

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

*FORMACIÓN DEL TRAZO DE MEMORIA GUSTATIVA:
NÚCLEOS ACCUMBENS Y PARABRAQUIAL*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
LETICIA RAMÍREZ LUGO

DIRECTOR DE TESIS
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

COMITÉ TUTORAL
DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA
DR. JUAN FERNÁNDEZ RUIZ

MÉXICO D.F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

... [se preguntaba Cyril Arbcomby] *¿Qué significa, [...], recuerdo? La conciencia que basamos en él es demasiado vaporosa. Lo que acabamos de decir, leer o hacer se convierte, un instante más tarde, en pura irrealidad. Existe sólo en nuestra memoria, y así toda nuestra vida, todo nuestro mundo. Lo que logramos definir como real es únicamente ese momento infinitesimal de presente, que ya ha pasado en cuanto queremos pensar en él. ¿Cómo podemos estar seguros de que no hemos surgido esta mañana, hace una hora o hace un instante con una memoria de treinta, cien o mil años? No hay certeza, porque no sabemos lo que es la memoria y de dónde viene. Pero si las cosas son así, si el tiempo no es más que el modo en que nuestra conciencia percibe un mundo que no tiene tiempo, entonces ¿por qué no habría de haber recuerdos de algo que nos pasará en un futuro próximo o lejano?...*

La meta de un largo viaje. La Prisión de la libertad. Título original: Das Gefängnis de Freiheit. Michael Ende. 1992. De la traducción de Genoveva Dietrich. Alfaguara 2006. pp. 55-56.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral recibí apoyo económico de CONACyT, DGEP y del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

Índice general

Aclaraciones	III
Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
1. Introducción	4
1.1. Aprendizaje y memoria	4
1.1.1. Memoria de corto y largo plazo	5
1.2. Sistema colinérgico en la formación de la memoria	6
1.3. Núcleo accumbens	7
1.3.1. Núcleo accumbens en aprendizajes asociativos	8
1.4. Memoria gustativa como modelo de estudio de memoria	9
1.5. Vías de procesamiento en la formación de la memoria gustativa	10
1.6. Trazo de memoria del sabor	13
1.7. Núcleo accumbens y memoria gustativa	14
1.8. Comunicación interestructural	18
1.9. Núcleo parabraquial	19
1.9.1. Sistema glutamatérgico durante la memoria gustativa en el NPB	20
2. Planteamiento del problema	21
2.1. Objetivos generales	23
2.2. Objetivos particulares	23
3. Método	24
3.1. Sujetos	24
3.2. Implantación de cánulas guías	24
3.3. Fármacos	24

3.4. Microinyecciones	24
3.5. Histología	25
3.6. Procedimiento conductual de memoria gustativa	25
4. Resultados	26
4.1. Sección experimental 1	27
4.2. Sección experimental 2	35
4.3. Resumen de resultados sección 1 y sección 2	45
4.4. Sección experimental 3	47
4.5. Resumen de resultados sección 3.	70
5. Discusión general	71
5.1. La formación de los elementos del TMS comparten mecanismos de procesamiento. Receptores muscarínicos	72
5.2. La formación de los elementos del TMS difieren en los mecanismos de procesamiento. Receptores tipo NMDA	73
5.3. La memoria de corto plazo no es necesaria para formar memorias más duraderas . .	76
5.4. Modelo propuesto para la formación del TMS: comunicación interestructural	77

Aclaraciones

Esta tesis consiste de tres secciones experimentales, que se describen a continuación:

Sección 1. Está dedicada al estudio de la participación del núcleo accumbens en la formación del trazo de memoria gustativa. El método, los resultados y la discusión, están incluidos en el artículo “*NMDA and muscarinics receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation*” publicado en Learning and Memory, 2006 Enero-Febrero;13(1):45-51.

Sección 2. Presenta resultados no publicados de la participación del núcleo accumbens en la consolidación del trazo de memoria gustativa. El método, los resultados y la discusión se presentan en un apartado dedicado a esta sección.

Sección 3. Describe la función del núcleo parabraquial en la formación del trazo de memoria gustativa. El método, los resultados y la discusión son presentados en el artículo “*Cortical and parabrachial nucleus NMDA receptors activity are differentially involved in Short and Long-Term taste memory formation*”. Trabajo que se encuentra en preparación para su publicación en una revista de arbitraje internacional.

Finalmente, se presenta una discusión general donde se integran los resultados obtenidos en las tres secciones experimentales. Se propone un modelo de interacción entre estructuras.

Resumen

La información es representada internamente en forma de patrones de actividad en diversas áreas del sistema nervioso, que permite que las memorias sean formadas y evocadas. Esta representación interna se denomina trazo de memoria. La memoria según su duración y estabilidad relativa se llama memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP). La conversión de una memoria inicialmente lábil a una permanente se le denomina consolidación. Se ha postulado que la MCP es el primer paso para formar la MLP, sin embargo, hay evidencia experimental que sugiere que el paso a la MLP no depende de la MCP. La actividad neuronal del núcleo accumbens (NAcc), puede afectar la respuesta colinérgica cortical, la cual se ha relacionado ampliamente con procesos asociativos y en etapas tempranas de la formación de la memoria. Hay evidencia de que este núcleo participa en varias memorias, sin que se haya descrito su participación en la formación de memorias sensibles a la actividad colinérgica cortical derivada del cerebro anterior basal. La memoria gustativa es una memoria de este tipo y existe poca información sobre la participación del NAcc en la formación de dicha memoria. La ingesta de un alimento está determinado por las consecuencias que siguen al primer consumo. La representación neural del estímulo gustativo ha sido llamado trazo de memoria del sabor (TMS) y se han descrito al menos dos elementos del mismo, el TMS seguro y el TMS aversivo. Cuando el estímulo gustativo no es seguido de malestar, el animal lo reconoce como seguro e incrementa su consumo. Por el contrario, si el estímulo gustativo es seguido de señales de intoxicación, los animales adquieren aversión a ese sabor que se ve reflejada en un rechazo a su consumo. La memoria gustativa de aversión da la ventaja metodológica que permite medir a la MCP y la MLP en el mismo animal, sin generar procesos de extinción.

En la primera parte de esta tesis, se exploró el papel del NAcc en la formación de la memoria gustativa. Se observó que la actividad de los receptores muscarínicos de acetilcolina, es indispensable, al menos en el NAcc medial, para la formación del TMS sin importar las consecuencias que siga al consumo del sabor. La actividad de los receptores tipo N-metil-D- aspartato (NMDA) de glutamato, es necesaria en ambos subnúcleos del NAcc cuando el consumo del sabor es seguido de señales de intoxicación. En todos los experimentos se observó que la formación de la MLP es un proceso lineal que comienza con la formación de la MCP. Al explorarse el papel funcional de la síntesis de proteínas en dicho núcleo, se observó un procesamiento diferencial de los TMS seguro y aversivo.

El núcleo parabraquial (NPB) es una estructura muy importante en la memoria gustativa y se ha visto que ejerce un papel modulador sobre la actividad del NAcc. La segunda parte de esta tesis presenta como la actividad de los receptores tipo NMDA en el NPB, es necesaria en la formación del TMS aversivo y que además en esta estructura no se sigue un patrón lineal en el procesamiento de la MLP a partir de la MCP. Finalmente, se discuten los resultados obtenidos en esta tesis con los ya reportados en las cortezas insular y perirrinal. Se propone un modelo de interacción entre estructuras en la formación del TMS.

Abstract

Information is internally represented by activity patterns probably in parallel on several brain structures, that allow the formation, storage and retrieval of memories. This internal representation is called memory trace. According to its duration, memory has been classified in short term memory (STM) and long term memory (LTM), the latter being dependent of new protein synthesis. The conversion of an initial labile memory into one permanent is called consolidation. It has been proposed that STM is the first step for LTM formation, however, there are experimental data that suggest an independent process between STM and LTM establishment. The neuronal activity of the nucleus accumbens (NAcc) affects the cortical cholinergic response that have an important role in associative processes and early stage of memory formation. There are evidences that the NAcc has a role in a different kind of memories, however, it has not been described its role in a dependent cortical cholinergic memory modulated by forebrain activity. The taste memory is a memory having these features and there is little information about the role of NAcc in this memory formation. The consumption of a food is determined by the consequences following the first consumption. The neuronal representation of the taste has been called taste memory trace (TMT). There are at least two different elements of TMT which are the safe and aversive TMT. When the taste is not followed by malaise, the animal recognizes it like a safe taste and increases its consumption. On the other hand, if intoxication signals are present after taste consumption, the animal acquires aversion to that taste and its consumption is decreased. The aversive taste memory has a methodological advantage in comparison to other models, which is the possibility to test STM and LTM in the same animal without generating extinction processes.

In the first section of this thesis the role of NAcc in the safe and aversive TMT by the glutamate NMDA receptors and cholinergic muscarinic receptors was studied. The results showed that the muscarinic receptors of acetylcholine in the NAcc shell are necessary in the TMT formation regardless of the consequences of the consumption of the taste. The N-methyl -D- aspartate acid (NMDA) receptors activity is necessary only when the taste is followed by malaise in both subnucleus of the NAcc. All the experiments showed that the LTM formation is a lineal process that begin with STM formation. Additionally, the role of the NAcc in the consolidation of the taste memory was explored. The results suggest the differential processes of the safe and aversive TMT consolidation in the NAcc.

The parabrachial nucleus (NPB) is an important region in the taste memory formation and it can modulate the NAcc activity. The second section of this thesis shows the role of parabrachial nucleus in the aversive TMT formation, by NMDA receptors. Additionally, the results suggest that LTM formation is not a consequence of STM constitution in NPB. Finally, all the results of this thesis are compared with those reported in insular and perirhinal cortex and a model for the interaction among different structures of central nervous system during TMT formation is proposed.

Abreviaturas

ABL	Amígdala basolateral
ACh	Acetilcolina
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4- ácido propionico
AN	Atenuación de la neofobia
APV	DL-2-amino-5- ácido fosfonopentanoco
CAS	Condicionamiento aversivo a los sabores
CI	Corteza insular
CP	Corteza perirrinal
DA	Dopamina
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
LB	Línea basal
LiCl	Cloruro de litio
MCP	Memoria de corto plazo
MLP	Memoria de largo plazo
NAcc	Núcleo accumbens
NBM	Núcleo basalis magnocellularis
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPB	Núcleo parabraquial
NTS	Núcleo del tracto solitario
TMS	Trazo de memoria del sabor
TVPL	Tálamo ventroposterolateral
TVPM	Tálamo ventroposteromedial
VTA	Área ventral tegmental

Capítulo 1

Introducción

1.1. Aprendizaje y memoria

La memoria es un fenómeno complejo y dinámico que según Kandel consiste en el proceso mediante el cual el conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado (Squire, L y Kandel, E, 2000). Esta definición engloba los tres procesos en los que tradicionalmente se ha dividido la memoria que son:

ADQUISICIÓN (aprendizaje). Fase inicial donde los organismos están expuestos a cambios del medio físico que constituyen los estímulos a ser asociados y posteriormente almacenados.

CONSOLIDACIÓN. Durante esta fase hay activación de mecanismos que permite una cierta permanencia de la experiencia concreta recién percibida. Paso de memoria de corto plazo a memoria de largo plazo. Proceso que requiere síntesis de proteínas.

EVOCACIÓN. Se define como la expresión de conductas determinadas por experiencias de aprendizajes anteriores. La información es recuperada. Se observa como un cambio en la conducta (Baddeley, A, 1999).

La información es representada internamente en forma de patrones de actividad en diversas áreas del sistema nervioso. Esta representación interna que permiten que las memorias sean formadas almacenadas y evocadas en el sistema nervioso central en inglés se les conoce como *memory trace* y se ha dado a traducir al español como trazo de memoria (Thompson, 2005). Es inicialmente frágil por lo que debe estabilizarse con el paso del tiempo. El trazo de memoria según su duración y estabilidad relativa se le ha llamado memoria de corto plazo (MCP) o de largo plazo (MLP). Los trazos de memoria, también conocidos como engramas, significan un cambio persistente en el cerebro que es formado en respuesta a un estímulo o la asociación de dos o mas estímulos, y es el sustrato neuronal para la formación de una memoria. Se ha propuesto que el tipo de trazo de memoria determina la manera en que la información se codifica, almacena y evoca.

1.1.1. Memoria de corto y largo plazo

Una clasificación de los sistemas de memoria es según su duración en MCP y MLP. La MCP es aquella que constituye recuerdos que duran segundos, minutos u horas, y la MLP, dura meses o incluso años gracias a un proceso de consolidación del conocimiento adquirido. Esta clasificación de la memoria dependiente del tiempo fue propuesta por Hermann Ebbinghaus en su trabajo “Über das Gedächtnis” en 1885 y fue formalizada años después por William James (Squire, 2000).

En 1968 Atkinson y Shiffrin propusieron un modelo de memoria humana, que plantea que la MCP es un almacén de capacidad limitada y la MLP es donde se acumula de manera permanente aquella información contenida originalmente en la MCP.

El modelo asume que el procesamiento humano de la información conlleva una serie de etapas, las cuales se desarrollarían de un modo estrictamente secuencial. Las etapas o estructuras que comprende el modelo son: a) almacén sensorial, b) almacén de corto plazo, c) almacén de largo plazo.

