependiente de la dosis. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos ($F=10.5$, $P<0.0003$). El análisis post hoc reveló diferencias significativas entre los grupos tratados y el control, sin que se encontraran diferencias entre estos dos últimos grupos (Figura 8). Estos resultados indican que la estimulación de los receptores NMDA es necesaria para la adquisición del AAO

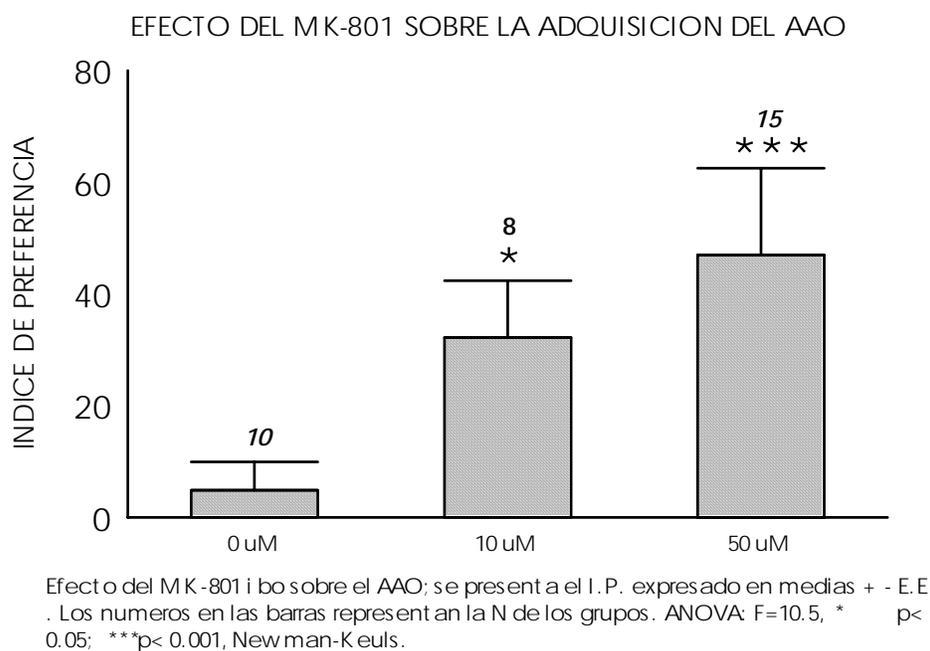


FIGURA 8

Discusión

Los estudios dirigidos a establecer la participación del receptor NMDA en la memoria olfativa han demostrado su papel fundamental.

De este modo, la administración sistémica de MK-801 induce un déficit en la memoria de reconocimiento social de un juvenil en la rata (Hlinak y cols. 2003), mismo que puede ser revertido por el pretratamiento con un agonista glutamatérgico, el ácido kaínico. Igualmente, el MK-801 elimina la discriminación olfativa en ratas recién destetadas (Griesbach y cols. 1998), pero no afecta el despliegue de la conducta materna dirigida por el olor de las crías en las madres (Malenfant y cols. 1991).

Se ha observado un efecto similar en invertebrados; por ejemplo, la administración de MK-801 bloquea la memoria olfativa de largo, pero no de corto plazo en abejas (Si y cols. 2004) lo mismo que en moscas de la fruta (Glanzman 2005).

Por otro lado, si bien el efecto de MK-801 es claro, no nos permite concluir nada respecto a qué fase en particular del proceso de aprendizaje se está afectando, puesto que la droga se inyectó 10 minutos antes del entrenamiento y por ello, su actividad farmacológica (estimada en 2 horas aproximadamente) podría interrumpir tanto la adquisición como la consolidación de la memoria. Por lo tanto, en el segundo experimento analizamos el efecto de la dosis amnésica más efectiva de MK-801 (50 μ M) en distintas etapas de la consolidación de la memoria del AAO.

9.2 EXPERIMENTO 2.

EFFECTO DEL MK-801 SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA AVERSIVA AL OLOR

Procedimiento

Los animales se sometieron a un procedimiento similar al descrito en el Experimento 1, salvo que el día 4 (adquisición), bebieron agua por 10 minutos mientras fueron expuestos a la esencia de Nuez, inmediatamente después se inyectaron intraperitonealmente con LiCl 0.15 M y, posteriormente, se realizó la infusión intrabulbar de 1 μ l de MK-801 en dosis de 50 μ M a los 30, 60 y 180 minutos después de la administración del LiCl.