En una primera fase, la información hace su ingreso al sistema mediante una serie de almacenes sensoriales en los cuales quedan registrados según la modalidad de origen, esto es, la información visual ingresa a un almacén sensorial visual, la información gustativa a un almacén sensorial gustativo y así siguiendo con el resto de las modalidades. La memoria sensorial es un almacén de capacidad ilimitada, retiene por un período corto de tiempo los múltiples y variados patrones de la información de los estímulos.

En una segunda fase, sólo una fracción de la información sensorial ingresa a otro almacén transitorio denominado almacén de corto plazo o memoria de corto plazo. La información proveniente de la memoria sensorial, puede decaer pasivamente o ser transferida a la MCP. Este decaimiento o transferencia se encuentra mediado por un proceso de atención, de modo que sólo aquellos estímulos a los que se les ha prestado atención serán procesados y por lo tanto transferidos a la MCP. El almacén de corto plazo es de capacidad limitada, el cual se comunica con el siguiente elemento del modelo.

Conforme al modelo de Atkinson y Shiffrin, el último elemento del almacenamiento de la memoria es el conocido como almacén de memoria de largo plazo, en el cual la información es almacenada de manera estable (Baddeley, 1999).

Sin embargo, recientemente se ha mostrado que la MCP no es siempre el primer paso para formar memorias más duraderas (McGaugh, 2000). Existen ciertas diferencias en la participación de algunos sistemas de neurotransmisión y/o estructuras en el procesamiento de estas dos memorias. También se ha comprobado que la MCP y la MLP pueden ser afectadas de manera distinta por algunos fármacos (Izquierdo et al., 1998 a, b; Izquierdo, 2002), lo que sugiere que son procesos que suceden en paralelo y de manera independiente.

El grupo de Izquierdo trabajó con un modelo de prevención pasiva (one-trial step-down avoidance task). Cada animal es probado dos veces, una hora y media y 24 horas después del entrenamiento, la primera medición corresponde a la MCP mientras que la segunda a la MLP. Se realizaron inyecciones bilaterales hechas justo después del entrenamiento en la región hipocampal CA1 y en la corteza entorrinal. La aplicación de un agonista de los receptores dopaminérgicos D1, SKF38393, un agonista de receptores de serotonina 1A, 8-HO-DPAT, (I. Izquierdo, Medina et al., 1998a) o el antagonista de los receptores de serotonina 1A, DPTA (I. Izquierdo, Barros et al., 1998b) en CA1 se ve afectada la MCP sin interferir con la formación de la MLP. Efectos similares fueron encontrados después de inyecciones en corteza entorrinal de SKF38393, NAN-190 un antagonista de los receptores 5HT1A, un bloqueador β -adrenérgico como el tomolol (I. Izquierdo, Medina et al., 1998a), o bien un antagonista glutamatérgico de los receptores tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-ácido propionico) como el CNQX o un agonista a los receptores GABAA como el muscimol (I. Izquierdo, Barros et al., 1998b). Estos resultados apoyan la idea de que la MCP involucra diferentes mecanismos de aquellos que participan en la MLP (para una revisión mas completa se sugiere L. A. Izquierdo et al., 2002).

Para poder estudiar si la MLP es un proceso independiente o dependiente de la MCP, se han buscado modelos conductuales que permitan la medición de ambas memorias en el mismo individuo. Una de las dificultades para ello es que la medición de la MCP puede producir extinción en la MLP, dado que el estímulo incondicionado o el reforzador ya no se presentan en la primera medición. En este sentido, se han propuesto varias tareas conductuales que permiten el estudio de ambas memorias en el mismo individuo, una de ellas es la memoria gustativa de aversión, que se analizará en detalle mas adelante.

1.2. Sistema colinérgico en la formación de la memoria

El telencéfalo contiene dos grandes subsistemas de cuerpos celulares colinérgicos, uno de ellos se encuentra en el tallo cerebral en la región del núcleo tegmental del pedúnculo pontino y el tegmentum pontino laterodorsal. El segundo subsistema es la región basal del cerebro anterior que contiene un gran número de grupos de células colinérgicas que a su vez tienen proyecciones extensas hacia las cortezas. La región basal del cerebro anterior incluye la región septal, los brazos vertical y horizontal de la banda de Broca, sustancia innominata y el núcleo basalis magnocelularis (NBM), considerando, este último, como la estructura homóloga al núcleo basal de Meynert en humanos (Everitt et al., 1987). Varios estudios han establecido que la totalidad de la inervación colinérgica hacia la neocorteza y otras regiones del cerebro, procede de los somas colinérgicos de la región basal del cerebro anterior (Everitt et al., 1987; Woolf, 1996). Este sistema de proyección colinérgica ha llamado la atención en

las últimas décadas, debido a que alteraciones anatómicas de estas vías durante el envejecimiento o enfermedades neuropatológicas se correlacionan con alteraciones en funciones asociativas en un gran número de modelos conductuales (Bartus, 1982; Everitt, et al, 1987).

Al respecto, en corteza auditiva y visual de la rata, estudios de liberación de acetilcolina (ACh) muestran una activación exclusiva como resultado de la presentación de estímulos auditivos y visuales nuevos o previamente asociados a intensos estímulos aversivos (Bakin, et al., 1996). Estos efectos coinciden con los reportados en la corteza gustativa, donde se da la activación colinérgica como resultado del consumo de un estímulo gustativo nuevo. Esta activación es decreciente como consecuencia de subsecuentes presentaciones del estímulo, es decir, decrementa la actividad colinérgica con la familiaridad del estímulo (Miranda, 2000).

Adicionalmente, los trabajos del grupo de Kilgard muestran que la estimulación eléctrica del NBM, pareada con un estímulo auditivo, da como resultado una reorganización masiva en la corteza auditiva primaria de ratas adultas. El tamaño de los campos receptivos en la corteza puede disminuir, aumentar o permanecer inalterado dependiendo de los parámetros acústicos pareados con la actividad del NBM (Kilgard y Merzenich, 1998).

Todo lo anterior, parece apuntar a la idea de que la actividad colinérgica cortical, modulada por la actividad del NBM, está en gran medida involucrada en el procesamiento cortical de la información sensorial y asociativa, ante estímulos conductualmente relevantes, salientes o nuevos. Como consecuencia, varios estudios se han enfocado en caracterizar el sistema neuronal distribuido que modula la excitabilidad del NBM.

Una estructura que se ha propuesto puede modular la actividad del NBM es el núcleo accumbens (NAcc). Se ha observado que la aplicación sistémica de anfetaminas incrementa la liberación de ACh en corteza prefrontal y se ha postulado que esto se debe a que se estimula la liberación dopaminérgica en el NAcc mediante un circuito NAcc–NBM–Corteza (Sarter et al., 1999; Arnold et al., 2000).

1.3. Núcleo accumbens

El NAcc es una estructura en la parte rostrbasal del cerebro medio y se divide, en base a estudios anatómicos de organización, en NAcc medial, lateral y rostral^a (Zahm, 2000; Brundege y Williams, 2002).

El NAcc es una región importante relacionada con la acción de ciertas drogas de abuso. La cocaína y otros estimulantes actúan inicialmente por un incremento en la liberación de dopamina (DA) en el NAcc. Los modelos de abuso de drogas en animales, han permitido que se sugiera que los

^aEn inglés las divisiones del NAcc, medial, lateral y rostral, se conocen como shell, core y rostral respectivamente

procesos que subyacen a la adicción podrían explicarse como procesos patológicos de un aprendizaje (Hyman y Malenka, 2001; Wolf, 2002). Por ejemplo, la administración crónica de anfetamina o cocaína produce cambios dramáticos en la morfología de espinas dendríticas en el NAcc y la corteza prefrontal, cambios relacionadas en procesos de memoria (Robinson y Kolb, 1997; Robinson et al., 2001).

1.3.1. Núcleo accumbens en aprendizajes asociativos

Hay una gran cantidad de reportes que sugieren la participación del NAcc en la formación de la memoria. En varios trabajos se ha reportado la participación de este núcleo en aprendizaje y en procesos de consolidación, pero no en el proceso de evocación (ver Setlow, 1997). Por ejemplo, se ha reportado que el bloqueo bilateral de los receptores tipo N- metil - D - aspartato (NMDA) de glutamato en NAcc antes del entrenamiento en prevención pasiva, afecta la adquisición de la tarea. Sin embargo, cuando las inyecciones son realizadas justo después del entrenamiento, no se encontró ningún efecto (Martínez et al., 2002).

Existen estudios que muestran una participación importante del NAcc en procesos asociativos. Por ejemplo, la presentación de un estímulo gustativo asociado con malestar gástrico, produce un incremento de los niveles basales en la liberación de ACh (Mark et al., 1995). Además, se ha propuesto que la liberación de DA en el NAcc es sensible a las contingencias asociativas de los estímulos presentados e incrementa durante la formación de un condicionamiento (Young et al., 1998). En este sentido, en un procedimiento de condicionamiento Pavloviano, un estímulo neutral (un tono o una luz) el cual normalmente no produce cambio en los niveles basales de DA en el NAcc, una vez asociados con un choque eléctrico, la sola presentación del tono o la luz, incrementan los niveles de DA en el NAcc (Young et al., 1993; Young et al., 1998). Se ha reportado que esta liberación se observa solo en el NAcc medial. En otro grupo de animales en los cuales se asoció un contexto con el choque eléctrico, los niveles de DA incrementaron significativamente en el NAcc lateral durante los siguientes 30 minutos de exposición al contexto (Pezze et al., 2001). De manera distinta, el consumo de un estímulo gustativo (Mark et al., 1991) o un estímulo olfativo (Louilot y Besson, 2000) asociado con malestar gástrico decrementa los niveles de DA en este núcleo.

Estos resultados contradictorios pueden deberse a las diferencias en los procedimientos experimentales realizados en cada uno de los reportes. Sin embargo, no hay duda de la participación del NAcc en la formación de diferentes tipos de memorias.

Hernández y colaboradores (2002), mostraron que el NAcc participa en el proceso de consolidación. Inyecciones bilaterales de anisomicina, un antagonista de síntesis de proteínas, en el NAcc lateral interrumpen la consolidación de la memoria de una prueba instrumental.

La novedad de los estímulos es una variable importante en la asociación de los mismos. Las neuronas del NAcc decrecientan su actividad como consecuencia del consumo de una comida nueva (Lee et al., 1998). Además, se ha relacionado al sistema glutamatérgico en el NAcc en la detección de la novedad o familiaridad de los estímulos. En este sentido, la inyección bilateral de antagonistas de receptores tipo NMDA (como el APV) afectan el consumo de una comida nueva (Burns et al., 1996); y la inhibición de los receptores ionotrópicos de glutamato antes del entrenamiento, afecta la habilidad de los ratones en explorar un objeto nuevo en comparación de uno familiar, mientras las inyecciones hechas después del entrenamiento de un antagonista tipo NMDA de glutamato afecta la exploración del objeto nuevo (Sargolini et al., 2003).

Existen evidencias de la participación del NAcc en aprendizajes aversivos, como prevención pasiva, condicionamiento aversivo a los olores, entre otras. Una estructura que esta ampliamente relacionada con memoriaas de este tipo es la amígdala. Axones de la amígdala basolateral (ABL) envían proyecciones glutamatérgicas hacia el NAcc (Kelley y Domesick, 1982;Robinson y Beart, 1988;Wright y Groenewegen, 1996). La estimulación de alta frecuencia (Howland et al., 2002) o el bloqueo con tetrodotoxina (TTX) (Louilot et al., 1985) del núcleo de la ABL, pero no del núcleo central, incrementa los niveles de DA en el NAcc. Esta respuesta fue bloqueada por antagonistas glutamatérgicos en el NAcc (Howland et al., 2002). La amígdala esta relacionada con varias memorias aversivas y entre ellas se ha mostrado su participación en memorias como la memoria gustativa de aversión .

1.4. Memoria gustativa como modelo de estudio de memoria

La interacción de los estímulos relacionados con los alimentos y la respuesta visceral que sigue a la ingestión, determinan en gran parte la conducta alimenticia en los animales. La forma en que los animales reaccionan ante los efectos aversivos o nutritivos de los alimentos tiene una gran importancia evolutiva (García y Robertson, 1984). Así, los animales son capaces de asociar sabores arbitrarios con dichos efectos y basándose en experiencias previas seleccionan los alimentos nutritivos y evitan aquellos que contienen toxinas, es decir, adquieren una memoria gustativa.

Cuando un animal tiene contacto por primera vez con un alimento, generalmente manifiesta una reserva natural a su ingesta, conocida como neofobia, debido a que desconoce las consecuencias positivas o negativas que esta conlleve. Cuando el estímulo gustativo no es seguido de malestar, el animal lo reconoce como seguro e incrementa su consumo. Este comportamiento se ilustra en la Figura 1.1. Sin embargo, si el estímulo gustativo es seguido de señales de intoxicación los animales adquieren aversión a ese sabor que se ve reflejada en un rechazo a su consumo (Bermúdez-Rattoni, 2004), tal como se muestra en la Figura 1.2. Por lo tanto, los sabores nuevos pueden ser clasificados

como seguros o aversivos formando una memoria gustativa. Es posible estudiar el aprendizaje de lo seguro y lo aversivo con tareas como la atenuación de la neofobia (AN), y el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) respectivamente.

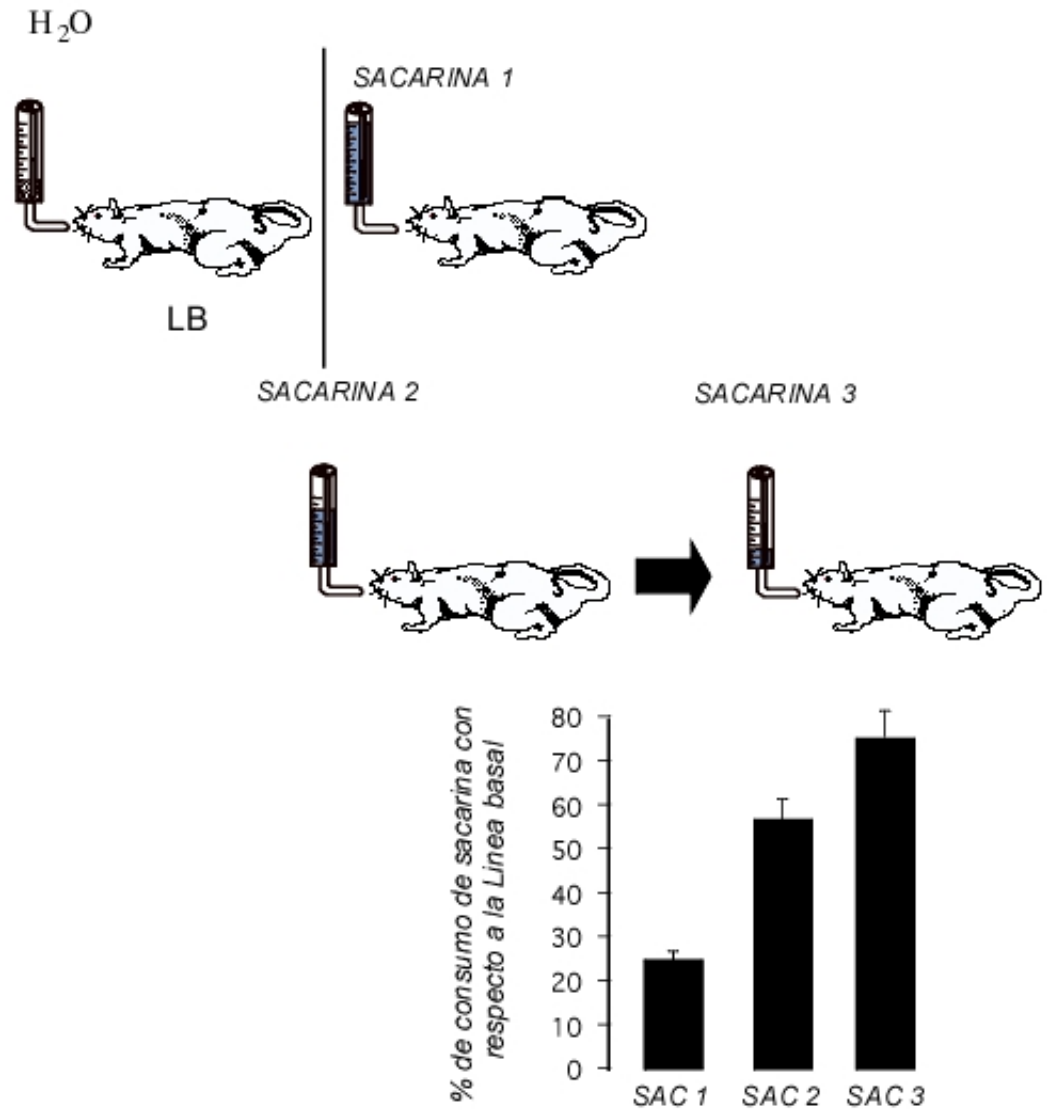
La formación de la memoria gustativa depende de las interacciones de estructuras del tallo cerebral, límbicas y corticales (Bermúdez-Rattoni, 1986; Yamamoto et al., 1994; Bures, 1998). Esta interacción se esquematiza en la Figura 1.3 donde se evidencia una de las ventajas metodológicas de la memoria gustativa como modelo de estudio: la descripción de la participación de varias estructuras en la formación de esta memoria.

1.5. Vías de procesamiento en la formación de la memoria gustativa

Cuando las moléculas del estímulo gustativo activan las papilas de la lengua, se genera un potencial de acción que es conducido por los nervios craneales VII, IX y X^b hasta el núcleo del tracto solitario (NTS) rostral (Bures, 1998; Bermúdez-Rattoni, 2004). Las neuronas del NTS ascienden ipsilateralmente a través de la formación reticular a las células del núcleo parabraquial (NPB) dorsolateral. En este núcleo se presenta una bifurcación en donde por una parte, la información gustativa va hacia el hipotálamo lateral, al núcleo de la base estria terminalis y a la amígdala en su núcleo central y ABL (Bures, 1998), que a su vez manda proyecciones hacia el NAcc (Kelley y Domesick, 1982; Brog et al., 1993; Wright y Groenewegen, 1996). Por otra parte, la información se dirige al tálamo ventroposteromedial de donde se proyecta a la corteza insular (CI), corteza que tiene proyecciones recíprocas con la amígdala. El NBM manda proyecciones colinérgicas a la amígdala y a CI (ver 1.3, Bermúdez-Rattoni, 2004).

El estímulo visceral tiene dos formas de llegar al NTS caudal, una es por medio del nervio vago (inervaciones entre otros órganos al tracto gastrointestinal) y otra a través de la detección de toxinas en el torrente sanguíneo mediante el área postrema (AP). Del NTS, la información visceral llega al NPB lateral. Este núcleo presenta una bifurcación, en donde la información visceral se dirige al núcleo del tálamo ventroposterolateral (TVPL), y se proyecta a la CI. El NPB proyecta a la sustancia inominata, al hipotálamo lateral y a la amígdala central de donde se envía la información visceral a CI como se presenta en la Figura 1.3 (Bermúdez-Rattoni, 2004). Las lesiones de la ABL (Yamamoto et al., 1994; Miranda et al., 2002) provocan deficiencias en la adquisición del CAS. Recientemente, se ha demostrado un incremento en la liberación de glutamato en la ABL como

^bLos nervios craneales VII, IX y X también se conocen como nervios chorda timpani, glosofaríngeo y vago respectivamente.



ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA

Figura 1.1: Procedimiento conductual para medir una memoria gustativa de lo seguro (atenuación de la neofobia). Cuando un animal tiene contacto por primera vez con un alimento, manifiesta una reserva natural a su ingesta que se denota como neofobia (sacarina 1). Cuando el estímulo gustativo no es seguido de malestar, el animal lo reconoce como seguro e incrementa su consumo (sacarina 2 y 3). Los animales son privados de agua 24 horas antes de comenzar el entrenamiento. Alrededor de cada 24 horas, los animales pueden beber agua durante 15 minutos durante los siguientes cuatro días para establecer un promedio del consumo (línea basal, LB). Los siguientes tres días, se sigue el mismo protocolo del consumo de agua, solo que el agua es cambiado por la presentación del estímulo gustativo nuevo.

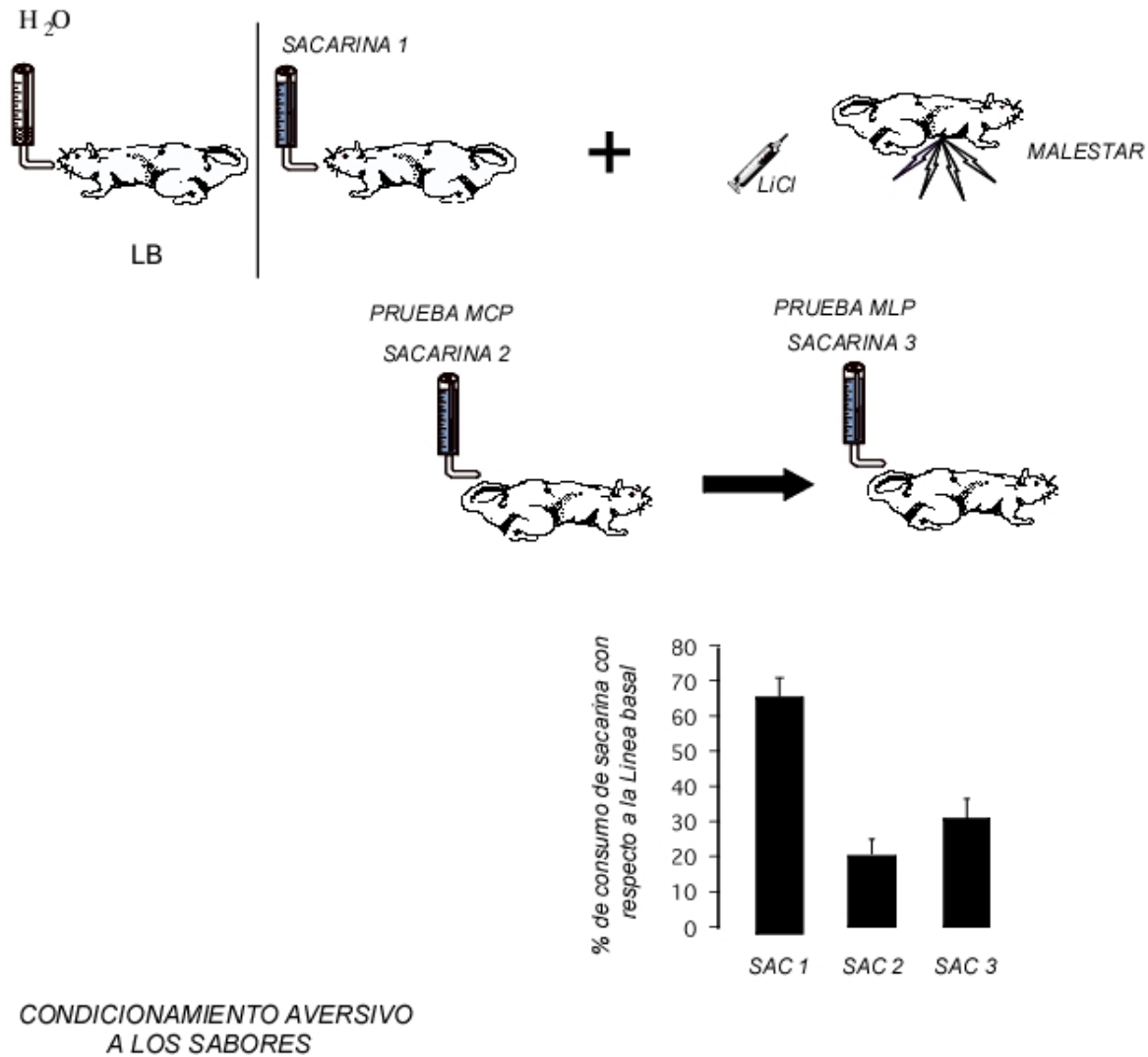


Figura 1.2: Esquema del procedimiento conductual para medir una memoria gustativa de aversión (condicionamiento aversivo a los sabores). Los animales son privados 24 horas antes de empezar el entrenamiento. Durante los siguientes cuatro días se establece la línea base (LB) de consumo, que consiste en medir el consumo diario de agua durante 15 minutos alrededor de cada 24 horas. El día de la adquisición, los animales tienen acceso al estímulo gustativo nuevo (Sacarina 1). Quince minutos después del consumo se les inyecta intraperitonealmente una solución de cloruro de litio que genera malestar. En la siguiente presentación, el animal lo reconoce como aversivo y disminuye su consumo. Este modelo conductual permite medir la MCP y la MLP en el mismo animal sin generar extinción. La MCP y la MLP se miden 4:00 hrs (sacarina 2) y 72 hrs (sacarina 3) después de la adquisición respectivamente.

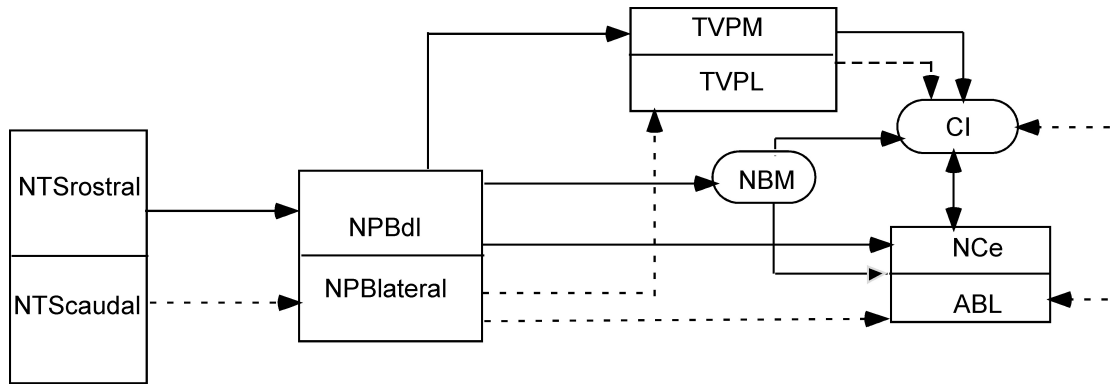


Figura 1.3: Vías de procesamiento de la información gustativa (línea continua) y visceral (línea punteada). Núcleo de tracto solitario (NTS), núcleo parabraquial (NPB), núcleo parabraquial dorsolateral (NPBdl), tálamo ventroposteromedial (TVPM), tálamo ventroposterolateral (TVPL), núcleo basalis magnocelularis (NBM), corteza insular (CI), núcleo central de la amígdala (NCe) y amígdala basolateral (ABL). Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004.

consecuencia de la inyección intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl), señalando así la entrada del estímulo incondicionado visceral en la formación de la memoria del CAS (Miranda et al., 2002).