Resultados

Los resultados de la segunda serie experimental que muestran el efecto del MK-801 (50 μ M) administrado a tres intervalos distintos (30, 60 y 180 minutos) después de los estímulos, sobre el AAO se observan en la Figura 9; se describe el IP por el olor aversivo (esencia de nuez) obtenido a partir de los grupos tratados con esta droga, más un grupo control al que solo se le administró intrabulbarmente solución salina inmediatamente después del entrenamiento. El grupo control presentó una fuerte aversión (IP = 7%) lo cual indica un buen aprendizaje. Se expresa, asimismo, el efecto del intervalo de administración de la droga post-entrenamiento (fase de consolidación) sobre el IP por el olor aversivo. Los grupos tratados con MK-801 a los 30, 60 y 180 minutos presentaron un IP de 76%, 59% y 43% respectivamente, revelando que los sujetos no aprendieron a diferenciar entre el estímulo inocuo y el aversivo. Estos resultados sugieren que la transmisión glutamatérgica mediada por los receptores a NMDA es indispensable para llevar a cabo la consolidación de la memoria olfativa, ya que al ser bloqueados se observan severos cuadros amnésicos. Como

podemos ver los IPs disminuyeron conforme el tiempo de administración de la droga aumentó, revelando diferencias significativas con respecto al grupo control ($P_s < 0.01$ y 0.001).

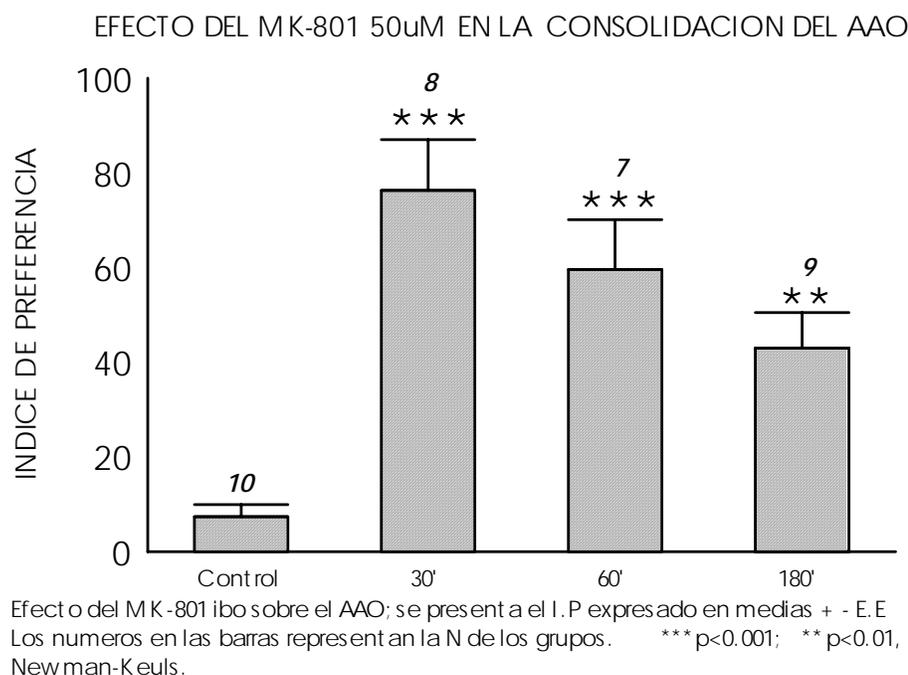


Figura 9

Discusión

Es notable que aún 180 minutos después de haberse asociado los estímulos (olor y LiCl), el MK-801 siga impidiendo la consolidación de la memoria, pues en la mayoría de los reportes, la capacidad de los antagonistas glutamatérgicos para provocar amnesia retrógrada se restringe unos cuantos minutos, es decir, a la etapa inicial del proceso ([Tronel y Sara 2003](#); [Weldon, y cols. 1997](#)). Cabe señalar que el bloqueo de los receptores a NMDA, al menos en los intervalos estudiados, tiene la misma influencia en la formación de la memoria aversiva al olor, ya que, a pesar de que se observó una clara tendencia a la disminución del efecto del MK-801 conforme aumentó el intervalo, la amnesia siguió siendo muy significativa. Esto nos indica que el deterioro en el aprendizaje provocado

por el antagonista del receptor NMDA tiene un gradiente temporal, pero que sus efectos persisten por lo menos por tres horas. En un estudio anterior se observó que el antagonismo de estos receptores con Acido D(-)-2 amino 5 fosfonopentanoico (APV) en la amígdala basolateral previo o inmediatamente después del entrenamiento bloquea selectivamente el AAO, pero no al sabor; en dicho estudio no se analizaron etapas posteriores (Ferry y Di Scala 2000). La infusión de bloqueadores de los receptores NMDA y AMPA/ Kainato en el BO accesorio también afecta negativamente la formación de la memoria de un conoespecífico en ratones hembra, poniendo sobre relieve la importancia de esta estructura en el aprendizaje olfativo, pero un contexto socio-sexual (Brennan 1994). Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte en el cual se investiga la participación de la neurotransmisión glutamatérgica en el BO en un contexto de consumo de alimento.

Los resultados de este experimento mostraron un efecto amnésico particularmente duradero del MK-801 en la consolidación del AAO, sugiriendo una fuerte dependencia de la actividad sostenida de la transmisión glutamatérgica para la formación de esta memoria. Por lo tanto, en el experimento 3 decidimos investigar si la estimulación de los receptores NMDA es igualmente necesaria para la evocación de la memoria aversiva al olor.

9.3 EXPERIMENTO 3.

EFFECTO DEL MK-801 SOBRE LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA AVERSIVA AL OLOR

Procedimiento

El procedimiento fue similar al descrito en el Experimento 1, salvo el día 4 no se hizo ninguna manipulación intrabulbar, es decir, se entrenaron libres de drogas, y el día 6 (retención), se inyectaron intrabulbarmente con MK- 801 50 μ M, 15 minutos antes de la prueba de retención; posteriormente fueron llevados a la caja de registro en donde se cuantificó la cantidad de agua bebida de la pipeta, en cada uno de los extremos donde se encontraban las esencias.

Resultados

La Figura 10 describe el efecto del MK-801 sobre la evocación de la memoria aversiva al olor. Se anexan dos grupos presentados previamente en los Experimentos 2 y 3 (adquisición y consolidación) donde se usó la misma dosis (50 μ M), con fines comparativos. A partir de esta figura, es evidente que dicho antagonista de los receptores a NMDA no afecta en absoluto el recuerdo del olor aversivo, puesto que los animales lo distinguen perfectamente del inocuo (IP= 4%), dato muy interesante del que podemos inferir que para evocar un olor aprendido no se precisa de la participación del glutamato en el BO. El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas al comparar los tres grupos (F= 10.3, P< 0.0005)

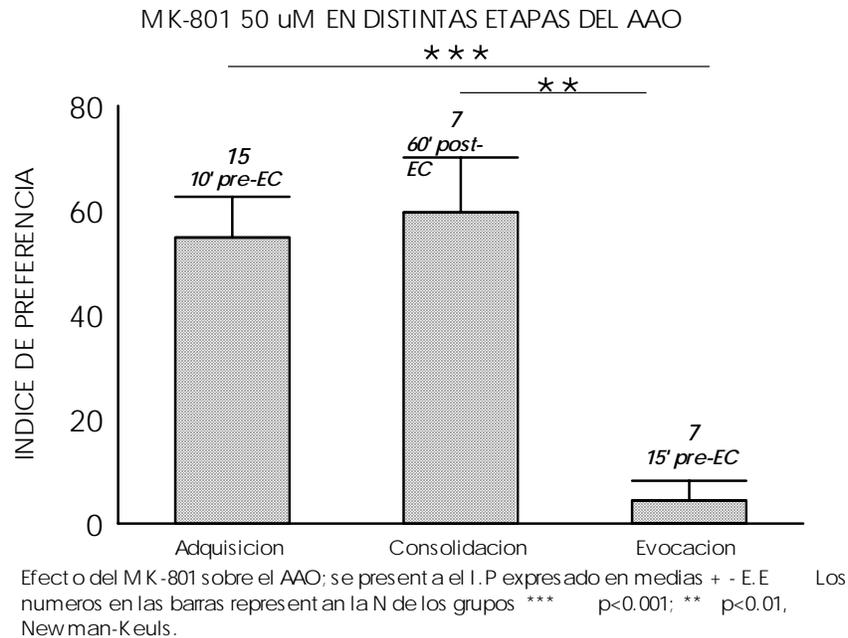


Figura 10

Discusión

Estos resultados son congruentes con estudios previos de memoria olfativa, en los cuales se ha observado que los tratamientos amnésicos durante la adquisición son inocuos en la evocación (Staubli y cols. 1989; Lincoln y cols. 1988).

Asimismo, es necesario hacer notar que este tratamiento intrabulbar no interfiere con la percepción de los olores, lo cual es de suma importancia para interpretar los resultados del Experimento 1, es decir, que la aplicación de la droga antes de la presentación del EC no afecta los procesos sensoriales de reconocimiento olfativo. Aunque otros autores (Lévy y cols. 1997) han utilizado olores que son rechazados de manera innata por los animales para demostrar lo mismo, consideramos que usar el mismo olor que se aprende a distinguir como inocuo o aversivo es un control más limpio.

De manera interesante, se ha reportado que la administración de antagonistas de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos son

capaces de bloquear la evocación de la memoria gustativa en el modelo de condicionamiento aversivo al sabor; por ello sería interesante estudiar esa posibilidad en nuestro modelo, ya que se ha propuesto que la aversión olfativa se regula de manera similar a la gustativa, pero es menos robusta.

9.4 EXPERIMENTO 4.

EFFECTO DEL L-NAME SOBRE LA ADQUISICION DEL AAO

Procedimiento

Los animales previamente operados fueron sometidos a un procedimiento similar al descrito en el Experimento 1, salvo que el día 3, se expusieron a un olor inocuo (esencia de vainilla) mientras bebían agua y el día 4 (adquisición), se inyectaron intrabulbarmente con 1 μ l de solución salina isotónica ó 1 μ l de L-NAME en dosis de 100, 200 y 400 μ M, 10 minutos antes de ser llevados a la caja de registro, donde fueron expuestas a la esencia de almendra, mientras bebieron agua por 10 minutos.