1.6. Trazo de memoria del sabor

El sabor genera procesos relacionados con la formación de la memoria aversiva o de lo seguro (Bures, 1998). La representación neural de esta información es llamado trazo de memoria del sabor^c (TMS).

Se han descrito al menos dos elementos diferentes del TMS, el TMS aversivo y el TMS seguro. Ambos elementos del TMS son procesados diferencialmente en la corteza gustativa, localizada en la CI (Gutiérrez et al., 2003b) en su región agranular. La CI es una de las regiones donde se lleva a cabo la integración de los estímulos involucrados en el aprendizaje gustativo (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Al estudiar la liberación de ACh en CI, se mostró que la presentación de un estímulo gustativo familiar como el agua incrementa significativamente la liberación de ACh extracelular. Adicionalmente, cuando el estímulo gustativo es un sabor nuevo, la liberación de ACh incrementa significativamente sobre la liberación provocada por el estímulo gustativo conocido, y disminuye cuando el sabor se vuelve familiar tras varias presentaciones (Miranda et al., 2000). La CI recibe aferencias colinérgicas del NBM que son responsables de la liberación de ACh (Miranda y Bermúdez-Rattoni, 1999) y ambos elementos del TMS comparten mecanismos a través de la actividad colinérgica en la CI

^cEn inglés se conoce como taste memory trace y se ha dado a traducir al español como trazo de memoria del sabor.

(Gutiérrez et al., 2003a, b) y la corteza perirrinal (Gutiérrez, et al., 2004). En ambas cortezas, la activación de los receptores muscarínicos es necesaria para la formación del TMS de corto y largo plazo y de acuerdo con las consecuencias de la ingestión, el trazo de memoria adquirirá un significado que será almacenado como seguro o aversivo.

Por otra parte, la actividad glutamatérgica a través de los receptores tipo NMDA en CI, participa en la formación del TMS aversivo de largo pero no de corto plazo, y no son necesarios en la formación del TMS seguro (Gutiérrez et al., 2003b).

El TMS tiene una representación neuronal que permanece activa probablemente en paralelo en varias regiones del cerebro (Bures, 1998) y hasta ahora, solo ha sido descrito a nivel cortical. Por lo tanto, los elementos aversivo y seguro del TMS comparten mecanismos a través de la activación de los receptores muscarínicos de ACh, pero solo el TMS aversivo necesita la actividad de los receptores tipo NMDA.

1.7. Núcleo accumbens y memoria gustativa

El NAcc está relacionado con varias conductas como la ingesta de alimentos, la respuesta a estímulos aversivos o al estrés, y a la novedad de los estímulos, los cuales son importantes en la memoria gustativa. Estos aspectos se resumen en el Cuadro 1.1.

La cantidad de trabajos que relacionan directamente la participación del NAcc en el aprendizaje gustativo es muy pequeña y en su totalidad se enfocan al estudio del aprendizaje de aversión, siendo el sistema dopaminérgico el mejor descrito.

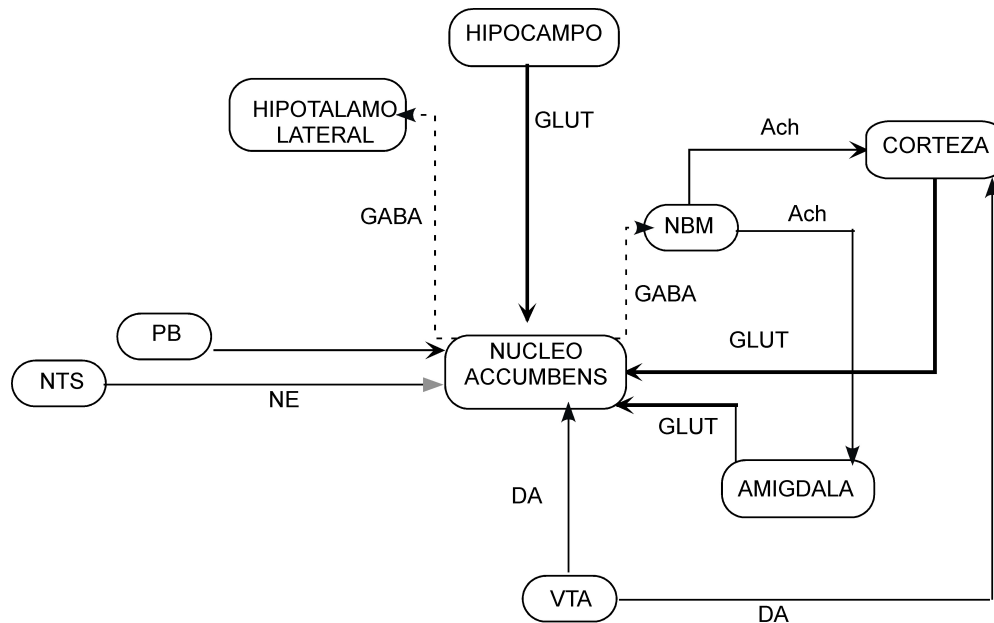


Figura 1.4: *Inervaciones de entrada y salida al NAcc. Abreviaciones: VTA.- área del tegmento ventral. NBM.- Núcleo basalis de Magnocellularis. NTS.- núcleo del tracto solitario. PB.- núcleo parabraquial. DA.- dopamina. Glut.- glutamato. ACh.- acetilcolina. NE.- norepinefrina. El NAcc recibe aferencias principalmente de cortezas de alto orden, polimodales como la corteza prefrontal, además de la amígdala basalateral, núcleo talámico intralaminar medio y regiones modulatorias en la zona preóptica del hipotálamo lateral y cerebro medio (Zahm, 2000). El NAcc medial presenta conexiones recíprocas neuronales de algunas estructuras de los ganglios basales, como el pallidum ventral y la sustancia nigra y con neuronas localizadas a través de la extensión rostrocaudal del hipotálamo lateral, el núcleo rojo de la stria terminalis, la sustancia inominata y la amígdala media. Por su parte, el NAcc lateral está conectado con el pallidum ventral, núcleo entopeduncular y su extensión media se une con el hipotálamo lateral y la sustancia nigra. El NAcc rostral es la unión entre los subnúcleos medial y lateral. Las proyecciones del NAcc rostral son en parte, reminiscencias de los sistemas de proyección del NAcc medial y lateral. Estos subnúcleos terminan con algunas extensiones en la parte dorsal del complejo pallidum, cerca de la comisura anterior. La mayoría de las proyecciones que salen del NAcc hacia el hipotálamo provienen del NAcc lateral. Las proyecciones del NAcc medial terminan masivamente a lo largo de la parte rostrocaudal del hipotálamo lateral. Adicionalmente, el NAcc medial y lateral inervan las parte media y lateral del área tegmental ventral (Zahm y Heimer, 1993). La parte caudal del NAcc medial recibe aferentes noradrenérgicas principalmente del NTS y en menor proporción de la parte rostral del locus coeruleus (Delfs et al., 1998). El NAcc recibe densas proyecciones glutamatérgicas de áreas como el hipocampo y la corteza prefrontal (Pennartz et al., 1994) y ABL (Kelley y Domesick, 1982; Brog et al., 1993; Wright y Groenewegen) y proyecciones dopaminérgicas originadas en el área tegmental ventral del cerebro medio. Finalmente, se han descrito densas proyecciones GABAérgicas provenientes del NAcc al cerebro anterior basal. Los trabajos del grupo de Sarter han demostrado que el NAcc modula las neuronas colinérgicas del cerebro basal hacia la corteza prefrontal (Sarter et al., 1999; Arnold et al., 2000).*

Cuadro 1.1: *Participación del NAcc en i) la ingesta de alimentos, ii) estrés y estímulos aversivos, iii) novedad, iv) aprendizaje y memoria y v) aprendizaje gustativo.*

i) ingesta de alimento			
Tratamiento	Ubicación	Resultados	Referencia
Inyecciones de antagonistas de los receptores AMPA/Kainato	NAcc medial	Incremento en la conducta de alimentación	(Maldonado-Irizarry et al., 1995; Kelley y Swanson, 1997)
Registro neuronal durante la ingesta de comida con un sabor atractivo	NAcc	Disminución de los niveles de glutamato durante y después de comer	(Rada et al., 1997; Saul'skaya y Mikhailova, 2003)
Bloqueadores de la recaptura de DA	NAcc	Aumento en la liberación de DA y en el consumo a sacarosa	(Hajnal y Norgren, 2001)
Inyecciones de agonistas de los receptores GABA A o GABA B	NAcc medial	Incremento en la ingesta de comida, sin afectar la de agua	(Stratford y Kelley, 1997)
ii) estrés y estímulos aversivos			
Tratamiento	Ubicación	Resultados	Referencia
Presentación de un estímulo aversivo: choque eléctrico	NAcc	Aumento en los niveles de DA	(Young et al., 1993)
Presentación de un estímulo aversivo: piquete en la cola	NAcc lateral	Incremento en la respuesta dopaminérgica	(Stevenson y Gratton, 2003)
Infusión de un agonista dopaminérgico	NAcc medial	Aumento en las respuestas aversivas provocadas por quinina intraoral	(Sederholm et al., 2002)
iii) novedad			
Tratamiento	Ubicación	Resultados	Referencia
Inyecciones de antagonistas de los receptores tipo NMDA/AMPA	NAcc	Daño en la habilidad de exploración de un objeto nuevo	(Sargolini et al., 2003)
Microdiálisis durante la ingesta de un alimento nuevo	NAcc	Decremento en la actividad neuronal	(Lee et al., 1998)
Bloqueo de los receptores NMDA	NAcc	Afectación en la reactividad a los cambios espaciales	(Usiello et al., 1998)

iv) aprendizaje y memoria			
Tratamiento	Ubicación	Resultados	Referencia
Inyecciones de antagonistas de los receptores tipo NMDA previas al entrenamiento	NAcc	Afectación del proceso de adquisición de la prevención pasiva	(Martínez et al., 2002)
Inyecciones de inhibidores de síntesis de proteína	NAcc lateral	Afectación de la consolidación de la memoria de una prueba instrumental	(Hernández et al., 2002)
Lesiones electrolíticas e infusiones de antagonistas dopaminérgicos hechas antes del entrenamiento	NAcc	Inhibición del aprendizaje del laberinto de agua de Morris	(Setlow, 1997)
Microdiálisis durante la presentación de un estímulo que previamente ha sido apareado con un choque eléctrico	NAcc	Incremento de la liberación de DA en mayor proporción a la observada con el choque eléctrico	(Young et al., 1998)

v) aprendizaje gustativo			
Tratamiento	Ubicación	Resultados	Referencia
Microdiálisis durante la presentación de sacarina pareada con LiCl	NAcc	Decremento en la liberación de DA	(Mark et al., 1991)
Microdiálisis durante la presentación de sacarina pareada con LiCl	NAcc	Aumento en la liberación de ACh durante el consumo	(Mark et al., 1995)
Inyecciones de antagonistas D1 5 minutos después de la presentación de sacarina	NAcc medial	Afectación de la formación del condicionamiento aversivo a los sabores	(Fenu et al., 2001)

Mark y sus colaboradores (Mark et al., 1991) encontraron que la sacarina intraoral incrementa la liberación de DA en el NAcc antes de ser pareada con un estímulo aversivo y una vez que es asociada, tal liberación disminuye (Mark et al., 1991). Fenu y sus colaboradores (Fenu et al., 2001) recientemente mostraron que el sistema dopaminérgico en el NAcc medial, pero no el lateral, participa en la formación de la memoria gustativa de aversión.

Otro sistema de neurotransmisión estudiado en el NAcc durante la formación de esta memoria,

es el sistema colinérgico. Y al respecto existe solo un trabajo donde se muestra la participación de este sistema en la formación de la memoria de aversión gustativa. Cuando la sacarina ha sido pareada con el LiCl hay un incremento de la liberación de ACh durante el consumo. Esta liberación permanece significativamente elevada veinte minutos después de la infusión intraoral (Mark et al., 1995), sugiriendo una participación del NAcc en la consolidación de la memoria.

En el caso del sistema glutamatérgico, al menos para la memoria gustativa, no se ha descrito si este sistema de neurotransmisión participa o no en la formación de la misma, a pesar de que el NAcc recibe aferencias glutamatérgicas de CI y amígdala (Kelley y Domesick, 1982; Brog et al., 1993; Wright y Groenewegen, 1996) estructuras ampliamente relacionadas con esta memoria.