Resultados

Los resultados de esta serie experimental, donde se evaluó el efecto de tres dosis (100, 200 y 400 μ M) de L-NAME sobre el AAO se presentan en la Figura 11; se describe el IP para el olor aversivo (esencia de almendra) obtenido a partir de los grupos tratados con esta droga más el grupo control. Como se puede ver en la figura el grupo control, es decir, aquel inyectado con solución salina intrabulbarmente, tiene un IP de 3% aproximadamente, mientras que en los tres grupos tratados con L-NAME, el IP es prácticamente idéntico (12%). Esto indica que no existe una relación entre la dosis administrada y la respuesta obtenida, y sugiere que la inhibición de la síntesis de ON en el BO no provoca efecto alguno sobre el AAO.

EFFECTO DEL L-NAME SOBRE LA ADQUISICION DEL AAO

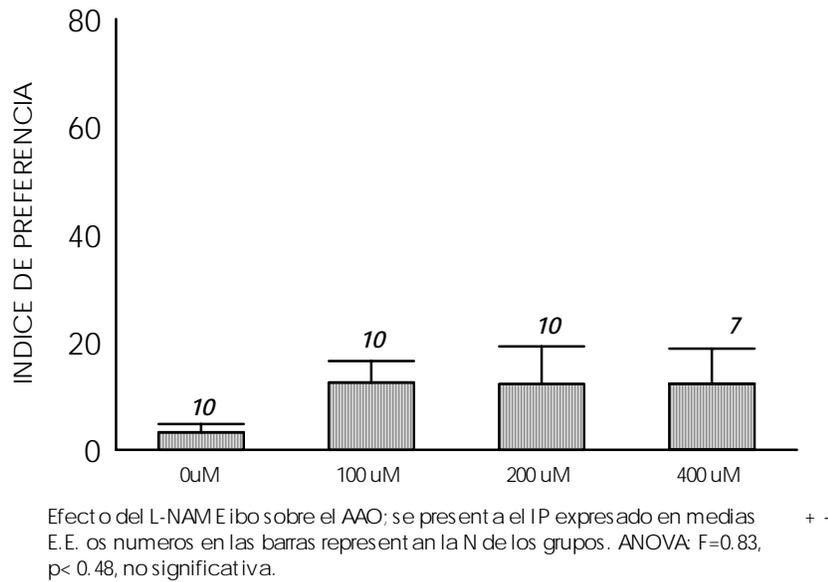


Figura 11

Discusión

A pesar de que en la gran mayoría de los artículos publicados sobre el tema se ha observado que la inhibición de la síntesis de ON provoca un detrimento de las funciones cognitivas (Meyer y cols. 1998; Bredt 1999; Susswein y cols. 2004), se pueden encontrar excepciones a esta regla, dependiendo de la especie, el fármaco utilizado, la vía de administración y el tipo de aprendizaje en cuestión. Concretamente en el aprendizaje olfativo, se ha reportado una memoria normal a pesar de inhibir la actividad de la ONS en ratones (Brennan y cols. 1993; Okere y cols. 1995). Nuestros resultados contravienen numerosos reportes previos donde la administración intracerebral de inhibidores de la ONS deterioran distintas formas de aprendizaje (Ohno y cols. 1993; Okere y cols. 1996; Suzuki y cols. 1996; Samama y cols. 1999) incluyendo el olfativo (Bohme y cols. 1993; Kendrick y col. 1997). De manera interesante la expresión de RNAm para la isoforma neural de la ONS en el BO accesorio se incrementa durante la formación de la memoria de reconocimiento olfativo en el ratón (Okere y Kaba 2000).

La discrepancia entre nuestros resultados y los reportes mencionados es difícil de explicar por varias razones: 1) El sitio de administración parece el adecuado, pues en el BO no solo se establece el primer relevo sináptico de la información de olores percibidos conscientemente –como es el caso de aquellos provenientes del alimento- sino que en esta estructura se codifica al menos parte de dicha información (Kendrick y cols. 1997). Además, como documentamos anteriormente, la infusión intrabulbar de inhibidores de la ONS previene el aprendizaje olfativo en ovejas, ratas y ratones.

2) El modelo de aprendizaje olfativo utilizado. Como hemos referido, prácticamente toda la literatura consigna experimentos en modelos de aprendizaje olfativo en un contexto socio-sexual, en tanto que las investigaciones en un contexto alimenticio son muy escasas, y nunca antes se había analizado el papel del ON usando el modelo de AAO. No obstante estas diferencias, es sorprendente que el L-NAME no haya afectado al AAO, pues parecía probable que el ON también modulara este tipo de aprendizaje, ya que el AAO solo difiere de otros modelos donde se usan olores de comida en que el tipo de memoria que se forma es aversiva.

3) Las dosis utilizadas de L-NAME se encuentran dentro del rango μM que se ha reportado como suficiente para inhibir más del 90% de la ONS (Pfeiffer y cols. 1996); en contraste, por ejemplo, Okere y cols. (1995) analizaron otro inhibidor de la ONS, la N- Ω - nitroarginina, en el rango nM, sin encontrar amnesia retrógrada sobre el aprendizaje de reconocimiento olfativo. Asimismo, a pesar de que el volumen que inyectamos ($1\mu\text{l}$) no alcanza a cubrir por completo el BO, se ha estimado que difunde lo suficiente como para actuar en una esfera de 1 a 1.5 cm^3 (Zhuravin y cols. 1991), lo cual alcanzaría tanto a la capa glomerular, como a la de células mitrales y granulares postuladas como principales responsables de codificar la memoria olfativa dependiente de ON (Brennan y Keverne 1997; Kendrick y

cols. 1997). Asimismo, en nuestros propios experimentos encontramos que la administración sistémica de L-NAME provoca amnesia en el modelo de AAO (Quiroz, 2002)

La conclusión más inmediata es que la influencia del ON en el BO no es indispensable para el AAO, aunque muy probablemente intervenga fisiológicamente en él, es decir, que efectivamente someter a nuestros animales al entrenamiento induzca la síntesis de ON en dicha estructura, pero que a pesar de inhibirla el sistema sea capaz de almacenar correctamente esta memoria. Por lo tanto, suponemos que otros sistemas de neurotransmisión deberán implementar este aprendizaje olfativo en ausencia de ON.

Tomados en conjunto con los resultados del Experimento 1, estos datos indican que mientras que el bloqueo de la transmisión glutamatérgica impide el AAO, la inhibición de la síntesis de ON no provoca ningún efecto amnésico sobre el mismo. Por lo tanto, la activación de la ONS debida a la estimulación de los receptores a NMDA parece irrelevante para la formación de la memoria olfativa. De lo anterior se desprende que otros mecanismos intracelulares activados por los receptores NMDA, son los responsables de implementar los procesos que llevan a la codificación de esta memoria olfativa.

10. CONCLUSIONES GENERALES

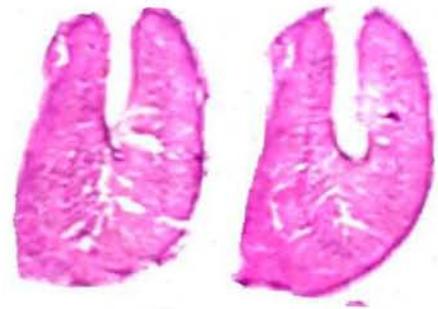
- ❖ La neurotransmisión glutamatérgica mediada por los receptores MNDA participa tanto en la adquisición como en la consolidación del AAO, pero no es necesaria para la evocación de dicha memoria aversiva.
- ❖ La señalización nitrérgica en el BO no es esencial para la adquisición del AAO

11. APENDICE

Se presentan algunos cortes representativos de la posición de las cánulas en el bulbo olfativo.