En una tarea de aversión, como lo es la prevención pasiva, el bloqueo bilateral de los receptores tipo NMDA de glutamato en el NAcc antes del entrenamiento, pero no después del mismo, afecta la adquisición de la tarea (Martínez et al., 2002). Lo que sugiere fuertemente que estos receptores en el NAcc son necesarios en la adquisición de una tarea aversiva. Dado que el NAcc recibe proyecciones glutamatérgicas de estructuras relacionadas con la memoria gustativa de aversión y se ha mostrado la participación de los receptores tipo NMDA en una memoria aversiva, es probable que la activación de estos receptores participen en la formación de la memoria gustativa de aversión.

Finalmente, se sabe que como consecuencia del entrenamiento del CAS se observa que ambos subnúcleos del NAcc muestran un incremento en el gen de expresión temprana c-fos (Yasoshima, 2006), apoyando el hecho del que el NAcc participa en la consolidación de la memoria gustativa (para una mejor descripción del papel del NAcc en la memoria gustativa revisar el apéndice anexo al final de este trabajo).

A pesar de la información que se tiene sobre el papel del NAcc en la formación del aprendizaje gustativo, aún no se ha descrito su participación en la formación del TMS seguro.

1.8. Comunicación interestructural

En la CI se ha reportado un incremento en la liberación de ACh como consecuencia de la presentación de un estímulo gustativo nuevo (Miranda, et al 2000), tal liberación es modulada por la activación del NBM (Miranda, 1999). Se ha observado que la aplicación sistémica de anfetaminas incrementa la liberación de ACh en corteza prefrontal y se ha postulado que esto se debe a que se estimula la liberación dopaminérgica en el NAcc (Arnold et al., 2000). El incremento de ACh cortical es atenuado por la aplicación dentro del NAcc de antagonistas dopaminérgicos D1 y más notablemente por antagonistas dopaminérgicos D2. Esto apoya la idea de que la DA en el NAcc, vía proyecciones GABAérgicas al cerebro anterior basal, modula las neuronas colinérgicas del cerebro basal (Sarter et al., 1999; Arnold et al., 2000) mediante un circuito NAcc–NBM–Corteza.

La actividad del NAcc puede ser modulada por varias estructuras, entre ellas esta el núcleo parabraquial (NPB). El NPB es una estructura ampliamente relacionada con el aprendizaje gustativo. Estudios de microdiálisis han mostrado que el consumo de una solución con sacarosa, en comparación con un consumo de agua, incrementa los niveles de la liberación de DA en el NAcc de manera dependiente a la concentración de la solución con sacarosa (Hajnal, 2001; Hajnal, 2004). Ratas con lesiones en el NPB muestran menor intensidad en la liberación de DA durante el consumo de la sacarosa en el NAcc (Hajnal, 2005). El NPB tiene densas proyecciones a estructuras límbicas, incluyendo axones hacia el NAcc medial (Zahm and Heimer, 1990; Zahm, 2000). Por ejemplo, el NPB envía axones al núcleo central de la amígdala, hipotálamo lateral entre otros (Fulwiler, 1984; Halsell, 1992). Algunos de los blancos de las terminales del NPB están conectadas con el VTA (Oades, 1987), por lo que se ha propuesto que el NPB puede modular la actividad del NAcc a través de conexiones al VTA (Hajnal, 2005).

1.9. Núcleo parabraquial

El NPB se considera el segundo relevo de la información proveniente del NTS (Yamamoto et al., 1994; Sakai y Yamamoto, 1999). Los axones provenientes de las neuronas del área gustativa y de la zona visceral del NTS terminan en el área central y la zona lateral del NPB respectivamente (Yamamoto et al., 1994; Reilly, 1999).

Las lesiones totales del NPB que se hacen antes, pero no después, de la adquisición del CAS provocan pérdidas en el aprendizaje de esta tarea. Estos resultados indican que el NPB no es el sitio final de almacenaje de la memoria del CAS y que esta estructura no es necesaria para la evocación de esta tarea (Grigson et al., 1997; Reilly, 1999). Se sabe que este tipo de lesiones no afecta la capacidad del animal en procesar tanto el estímulo gustativo como el estímulo visceral (Grigson et al., 1998).

El entrenamiento del CAS provoca cambios en la expresión de c-fos en el NPB. En los subnúcleo lateral dorsal y lateral del NPB se encuentran representados los estímulos hedónicamente positivos y negativos respectivamente (Yamamoto et al., 1994). La sacarina es un estímulo gustativo que induce la expresión de c-fos en la zona hedónicamente positiva del NPB. El mismo estímulo cambia su valor hedónico, induciendo la expresión de c-fos en la zona hedónicamente negativa como consecuencia del entrenamiento en el CAS. Este resultado indica que el NPB sufre cambios atribuibles a la asociación entre el sabor y el malestar gástrico (Yamamoto et al., 1994). Esto sugiere que al menos en el caso del LiCl, el consumo de un sabor nuevo produce cambios en la transmisión sináptica en el NPB que permiten la asociación con el estímulo aversivo. Sin embargo, estos cambios son necesarios pero no suficientes para lograr un aprendizaje aversivo a un sabor, ya que cuando se lesiona la CI, la

amígdala o el tálamo, se pierde por completo la expresión conductual del CAS (Yamamoto et al., 1994).

También se ha propuesto que el NPB participa no sólo en la asociación de los estímulos, sino que además durante la adquisición del aprendizaje gustativo. Utilizando la técnica de microdiálisis en libre movimiento, se describió un incremento importante de serotonina inmediatamente después del consumo de la sacarina o bien después de la inyección de LiCl, cuando ambos estímulos se presentaron por separado. Sin embargo, la asociación de ambos estímulos no generó cambios en la liberación de serotonina. Estos resultados sugieren que el sistema serotoninérgico participa en el procesamiento de ambos estímulos, sin intervenir en el proceso de asociación (Zach, P, et al., 2006).

1.9.1. Sistema glutamatérgico durante la memoria gustativa en el NPB

El glutamato juega un importante papel en la neurotransmisión del NPB. Se ha sugerido, la participación del sistema glutamatérgico durante la formación de la memoria del CAS. Cuando los animales ingieren un sabor nuevo como la sacarina o bien, se les inyecta intraperitonealmente LiCl existe un incremento significativo en la liberación de glutamato en el NPB. Sin embargo, si el LiCl se inyecta una hora después de la ingestión de la sacarina, la liberación de glutamato en el NPB llega a ser mayor que la provocada por los estímulos aplicados independientemente (Bielavska et al., 2000).

Recientemente, se ha mostrado, la participación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato en la formación del CAS. Las infusiones se realizaron bilateralmente en el NPB entre la presentación del estímulo gustativo y el malestar gástrico provocado por la inyección de LiCl. Se infundió antagonistas glutamatérgicos como L-AP3, antagonista metabotrópico, MK801 y D-APV, antagonistas ionotrópicos. La aplicación de APV en el NPB no tuvo ningún efecto en la formación de la memoria de largo plazo. Se observó un efecto dosis dependiente en la formación del CAS con la infusión de MK801, es decir a mayor dosis mayor efecto en la memoria del CAS. Por el contrario el bloqueo de los receptores metabotrópicos de glutamato, afectó la asociación del estímulo gustativo con el malestar gástrico. Estos resultados indican que los receptores tipo NMDA no participan en la asociación de ambos estímulos en la formación de la memoria del CAS de largo plazo, por otra parte, en este mecanismo pueden estar participando los receptores metabotrópicos de glutamato o bien los receptores AMPA-Kainato (Vales, et al., 2006). Sin embargo no se conoce si los receptores tipo NMDA participan en la formación del TMS o bien en la formación de la MCP.

Capítulo 2

Planteamiento del problema

Como ya se mencionó, el sistema colinérgico cortical está ampliamente relacionado con procesos asociativos y en etapas tempranas de la formación de la memoria. Se ha mostrado que la actividad neuronal del NAcc, a través de proyecciones GABAérgicas al cerebro anterior basal, puede afectar la actividad colinérgica cortical. Adicionalmente, hay evidencia de la participación del NAcc en la formación de diversas memorias.

Hasta ahora no se ha descrito la participación del NAcc en un circuito estructural para la formación de una memoria en la cual sea importante la modulación colinérgica cortical a través del NBM.

Esta característica la cumple la memoria gustativa. Por una serie de estudios se ha mostrado que la actividad colinérgica cortical es indispensable para la formación de esta memoria. Por otra parte, hay evidencia, aunque poca, de la participación de ambos subnúcleos del NAcc en la formación de la memoria gustativa.

Cuando se prueba un sabor, se genera una representación del mismo en diversas estructuras cerebrales. Esta representación está dada por la actividad de grandes poblaciones neuronales y se ha observado que es dependiente de ciertos sistemas de neurotransmisión. Se sabe que al menos en las cortezas insular y perirrinal, esta representación necesita la actividad de los receptores muscarínicos de ACh para perdurar en el tiempo. A estas representaciones duraderas del sabor se les conoce como trazo de memoria del sabor (TMS). Dicho TMS puede a su vez ser asociado a otras representaciones internas que son dadas principalmente por las consecuencias gástricas que tenga el consumo del sabor, es decir, si las consecuencias son negativas se generará aversión. Si por el contrario, no ocurre nada desagradable, y el sabor por sí mismo no es aversivo, se almacenará dicha memoria como segura. En este sentido se ha determinado que los receptores tipo NMDA de glutamato al menos en la corteza insular, son necesarios para el almacenamiento de la memoria gustativa de aversión y que los receptores muscarínicos de ACh a nivel cortical son indispensables para formar cualquiera de las

dos memorias gustativas.

El NAcc tiene proyecciones glutamatérgicas de estructuras como la amígdala y la CI, además de poseer interneuronas colinérgicas.

De todo lo anterior se desprende la siguiente pregunta ¿participan ambos subnúcleos del NAcc en la formación del TMS? y de ser así, ¿es necesaria la activación de los receptores muscarinícos de ACh en ambos subnúcleos del NAcc durante la formación del TMS sin importar las consecuencias gástricas del consumo de un estímulo gustativo?

Y si las consecuencias gástricas son aversivas ¿es necesaria la activación de los receptores tipo NMDA en ambos subnúcleos del NAcc en la formación del TMS aversivo?

Hay un solo trabajo donde se relaciona al NAcc con procesos de consolidación, y si el NAcc participa en el formación de la memoria gustativa cabe preguntarse ¿ existe consolidación de la memoria gustativa en el NAcc?

Es posible entonces que el NAcc participe en la formación del TMS a través de la activación de los receptores tipo NMDA de glutamato y muscarinícos de ACh, así como en la consolidación de la memoria gustativa.

Por otra parte, se ha propuesto que el NPB puede modular la actividad del NAcc através de conexiones al VTA. El NPB es una estructura ampliamente relacionada con la formación de la memoria gustativa y se ha mostrado que la activación del sistema glutamatérgico es necesario durante esta memoria. Los receptores tipo NMDA no se requieren para la formación de la MLP del CAS cuando estos son bloqueados entre el consumo del estímulo gustativo y la inducción del malestar. No se ha explorado la formación de la MCP y tampoco se conoce si estos receptores son necesarios durante la adquisición de la tarea.

Es posible que, la actividad glutamatérgica en el NPB observada durante la formación de la memoria gustativa está involucrada en procesos relacionados con la formación del TMS de aversión, durante la adquisición del CAS a través de la actividad de los receptores tipo NMDA, dado que se ha mostrado que no es necesaria durante la asociación.

Un aspecto interesante a considerar, es que la memoria gustativa de aversión permite la medición de la MCP y la MLP en el mismo sujeto sin tener consecuencias de extinción. Se ha mostrado que, al menos en la memoria gustativa, a nivel cortical, la MLP depende de la MCP, es decir, que las manipulaciones farmacológicas hechas a nivel cortical al afectar la MCP se ve afectada la MLP. Recientemente Izquierdo y su grupo han presentado evidencia experimental que sugiere que el proceso de la formación de la MLP no es un proceso lineal y que ambos tipos de memoria pueden formarse por medio de mecanismos independientes. Por lo anterior, decidimos medir ambas memorias en el NAcc y en el PBN para determinar si en estas estructuras la MLP es dependiente o

independiente de la MCP en la memoria gustativa de aversión.

2.1. Objetivos generales

Determinar la participación de ambos subnúcleos del NAcc en la formación de la memoria gustativa.

Determinar la participación del NPB en la formación del TMS aversivo.

2.2. Objetivos particulares

1. Estudiar la participación de ambos subnúcleos del NAcc en la formación del TMS a través de la participación de los receptores tipo NMDA de glutamato y muscarínicos de ACh (sección experimental 1).

2. Determinar si el NAcc participa en la consolidación de la memoria gustativa (sección experimental 2).

3. Estudiar la participación del NPB en la formación del TMS aversivo a través de los receptores tipo NMDA de glutamato (sección experimental 3).

4. Observar si la formación de la MLP es dependiente de la MCP en ambas estructuras (sección experimental 1 y 3).

Capítulo 3

Método

3.1. Sujetos

Fueron utilizados ratas machos de la cepa Wistar, de pesos entre 250 y 325 g, en todos los experimentos.

3.2. Implantación de cánulas guías

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (40 mg/kg). De acuerdo al experimento, grupos independientes de animales fueron implantados en el NAcc medial, NAcc lateral o bien en el NPB, siguiendo procedimientos estereotáxicos.