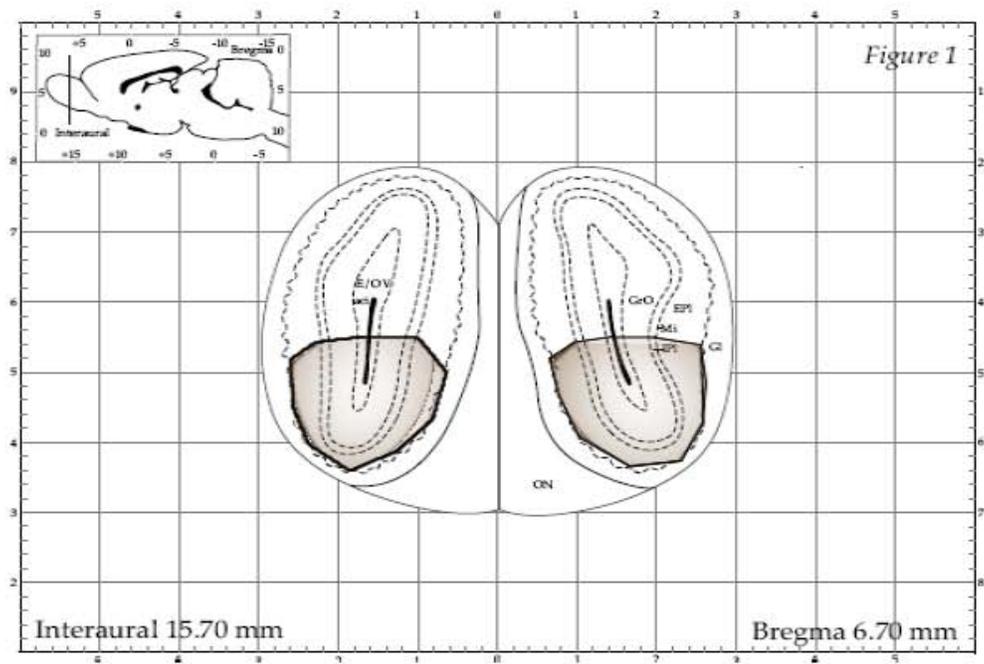
Corte 1



Corte 2



Corte 3



Representación esquemática del BO (Paxinos y Watson, 1982). La zona sombreada indica el área de inyección verificada histológicamente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. **Barkai**, E., Saar, D. (2001) Cellular correlates of olfactory learning in the rat piriform cortex. *Reviews in the Neurosciences* 12: 11-20
2. **Bashir**, Z., Beretta, N., Bortolotto, Z., Clark, K., Davies, C., Frenquelli, B., Harvey, J., Potier, B., Collingridge, G. (1994) NMDA receptors and long-term potentiation in the hippocampus . In the NMDA receptor 2nd Ed, ed. Collingridge, G. and Watkins, J., UK: Oxford University Press, pp. 294-312
3. **Berkowicz**, D.A and Trombley, P.Q. (2000) Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Research* 855. 90-99.
4. **Böhme**, G-A, Bon, C et al. (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in the nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 90*, October, 9191-9194.
5. **Bollman** R Pearse A. G. (1974) Calcitonin secreton and APUD characteristics of naturally thyroid carcinomas rats. *Virchows Archs B Cell Pathol* 19 (15):95-105.
6. **Bolshakov**, K.V and Gmiro, V.E (2003) Determinants of trapping block of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Journal of Neurochemistry*, 56-65.
7. **Bredt** DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999 Dec; 31(6):577-96. Review.
8. **Bredt** DS., Snyder SH., (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8:3-11.
9. **Brennan** PA and Kishimoto, J. (1993) Local inhibition of nitric oxide synthase activity in the accessory olfactory bulb does not prevent the formation of an olfactory memory in mice. *Brain Research*, 619 306-312.
10. **Brennan** PA, Kendrick KM, Keverne EB. (1995) Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience.* Dec; 69 (4):1075-86.
11. **Brennan** PA, Keverne EB. (1997) neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol.* Mar; 51 (4):457-81. Review.

12. **Brennan** PA. (1994) The effects of local inhibition of N-methyl-D-aspartate and AMPA/kainate receptors in the accessory olfactory bulb on the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience*. Jun; 60(3): 701-8.
13. **Brosnan-Watters**, G and Wozniak, F. (1997) A rotating holeboard procedure for testing drug effects on spatial learning and memory in mice. *Brain Research Protocols* 1, 331-338.
14. **Bruhwyler** J., Chleide E., Liegeois J.F., and Carrer F. (1993) Nitric oxide: A new messenger in the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17: 373-384.
15. **Buck** L, Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. Apr 5; 65(1): 175-87.
16. **Chapman** F, P., Colean, M et al. (1992) Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 3, 567, 567-570.
17. **Collingridge** GL, Kehl SJ, McLennan H. (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. Jan; 334:33-46.
18. **Dávila** JC. (2004) NMDA un receptor polifacético. *Ciencias España*. Publicación rápida.
19. **Daw**, W., Stein, G and Fox, K. (1993) The role of NMDA receptors in information processing. *Annual Reviews Neuroscience*, 16, 207-222.
20. **Deguchi** T., Yoshika M., (1982) L-arginine identified as a endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 257 (17): 10147-51.
21. **Dudek** SM, Bear MF (1993) Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci*. Jul; 13(7):2910-8.
22. **Eichenbaum** H. (1998). Using olfaction to study memory. *Ann N Y Acad Sci*. Nov 30; 855: 657-69. Review.
23. **Eisthen** HL. (1997) Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav Evol.*; 50(4):222-33. Review.

24. **Ferry B**, Di Scala G. Basolateral amygdala (2000) NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behav Neurosci.* 2 Oct; 114(5):1005-10.
25. **Fiske**, K and Brunjes, C. (2001) NMDA receptor regulation of cell death in the rat olfactory bulb. *Journal Neurobiology* 47, 223-232.
26. **Furchgott** R.F. Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
27. **Garthwaite**, J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neuroscience*, 14:60-67.
28. **Garthwaite**, J., Charles S., and Chess-Williams R. (1988) Endothelium derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 336:385-388.
29. **Glanzman** DL. Associative learning: Hebbian flies *Curr Biol.* (2005) Jun 7; 15(11):R416-9.
30. **Griesbach** GS, Hu D, Amsel A. (1998) Effects of MK-801 on vicarious trial-and-error and reversal of olfactory discrimination learning in weanling rats. *Behav Brain Res.* Dec; 97(1-2):29-38.
31. **Guyton** C. A, Hall E. H. (2001) *Tratado de Fisiologia Medica.* Mc Graw-Hill. Interamericana. 1280 pp.
32. **Hlinak** Z, Krejci I. Kynurenic (2003) Acid prevented social recognition deficits induced by MK-801 in rats. *Physiol Res.* (6):805-8.
33. **Hlinak**, Z and Krejci, I (2002) N-Methyl-D-aspartate improved social recognition potency in rats. *Neuroscience letters* 330, 227-230.
34. **Hölsher**, C and Rose, R., (1992) An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neuroscience Letters*, 145, 165-167.
35. **Jia** Ch., Wei R et al. (1999) Synaptic organization and neurotransmitters in the rat accessory olfactory bulb. *The American Physiological Society.* 345-355.
36. **Johnson** BA, Woo CC, Duong H, Nguyen V, Leon M. (1995) learned odor evokes an enhanced Fos-like glomerular response in the olfactory bulb of young rats. *Brain Res.* Nov 20; 699(2):192-200.