3.3. Fármacos

En todos los casos, se utilizó una solución artificial de líquido cefalorraquídeo (ACSF) como vehículo. Se utilizó DL-APV, un antagonista de los receptores tipo NMDA. Escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos. Anisomicina un inhibidor de síntesis de proteínas. Todos los fármacos se ajustaron a un pH a 7.4 y llevados a su concentración final en solución de ACSF.

3.4. Microinyecciones

Las microinyecciones se realizaron utilizando una bomba de inyección y microjeringas halmilton de 10 μ l. Los inyectores tenían un largo adicional a la guía cánula de 2.5 mm.

3.5. Histología

Para confirmar el lugar de la microinyección se realizó la tinción de violeta de cresilo. Aquellos animales que no cumplieran el requisito de ubicación correspondiente con la estructura fueron excluidos del análisis estadístico.

3.6. Procedimiento conductual de memoria gustativa

Se utilizaron el condicionamiento aversivo a los sabores y la atenuación de la neofobia en grupos independientes de animales en cada experimento.

Los cambios en el consumo fueron analizados en relación con el promedio de la línea basal de consumo de agua. En el caso de la atenuación de la neofobia, la respuesta neofóbica fue analizada en términos de la reducción del consumo ingerido del sabor nuevo (sacarina). La AN fue observada por el incremento del consumo de sacarina en las siguientes presentaciones. La respuesta de aversión, tanto para la MCP como la MLP, fue analizada por la reducción del consumo de la sacarina.

El promedio del consumo de la línea base se calcula como

$$\text{Porcentaje de consumo con respecto a la línea base} = 100 \times \frac{\text{consumo de sacarina}}{\text{promedio de la línea base}}$$

En todos los casos de comparación estadística entre dos grupos se utilizó una prueba *t* de Student de muestras no pareadas. En el caso de tener una comparación entre más de dos grupos, se utilizó una ANOVA factorial

Los métodos se encuentran detallados en cada uno de los trabajos presentados en esta tesis doctoral.

Capítulo 4

Resultados

Este trabajo está dividido en tres secciones experimentales.

Sección 1. Corresponde al estudio de la participación del NAcc en la formación de ambos elementos del TMS, tomando en cuenta la formación de la MCP y la MLP en el CAS. Los resultados y la discusión se presentan en el artículo “NMDA and Muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation”. Publicado en *Learning and Memory*, 2006 Enero-Febrero;13(1):45-51.

Sección 2. Presenta resultados no publicados acerca de la participación del NAcc en la consolidación de ambas memorias gustativas.

Sección 3. En esta sección se encuentran los resultados obtenidos con el estudio del NPB en la formación del TMS aversivo, Los resultados y discusión se describen en el artículo “Cortical and parabrachial nucleus NMDA receptors activity are differentially involved in Short and Long-Term taste memory formation”. Dicho trabajo se encuentra en preparación para su publicación.

4.1. Sección experimental 1

NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation

Leticia Ramírez-Lugo, Sergio Zavala-Vega, and Federico Bermúdez-Rattoni¹

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253 México D.F., 04510, México

Animals recognize a taste cue as aversive when it has been associated with post-ingestive malaise; this associative learning is known as conditioned taste aversion (CTA). When an animal consumes a new taste and no negative consequences follow, it becomes recognized as a safe signal, leading to an increase in its consumption in subsequent presentations (attenuation of neophobia, AN). It has been shown that the nucleus accumbens (NAcc) has an important role in taste learning. To elucidate the involvement of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and muscarinic receptors in the NAcc during safe and aversive taste memory formation, we administered bilateral infusions of DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV) or scopolamine in the NAcc shell or core respectively. Our results showed that pre-training injections of APV in the NAcc core and shell disrupted aversive but not safe taste memory formation, whereas pre-training injections of scopolamine in the NAcc shell, but not core, disrupted both CTA and AN. These results suggest that muscarinic receptors seem to be necessary for processing taste stimuli for either safe or aversive taste memory, whereas NMDA receptors are only involved in the aversive taste memory trace formation.

The nucleus accumbens (NAcc) is a structure located in the rostromedial forebrain and it is the major component of the ventral striatum. Three subterritories have been described for the NAcc; two caudal regions called core and shell, and the rostral pole (Zahm 2000). Several papers have related the functions of the NAcc with mechanisms of feeding (Kelley and Swanson 1997; Saul'skaya and Mikhailova 2003), motivation (Salamone 1996), reward (Berridge and Robinson 1998), and addiction (Bliss and Collingridge 1993; Everitt et al. 1999). Moreover, it has been suggested that gastric-related signals are transmitted to the NAcc via the hypothalamus, therefore, the NAcc could contribute to the integration of gastric vagal signals related to digestive processes (Mehendale et al. 2004).

When an animal consumes a new taste, it reduces its ingestion (neophobic response), and if there are no negative consequences afterwards, it becomes recognized as a safe signal, leading to a gradual increase of its consumption (attenuation of neophobia, AN). However, if the gustatory stimulus is paired with post-digestive malaise, the animal will recognize the taste as an aversive cue, thus developing conditioned taste aversion (CTA). Both aversive and safe memories depend on a neural representation of the taste, which is possibly stored in parallel in several brain regions. This neural representation has been called the Taste Memory Trace or TMT (Bermúdez-Rattoni 2004). It has been demonstrated that the insular cortex (IC), basolateral amygdala (BLA), parabrachial nucleus (PBN), and nucleus of the solitary tract (NTS) play important roles in taste memory formation (Yamamoto et al. 1994). Particularly, it has been described that the safe TMT depends on cortical muscarinic receptors' activity for consolidation, whereas the aversive TMT is at least partially dependent on the NMDA receptor activity (Gutierrez et al. 2003a).

Another structure that recently has been linked to taste

memory formation is the NAcc. The NAcc receives important inputs from structures involved in taste memories, like glutamatergic fibers from the BLA and IC (Kelley and Domesick 1982; Wright and Groenewegen 1996), as well as noradrenergic innervations from the NTS (Pennartz et al. 1994; Delfs et al. 1998). When saccharine has been associated with LiCl, it produces a significant increase of acetylcholine (ACh) levels in the NAcc during its consumption (Mark et al. 1995). Additionally, it has been reported that intraoral novel saccharine infusion increases dopamine (DA) in the NAcc. However, the same stimulus previously associated with LiCl, produced significant decreases in DA release (Mark et al. 1991). More recently Fenu and coworkers showed that a micro infusion of D1 antagonist (SCH 39166) into the NAcc shell impaired CTA learning (Fenu et al. 2001). Nevertheless, there is not enough information about the role of NMDA and muscarinic cholinergic receptors' functions in the NAcc during the TMT formation. Here we explore the role of NMDA and muscarinic receptors in safe and aversive taste learning by administering bilateral infusions of APV (an antagonist of the NMDA receptors) and scopolamine (nonselective antagonist of muscarinic receptors), in the NAcc shell and core.

Results

Figure 1 shows an example of the NAcc cannulae placement. Histological analysis shows that in the majority of animals, the injection site was located in the NAcc shell (see Fig. 1A), or core (see Fig. 1B), respectively. Only the animals showing a correct placement of the cannulae were included in the statistical analysis. Thirteen animals were excluded from the analysis because the tips of their cannulae were misplaced.

Pre-training APV or scopolamine disrupts short and long aversive TMT

During the acquisition of CTA, all the animals drank the total amount of 10 mL presented. Figure 2B shows the effects of muscarinic and NMDA receptor antagonists into the NAcc shell on

¹Corresponding author.

E-mail fbermude@ifc.unam.mx; fax 011 52 55 5622 5607

Article and publication are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/ml.103206>.

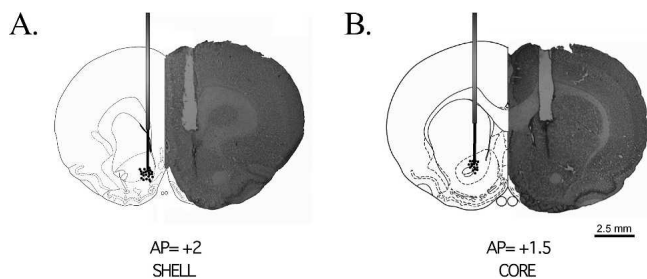


Figure 1. A photomicrograph of a coronal section of the rat brain stained with cresyl violet and a diagram of the cannulae location from the NAcc shell (A, AP = +2 ± 0.3 mm from Bregma) or the NAcc core (B, AP = +1.5 ± 0.3 mm from Bregma) during microinjection. The points represent the localization of the cannulae.

both short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) of conditioned taste aversion. No significant differences among groups were found in the water baseline. During the STM and LTM tests, significant differences in saccharine intake were found among groups ($F_{3,39} = 8.865$; $F_{2,39} = 6.605$ respectively; $P < 0.01$). Post hoc Fisher's test showed that both scopolamine and APV groups had a significantly higher saccharine consumption than the vehicle-injected and intact groups ($P < 0.01$).

Figure 2C shows the effects of muscarinic and NMDA receptor antagonists into the NAcc core. ANOVAs revealed significant differences between groups in saccharine consumption on the STM and LTM tests ($F_{2,20} = 15.906$; $F_{2,20} = 5.791$, respectively, $P < 0.01$). Post hoc Fisher analysis revealed a significantly higher saccharine consumption in the APV group ($P < 0.01$). Thus, NAcc shell pre-training injections of APV and scopolamine impaired STM and LTM of CTA, while pre-training injection of APV, but not scopolamine into the NAcc core, impaired STM and LTM of CTA.

Post-training injections of APV or scopolamine do not block aversive TMT

APV or scopolamine injected immediately after the first presentation of saccharine during CTA training procedure yielded no significant differences among groups in saccharine consumption during the STM and LTM tests (see Fig. 3B,C). This was the case both when the antagonists were injected into the NAcc core ($F_{2,15} = 0.633$, NS) or shell ($F_{2,15} = 0.633$, NS).

Pre-training scopolamine, but not APV blocks safe TMT

Figure 4B shows the effect of pre-training injection of APV, scopolamine or vehicle into the NAcc shell on neophobia (first presentation of saccharine taste) and on attenuation of neophobia (second presentation of saccharine), when no aversive consequences are induced (no lithium chloride injected after the first saccharine presentation, see Fig. 4A). ANOVA analyses showed that pre-training injection of APV or scopolamine did not affect the taste response to novelty ($F_{3,41} = 0.5499$, NS), while there were significant differences between groups ($F_{3,41} = 17.390$; $P < 0.01$) in attenuation of neophobia (AN), an increase in saccharine consumption in a subsequent presentation). Post hoc Fisher analysis revealed a significantly lower saccharine consumption during the AN test in the scopolamine group than in the vehicle group ($P < 0.01$), while the APV group did not differ significantly from the vehicle and intact groups. Thus, only the group injected with scopolamine into the NAcc shell failed to increase its saccharine consumption during the AN test, and therefore shows an abolished AN.

As can be seen in Figure 4C, no significant differences in neophobic response were seen between animals injected into the NAcc core with APV, scopolamine or ACSF injections

($F_{2,14} = 1.375$; NS, see Fig. 4C), which shows that APV or scopolamine injections before taste presentation do not affect taste perception. All animals show attenuation of neophobia (AN) during the second saccharine consumption. However, no significant differences among groups were found in saccharine consumption ($F_{2,14} = 1.656$; NS).

Additionally, no significant differences among groups were found in saccharine consumption during a third saccharine presentation, neither on the NAcc core-injected animals ($F_{2,13} = 1.086$, NS) nor on the NAcc shell-injected animals ($F_{3,41} = 1.527$, NS) (data not shown).

Discussion

The present study was designed to investigate the effects of NMDA and muscarinic antagonists in the NAcc shell and core on the formation of taste memory. The NAcc has been widely reported to participate in appetitive reinforced learning tasks (Salamone et al. 2005). However, aversive and safe taste memory formation had not been included, expanding thus the role of the NAcc in learning processes.

In these experiments, we demonstrated that a pre-training injection of APV, on both the NAcc shell and core, impaired short-term and long-term aversive taste memory, without affect-

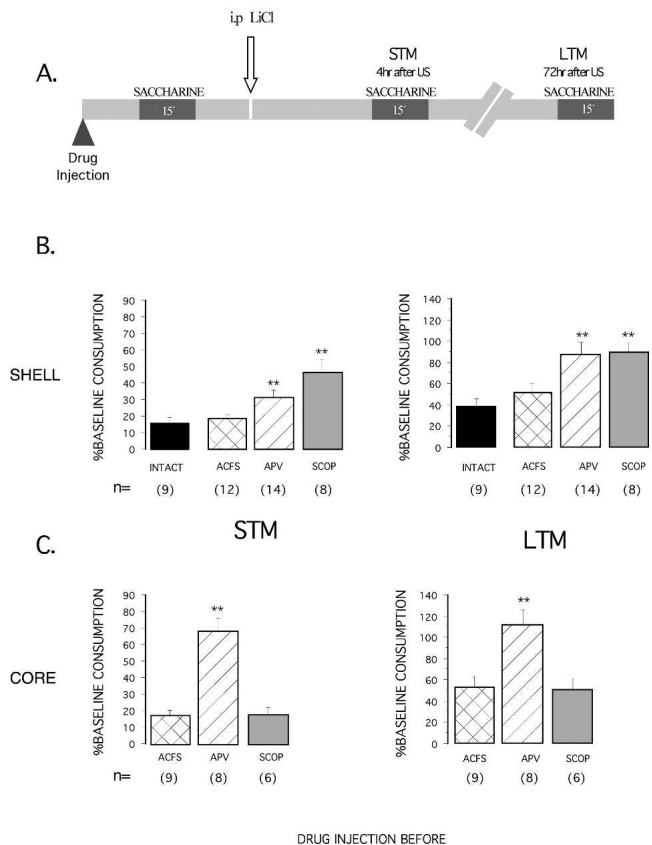


Figure 2. (A) A representation of experimental protocols used to study the aversive TMT (pre-training injection) and percentage of baseline consumption (mean ± SEM) on short and long-term test memory, for the NAcc shell (B) and the NAcc core (C). The reduction of saccharine consumption with respect to baseline intake was used as a measure of strength of aversion. The figure demonstrates the effects of APV and scopolamine (SCOP) microinjections 15 min before taste presentation of CTA. The "intact" group remained without treatment as naive control. ** $P < 0.01$, as compared to their vehicle controls (post hoc Fisher test), has significant differences from the other groups.

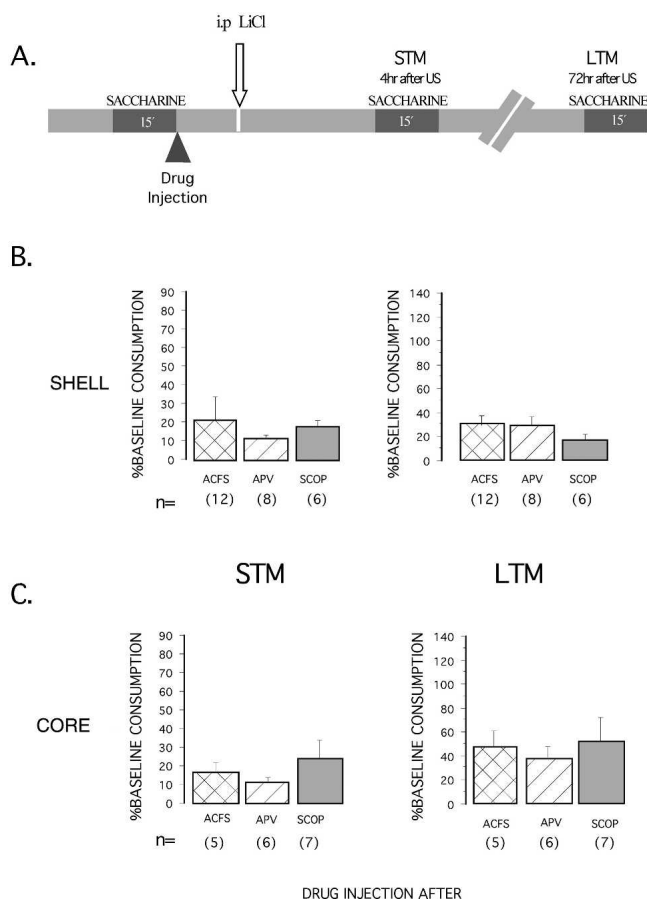


Figure 3. (A) A representation of experimental protocols used to study the aversive TMT (post-training injection) and percentage of baseline consumption (mean \pm SEM) on short and long-term test memory, for the NAcc shell (B) and the NAcc core (C). The figure shows the effects of APV and scopolamine microinjections immediately after taste presentation of CTA. No significant differences among groups were found in saccharine consumption on the test of STM and LTM.

ing the safe taste memory formation. Conversely, post-training injections of APV did not have any effect on either task. These results show that the NMDA receptors in the NAcc shell and core have an important role in the aversive, but not safe TMT. Our results also showed the involvement of cholinergic transmission on the NAcc shell for the encoding of both safe and aversive TMT. Thus, pre-training injection of scopolamine on the NAcc shell disrupted both short-term and long-term aversive taste memory, and also prevented the attenuation of neophobia, whereas post-training injections of scopolamine had no effects in aversive memory formation. Furthermore, the present results showed that the neophobic response was not affected by APV or scopolamine, since the animals presented a clear neophobic response, ruling out unspecific effects on taste perception by the microinjections of NMDA or muscarinic antagonists.

Glutamatergic activity

The main result presented here is that the NMDA receptor in the NAcc shell and core has a differential role in taste aversive or safe memory formation. The NMDA receptor activity is necessary in both the NAcc shell and core for acquisition, but not for consolidation, of aversive taste memory. These results are in accordance with previous findings demonstrating that intra accumbens blockade of NMDA type glutamate receptors interfered with the

acquisition process, but not with the consolidation of a passive avoidance task (Martinez et al. 2002). Moreover, we found that the APV produced stronger impairments in the formation of aversive STM, when injected in the NAcc core rather than in the NAcc shell, while its effects on LTM were similar in both sub nuclei. Accordingly, it has been proposed that NMDA receptor activation in the NAcc core may be an important mechanism through which stimulus-response associative learning occurs. Thus, injections of APV into the NAcc core, but not the shell, impaired response-reinforcement learning in the acquisition of a simple lever-press task to obtain food (Kelley et al. 1997). Conversely, for safe taste learning (AN), we found no effect of APV injection before taste presentation, suggesting that it does not affect the processing of the taste information required for safe taste memory formation. APV injections after taste presentation did not affect aversive taste learning, affecting only taste processing for aversive, but not safe, taste memory formation. These results support the proposed idea of the existence of two different memory traces generated by the consumption of a new taste, aversive and safe TMT (Gutierrez et al. 2003a; Bermúdez-Rattoni 2004), and suggest that the glutamatergic activity of the NAcc is involved only in the acquisition of aversive taste memory.

The taste and visceral information could reach the NAcc via two pathways: the NTS-parabrachial nucleus-central nucleus of the amygdala-ventral tegmental area-NAcc connection, and the insular cortex-BLA-NAcc pathway (McDonald 1991). It has been

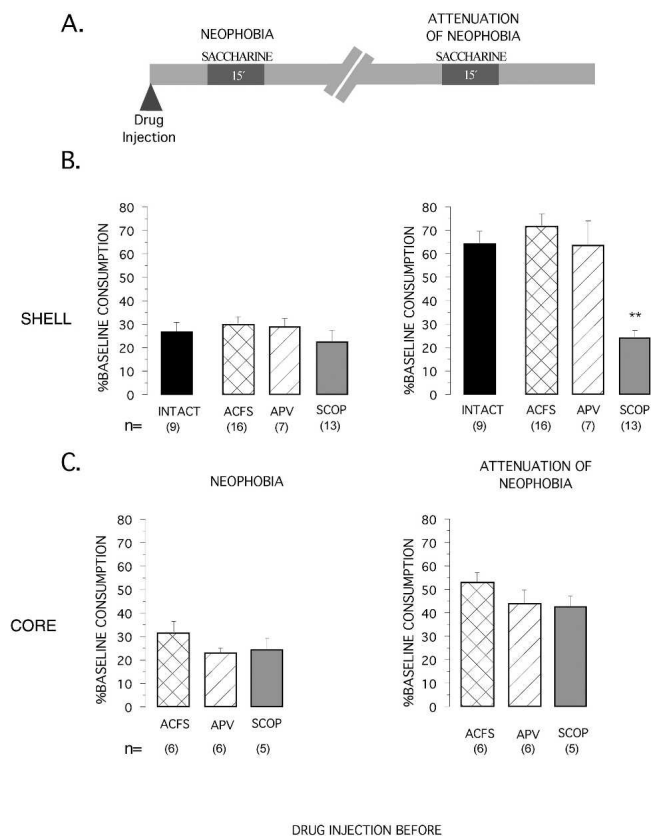


Figure 4. (A) A representation of experimental protocols used for studying the safe TMT. The effect of injection of muscarinic receptor antagonist, scopolamine (SCOP), NMDA receptor antagonist (APV), and vehicle (ACFS) microinjected bilaterally into the NAcc shell (B) and the NAcc core (C) 15 min before presentation of saccharine on d 5. The Neophobia and AN are expressed in percentage of baseline consumption. $**P < 0.01$, as compared to their vehicle controls (post hoc Fisher test), significantly differ from the other groups.

considered that the central nucleus is the main output nucleus of the amygdala, mainly by GABAergic efferents to midbrain autonomic sites (Swanson and Petrovich 1998). However, the central nucleus of amygdala connection to the NAcc has been less studied. Alternatively, the BLA sends a dense glutamatergic projection to the NAcc (Kelley and Domesick 1982; Brog et al. 1993; Wright and Groenewegen 1996). It has been shown that the BLA and the NAcc interact during the formation and expression of stimulus–reward associations (Everitt et al. 1991). In this regard, for CTA a dramatic increase in glutamate release in the BLA was observed after an injection of LiCl, suggesting that glutamate activity in the BLA signals the aversive input (Miranda et al. 2002). Therefore, given the participation of BLA in the processing of the aversive stimulus, it could be possible that the connection between BLA and NAcc plays a central role in relating the aversive taste memory trace with the information of the malaise-inducing agent. Even though our study cannot answer this issue, we propose that this mechanism would be implicated in aversive taste learning. Supporting this hypothesis, there is evidence of the participation of the NAcc in aversive learning (Pezze et al. 2001; Young 2004), and it is also suggested that NAcc dopamine is involved in aspects of sensory–motor functions that could be involved in aversive motivation (Salamone 1994). In this regard, neurochemical experiments have shown that both, naturally aversive and conditionally aversive stimulus, produce significant increments of dopamine release in the NAcc (Young et al. 1993). Complementarily, the insular cortex is highly involved in aversive taste learning (Bermúdez-Rattoni 2004) and since the BLA and the NAcc are important targets of agranular insular cortex efferent fibers (Ohara et al. 2003; Jasmin et al. 2004), and the innervations from the BLA coincides with projections from the dorsal agranular insular cortex into the NAcc core (Wright and Groenewegen 1996), it has been proposed, in an aversive learning situation, that at least some BLA–fugal fibers exert an inhibitory influence at the NAcc core level in the fibers coming from insular cortex (Louilot and Besson 2000). This might be the reason why we found stronger effects in the NAcc core compared to the NAcc shell. Therefore, a possible mechanism involved in the formation of aversive taste memory is the communication between the NAcc core, IC, and BLA, however this does not rule out the possibility that there could be other brain systems participating in the aversive taste memory along with the NAcc circuit proposed here.

It has been demonstrated that both subnuclei (shell and core) communicate through collateral neurons (Meredith 1999); the possibility exists that the effect observed in the NAcc shell after APV injection could be due to an interruption in the communication between them. It is important to examine the glutamatergic projection to the NAcc shell from the amygdala. Probably the effect observed in the NAcc shell is a consequence of blocking this projection. It also remains to be demonstrated whether there is an associative mechanism in the NAcc itself or if it modulates another structure where the aversive signals arrive from the BLA creating the aversive TMT. Since the coordinates for both subnuclei of the NAcc are very close to each other and we use different volumes, there is a possibility that the infusion of the drug in one subnuclei might produce some leakage to the other. Nevertheless, while we cannot rule out completely this possibility, we do believe that this did not happen since the effects of APV seem to be larger when applied in the core than in shell, and for scopolamine the effects were in the shell but not in the core (see below).

It is noteworthy that although the majority of reports of the NAcc on learning indicate its role in goal directed tasks with positive reinforcements (Everitt et al. 1999), we found that the effects of NMDA receptor antagonist are exclusively in the aver-

sive, but not in the safe taste memory formation. Nevertheless, we can not rule out the possibility of other neurotransmitter systems participating in safe taste learning processing in this structure, like the muscarinic ACh receptors (see below).

An interesting fact about the present results is that the NMDA receptor blockade in the NAcc affects both STM and LTM of CTA. This implies that the pharmacological treatment avoids the formation of an aversive taste memory completely, not merely memory consolidation (Martinez et al. 2002). This supports the proposed idea that NMDA receptor activation is necessary for the formation of the aversive TMT, which eventually might form an aversive STM and LTM. Therefore the NAcc, through the NMDA receptors, is involved in the aversive taste memory formation; these results are in accord with previous findings that demonstrate the role of the NAcc in others' aversive learning such as a passive avoidance task (Martinez et al. 2002; De Leonibus et al. 2003), aversively conditioned contextual stimuli (Pezze et al. 2001), and aversive olfactory learning in humans (Gottfried et al. 2002).

Cholinergic activity

NAcc cholinergic activity has previously been reported to be related with conditioned taste aversion learning (Mark et al. 1995). As noted, there is a significant increment of ACh release in the NAcc after the presentation of a conditioned aversive taste (Mark et al. 1995). In agreement with these results, we found that injections in the NAcc shell of scopolamine before, but not after taste presentation abolished STM and LTM of CTA, supporting the role of ACh activity in the NAcc on taste memory processing. We did not find any effects when the drugs were administered after the CS, ruling out any unspecific effects on the incoming US signal. However, as pre-training injection of scopolamine also disrupts AN, these results suggest that the activation of muscarinic receptors in the NAcc shell is necessary for normal learning about a taste stimulus. It should be pointed out that the injection of scopolamine did not affect taste perception, since the neophobic response to saccharine remained intact, regardless of the consequences of taste, i.e., safe or aversive TMT. These results support that CTA and AN initially share a similar component of the neural taste representation (Gutierrez et al. 2003b), which would be a common mechanism for both taste memory traces, through the activation of muscarinic receptors. Unlike APV, scopolamine injections either before or after taste in the NAcc core do not have any effect in aversive taste memory; these results indicate a differential role of cholinergic system in the NAcc on taste memory formation. It seems that the NAcc shell cholinergic activity is mainly involved in the formation of the TMT that can be later associated with either aversive or safe consequences. Although, it remains to be demonstrated whether the NAcc interneurons themselves could be participating in the associative process of taste presentation and its consequences to establish long-term memory for taste (either aversive or safe), since it has been demonstrated that the striatal cholinergic interneurons have an important role in triggering the intracellular mechanism that participates in synaptic plasticity, like corticostriatal facilitation (Centonze et al. 1999, 2003).