37. **Kandel** E, Schwartz J and Jessell T, (2000) Principles of neural sciences. Mc Graw-Hill. 1414 pp.
38. **Katzoff** A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ. (2002) Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in aplysia. J Neurosci. Nov 1; 22(21):9581-94.
39. **Kemenes** I, Kemenes G, Andrew RJ, Benjamin PR, (2002) O'Shea M. Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. J Neurosci. Feb 15; 22(4):1414-25.
40. **Kendrick**, M., Guevara-Guzmán, R et al. (1997) Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. Nature, Vol. 388, 14 August, 670-674.
41. **Lévy**, F., Meurisse, M et al. (1999) Afferents to the rostral olfactory bulb in the sheep with special emphasis on the cholinergic, noradrenergic and serotonergic connections. Journal of Chemical Neuroanatomy 16. 245-263.
42. **Lévy**, F., Richard Ph., Meurisse, M et al (1997) Scopolamine impairs the ability of parturient ewes to learn to recognize their lambs. Psychopharmacology 129:85-90.
43. **Li** J., Smith S.S., and McElligott (1995) Cerebellar nitric oxide is necessary for vestibulo-ocular reflex adaptation, a sensorimotor model of learning. J Neurophysio. 74:489-494.
44. **Lincoln** J, Coopersmith R, Harris EW, Cotman CW, Leon M. (1988) NMDA receptor activation and early olfactory learning. Brain Res. 1988 Apr 1; 467(2):309-12.
45. **Madden**, R (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. Nature reviews Vol. 3, February. 91-101.
46. **Malenfant** SA, O'Hearn S, (1991) Fleming AS. MK801, an NMDA antagonist, blocks acquisition of a spatial task but does not block maternal experience effects. Physiol Behav. Jun; 49(6):1129-37.
47. **Maren** S, Fanselow MS. (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. J Neurosci. Nov; 15(11):7548-64.
48. **Martinez**, J. Jr., Kesner, R. ed. (1998) Neurobiology of learning and memory. USA: Academic Press

49. **May-Simera**, H and Levin, D. (2003) NMDA Systems in the amygdale and piriform cortex and nicotinic effects on memory function. *Cognitive Brain Research* 17, 475-483.
50. **McLean** JH, Harley CW. (2004) Olfactory learning in the rat pup: a model that may permit visualization of a mammalian memory trace. *Neuroreport*. Aug 6; 15(11):1691-7. Review.
51. **Meyer** RC, Spangler EL, Kametani H, Ingram DK. (1998) Age-associated memory impairment. Assessing the role of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. Nov 20; 854: 307-17. Review.
52. **Moncada** S, Palmer RM, higgs EA. (1989) Biosintesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38: 1709-1715.
53. **Morris**, R., M. Davis (1994) The role of NMDA receptors in learning and memory. In *In the NMDA receptor 2nd Ed*, ed. Collingridge, G. and Watkins, J., UK: Oxford University Press, pp. 294-312
54. **Müller**, U. (1996) Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*, Vol.16, March, 541-549.
55. **Ohno** M, Yamamoto T, Watanabe S. (1993) Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res*. Dec 31;632(1-2):36-40.
56. **Okere** CO, Kaba H, Higuchi T. (1996) Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*. Mar; 71(2): 349-54.
57. **Okere** CO, Kaba H, Higuchi T.(1995) Failure of intrabulbar and peripheral administration of N omega-nitro-L-arginine to prevent the formation of an olfactory memory in mice. *Physiol Behav*. 1995 Aug; 58(2): 387-91.
58. **Okutani**, F and Yagi, F. (1999) Gabaergic control of olfactory learning in young rats. *Neuroscience*, Vol 93, No. 4, 1297-1300.
59. **Paxinos** J. Watson (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press.

60. **Pfeiffer** S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B.(1996) Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine.Br J Pharmacol. Jul; 118(6):1433-40.
61. **Purves** D., Augustine J., Fitzpatrick D., Katz C., Lamantia SA., McNamara OJ. (2001) Invitación a las neurociencia. Ed. Panamericana. 611 pp.
62. **Rampon**, C., Tang Y, Goodhouse J., Shimizu E., Kiyin M., Tsien J. (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR-1 knockout mice. Nature Neuroscience 3: 238-44
63. **Riedel**, G and Platt, B. (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. Behavioural Brain Research 140, 1-47.
64. **Robinson** GB. (1992) Maintained saturation of hippocampal long-term potentiation does not disrupt acquisition of the eight-arm radial maze. Hippocampus. Oct;2(4):389-95.
65. **Roman** FS, Truchet B, Chaillan FA, Marchetti E, Soumireu-Mourat B. (2004) Olfactory associative discrimination: a model for studying modifications of synaptic efficacy in neuronal networks supporting long-term memory. Rev Neurosci; 15(1):1-17. Review.
66. **Rusiniak** KW, Palmerino CC, Garcia J.(1982) Potentiation of odor by taste in rats: tests of some nonassociative factors. J Comp Physiol Psychol. Oct; 96(5):775-80.
67. **Samama**, B and Boehm N, (1999) Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. Neurobiology of learning and memory 71, 219-231.
68. **Sandner** G. (2004) Lower animal conditioning studies help in the understanding of human memory and its disorders: the merits of conditioned taste, odor, and flavor aversion research. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Feb;286(2):R251-3
69. **Sassoe-Pognetto**, M., Ottersen, O. (2000) Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. The journal Neuroscience 20: 2192-201

70. **Shiple**y, M., Ennis, M. (1996) Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology* 30: 123-76
71. **Shirsat** N, Siddiqi O. (1993) Olfaction in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol.* Aug; 3(4): 553-7. Review.
72. **Si** A, Helliwell P, Maleszka R. (2004) Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav.* Feb; 77(2): 191-7.
73. **Staubli** U, Thibault O, DiLorenzo M, Lynch G. (1989) Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behav Neurosci.* Feb; 103(1): 54-60.
74. **Strausfeld**, N., Hildebrand, J. (1999) Olfactory systems: common design, uncommon origins *Current Opinion in Neurobiology* 9:634-9
75. **Sullivan** RM, and Wilson DA. (2003) Molecular biology of early olfactory memory. *Learning and Memory* 10, 1-4.
76. **Sullivan** RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA.(2000) Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats.*Behav Neurosci.*Oct; 114 (5):957-62.
77. **Sullivan** RM, Wilson DA, León M. (1989) Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system.*J Neurosci.* Nov;9(11):3998-4006.
78. **Susswein** AJ, Katzoff A, Miller N, Hurwitz I. Nitric oxide and memory.*Neuroscientist.* (2004) Apr; 10(2): 153-62. Review.
79. **Suzuki** Y., Ikari H., Hayashi T., Iguchi A. (1996) Central Administration of a nitric oxide synthase inhibitor impairs spatial memory in spontaneous hypertensive rats. 207:105-108.
80. **Takatsuki**, K and Kawahara, S. (2001) Effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801 on classical eyeblink conditioning in mice. *Neuropharmacology.* 41, 618-628.
81. **Taniguchi** M and Kaba H. (2001) Properties of reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb. *Neuroscience* Vol. 108, No. 3, 365-370.

82. **Tronel S**, Sara SJ (2003) Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J Neurosci.* 2003 Jul 2; 23(13): 5472-6.
83. **Vincent S. R.** Kimura H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46 (4): 755-784.
84. **Wang SJ**, Gean PW (1999) Long-term depression of excitatory synaptic transmission in the rat amygdala. *J Neurosci.* Dec 15; 19(24):10656-63.
85. **Weldon DA**, Fedorick GG, LoRusso CM, Tiburzi MJ, Lenoci JM. (1997) Olfactory conditioning impairment following posttraining NMDA receptor blockade in neonatal rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1997 Jan; 67(1): 34-42.
86. **Wilson DA**, Leon M.(1987) Evidence of lateral synaptic interactions in olfactory bulb output cell responses to odors. *Brain Res.* Aug 4;417(1):175-80.
87. **Wilson DA**, Sullivan RM. (1994) Neurobiology of associative learning in the neonate: early olfactory learning. *Behav Neural Biol.* Jan; 61(1):1-18. Review.
88. **Wilson DA**, Sullivan RM.(1992) Blockade of mitral/tufted cell habituation to odors by association with reward: a preliminary note. *Brain Res.* Oct 23; 594(1):143-5.
89. **Wilson DA**, Sullivan RM.,(1991) Olfactory associative conditioning in infant rats with brain stimulation as reward: II. Norepinephrine mediates a specific component of the bulb response to reward. *Behav Neurosci.* Dec; 105(6):843-9.
90. **Woo CC**, Leon M.(1991) Increase in a focal population of juxtaglomerular cells in the olfactory bulb associated with early learning. *J Comp Neurol.* 1991 Mar 1; 305(1):49-56.
91. **Zhuravin IA**, Bures J (1991).Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Exp Brain Res*; 83(3): 687-90.
92. **Zuo Y**, Yang G, Kwon E, Gan WB. (2005) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature.* Jul 14; 436(7048): 261-5.