The cholinergic activity within the NAcc comes from the cholinergic interneurons (Pennartz et al. 1994) that are present in both shell and core subdivisions (Bolam et al. 1984; Meredith et al. 1989). ChAT-immunoreactive neurons are nearly three times denser in the caudal medial shell than in the core (Meredith et al. 1989). It has been reported that GABAergic output from the NAcc can be regulated positively by nicotinic ACh receptors, and negatively by muscarinic ACh receptors (de Rover et al. 2002). A possible mechanism for the participation of muscarinic receptor in the NAcc shell in taste learning is through its modulation to the

nucleus basalis magnocellularis (NBM) and in turn with its cholinergic projections to the insular cortex (Miranda and Bermúdez-Rattoni 1999). It has been demonstrated that the NAcc shell can regulate ACh release in prefrontal cortex via its modulation to NBM (Neigh-McCandless et al. 2002). It has been suggested that the NAcc regulates the excitability of the NBM cortical cholinergic projections, by the GABAergic projection from the NAcc shell (Zahm and Heimer 1993; Neigh et al. 2004). Thus, inactivation of muscarinic ACh receptors in the NAcc might lead to an increase in GABAergic output projecting to NBM, generating a change in the levels of ACh in the cortex. It is well demonstrated that the cholinergic activity in IC has an important role in taste memory formation (Naor and Dudai 1996; Ferreira et al. 2002; Ramírez-Lugo et al. 2003). It is possible that the intra NAcc cholinergic activity modulates the taste inputs to the IC or to the amygdala through its connectivity with regions involved in taste memory formation.

Conclusions

These results provide the first evidence of the NAcc core and shell participation in the formation of aversive, but not safe TMT through their NMDA receptors. In addition, the results also showed the participation of the NAcc shell in the formation of both, aversive and safe TMT through its muscarinic receptors. Thus, the results presented here support the existence of two memory traces triggered by taste consumption, one of which is ruled out afterwards depending on the gastric consequences of the taste, which determines the formation of an aversive or safe gustatory memory. In this regard, the results showed that NMDA receptor activity of the NAcc core and shell seems to be involved in the formation of aversive taste memory trace, probably through their glutamatergic projections coming from the BLA, whereas muscarinic receptors' activity of the NAcc shell are involved in the initial formation of both taste memory traces, which can be later supported with either aversive or safe consequences.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats ($N = 185$), with a weight between 280 and 320 g at the time of surgery were used. They were caged individually and kept in a 12-h light/12-h dark cycle phase. All behavioral manipulations were performed in the light cycle phase. Rats received lab chow throughout the experiment. Experiments were performed in accordance with the Rules in Health Matters (Ministry of Health, Mexico) and with approval of the local Animal Care Committee.

Surgery

The animals were implanted bilaterally with 12-mm 23-gauge stainless steel cannulae under anesthesia (sodium pentobarbital, 40 mg/kg, i.p.) using standard stereotaxic procedures. The tips of the cannulae were aimed 2.5 mm above either the NAcc shell (anteroposterior, +2 mm; lateral, ± 1 ; ventral, -5.3 mm; from Bregma); or the NAcc core (anteroposterior, +1.5 mm; lateral, ± 1.9 ; ventral, -4.7 mm; from Bregma) (Paxinos and Watson 1998). The cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed in the skull. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent clogging. After surgery, the animals had food and water ad libitum during four days, and the following day they were deprived of water for 24 h.

Micoinjection

The intra-accumbens micoinjections were given to hand-restrained, conscious animals. The stylets were withdrawn from the guide cannulae and injection needles (30 gauge) were inserted, extending 2.5 mm from the tip of the guide cannulae. The injection needles were connected via polyethylene tubing to two

10 μ L Hamilton micro syringes, driven by an automated micro-infusion pump (Carnegie Medicine). A total volume of 1 μ L and 0.5 μ L per hemisphere were delivered in the NAcc shell and core respectively at a rate of 0.5 μ L/min in both cases. After the injections, the needles were retained in the guide cannulae for an additional 1 min to allow diffusion of the solution into the tissue minimizing the reflux along the injection track. We decided to use a differential volume in each of the NAcc subnuclei since there are reports using a volume of 1 μ L in the NAcc shell (Sederholm et al. 2002) and 0.5 μ L into the NAcc core (Di Ciano et al. 2001). Since the concentration of the drug remained constant for both subnuclei, the amount of drug molecules per volume remained constant, growing larger as the volume increased in the NAcc shell.

Chemicals and drugs

ACSF solution (118 mM NaCl, 19 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, and 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4; T.J. Baker; 3.3 mM glucose, Sigma) was used as vehicle. The NMDA receptor antagonist, DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV; 38 mM, RBI; 3.5 μ g/0.5 μ L), and the muscarinic receptor antagonist, scopolamine hydrobromide (136 mM, Sigma; 30 μ g/0.5 μ L) were dissolved in ACSF solution. Although a dose of 50.7 mM of DL-APV, has already been used in NAcc during instrumental learning (Gierler et al. 2005), we decided to use a dose of 38 mM of DL-APV, since a preliminary study using 50.7 mM showed that various animals presented motor abnormalities. The dose of scopolamine chosen was the same dose used in other brain structures like insular cortex during the taste memory formation (Naor and Dudai 1996; Ramírez-Lugo et al. 2003).

Behavioral procedures

In order to determine the possible early and/or late involvement of glutamatergic and cholinergic systems on both the NAcc shell and core in aversive TMT (CTA), APV or scopolamine were administered either 15 min before or immediately after the CS (saccharine) presentation during acquisition. Short-Term Memory (STM) and Long-Term Memory (LTM) were evaluated as described below. Rats received tap water for 15 min just after saccharine presentation in STM and LTM tests.

Conditioned taste aversion (CTA)

The behavioral procedure for CTA was made as described previously (Ferreira et al. 2002). From d 1 to d 4, rats were trained to take a water ration twice a day in their home cages in order to test STM. Each morning, subjects had access to 10 mL of tap water during a 15-min period; then 4.5 h later, they had access to 40 mL of water for 15 min. During each presentation, water was given in graduated test tubes, which allowed consumption to be measured.

On d 5, the acquisition day, rats were divided into different groups (see below), and subjects were allowed to drink 10 mL of a novel taste solution (0.1% saccharine; Sigma) the same volume of water to which the rats had access at the same hour in previous days. Fifteen minutes after the drinking session, a malaise-inducing drug (Lithium Chloride, LiCl, 0.4 M, 7.5 mL/kg; Baker) was administered intraperitoneally. Four hours after the LiCl injection, rats were exposed to saccharine solution for 15 min to assess the STM of CTA (see Figs. 2A, 3A).

During the next 2 d, baseline intake of tap water was re-established. Three days after acquisition and STM, all rats were exposed to saccharine solution for 15 min to assess the LTM of CTA. In both STM and LTM tests, reduction of liquid consumption with respect to baseline water intake (average of the first 4 d of water intake), was used as a measure of strength of aversion: percentage of baseline consumption = $100 \times (\text{saccharine solution intake}/\text{mean of baseline water consumption})$.

The animals with cannulae in the NAcc shell were divided into six groups. The groups that received a drug injection before saccharine presentation: Veh-pre ($n = 12$), APV-pre ($n = 14$), Scop-pre ($n = 8$), and the groups that received a drug injection after saccharine presentations (see Fig. 3A): Veh-post ($n = 12$),

APV-post ($n = 8$) and Scop-post ($n = 6$). The animals with cannulae in the NAcc core were divided into six groups. The groups that received a drug injection before saccharine presentation Veh-pre ($n = 9$), APV-pre ($n = 8$), Scop-pre ($n = 6$), and the groups that received a drug injection after saccharine presentation (see Fig. 3A): Veh-post ($n = 5$), APV-post ($n = 6$) and Scop-post ($n = 7$).

Neophobia and attenuation of neophobia (AN)

In order to test if APV or scopolamine affect taste perception or safe taste memory, we injected these drugs into the NAcc shell and core before presenting a strong concentration of saccharine (0.5%) in the drinking water, and measured the neophobic response, consisting of a lower water intake when it contains saccharine, as compared to plain water consumption. We also measured the safe TMT (attenuation of neophobia), which consists of an increase in saccharine consumption in presentations that follow the initial aversive one.

The behavioral procedure for AN was made as described previously (Gutierrez et al. 2003a). To determine the basal water consumption (baseline water intake) rats were given water in their home cages for 15 min and volume consumption was registered. This was done every 23.5 h for 4 d. On day 5, after assigning the animals to different groups (see below) counter-balanced by basal water consumption, the neophobic response was tested by the presentation of 0.5% saccharine (Sigma) in the drinking water for 15 min (see Fig. 4A). Thereafter the rats received water access for 15 min in order to ensure that all animals consumed their daily fluid requirement regardless of their consumption of saccharine. The same procedure was repeated from d 5–8 for AN protocol. The neophobic response was analyzed in terms of a lower intake of the novel taste solution compared to baseline intake of water. AN was then observed as an increased consumption of saccharine solution in the following presentations. The neophobic response and AN are expressed as a percentage of baseline consumption = $100 \times$ (saccharine solution intake/mean baseline water consumption). The drugs were administered before the taste presentation. We divided the animals into three groups for each, NAcc shell: Veh-pre ($n = 16$), APV-pre ($n = 7$) and Scop-pre ($n = 13$). NAcc core: Veh-pre ($n = 6$), APV-pre ($n = 6$) and Scop-pre ($n = 5$).

Histology

After completion of the behavioral experiments, animals were overdosed with sodium pentobarbital, and perfused with 0.9% saline followed by a buffered 4% paraformaldehyde solution. The brains were removed and stored at 4–10°C in the same paraformaldehyde solution during 24 h. The brains were then put in a 30% glucose solution. They were cut on a freezing cryostat in 40 μ m slices. Mounted samples were stained with cresyl violet and then examined in a light microscope. Slices were examined under the microscope to determine the correct placement of the cannulae in the brain structures.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT 42657Q and DGAPA-UNAM IX202504–1. We acknowledge the technical assistance of Federico Jandete, Oreste Carbajal, Francisco Pérez Eugenio, Enrique Espinosa, and Adriana Vega Vega for their text review and give thanks to Luis Nuñez Jaramillo for his comments on this manuscript.

References

- Bermúdez-Rattoni, F. 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 209–217.
- Berridge, K.C. and Robinson, T.E. 1998. What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **28**: 309–369.
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31–39.
- Bolam, J.P., Wainer, B.H., and Smith, A.D. 1984. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* **12**: 711–718.
- Brog, J.S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y. and Zahm, D.S. 1993. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* **338**: 255–278.
- Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G., and Calabresi, P. 1999. Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **31**: 1–5.
- Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G. and Calabresi, P. 2003. Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Rev. Neurosci.* **14**: 207–216.
- De Leonibus, E., Costantini, V.J., Castellano, C., Ferretti, V., Oliverio, A., and Mele, A. 2003. Distinct roles of the different ionotropic glutamate receptors within the nucleus accumbens in passive-avoidance learning and memory in mice. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 2365–2373.
- Delfs, J.M., Zhu, Y., Druhan, J.P., and Aston-Jones, G.S. 1998. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: Anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.* **806**: 127–140.
- de Rover, M., Lodder, J.C., Kits, K.S., Schoffelmeer, A.N., and Brussaard, A.B. 2002. Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 2279–2290.
- Di Ciano, P., Cardinal, R.N., Cowell, R.A., Little, S.J., and Everitt, B.J. 2001. Differential involvement of NMDA, AMPA/kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of Pavlovian approach behavior. *J. Neurosci.* **21**: 9471–9477.
- Everitt, B.J., Morris, K.A., O'Brien, A., and Robbins, T.W. 1991. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: Further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience* **42**: 1–18.
- Everitt, B.J., Parkinson, J.A., Olmstead, M.C., Arroyo, M., Robledo, P., and Robbins, T.W. 1999. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **877**: 412–438.
- Fenu, S., Bassareo, V., and Di Chiara, G. 2001. A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J. Neurosci.* **21**: 6897–6904.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V., and Bermúdez-Rattoni, F. 2002. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 1139–1145.
- Giertler, C., Bohn, I., and Hauber, W. 2005. Involvement of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core in instrumental learning guided by reward-predictive cues. *Eur. J. Neurosci.* **21**: 1689–1702.
- Gottfried, J.A., O'Doherty, J., and Dolan, R.J. 2002. Appetitive and aversive olfactory learning in humans studied using event-related functional magnetic resonance imaging. *J. Neurosci.* **22**: 10829–10837.
- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C.J., De La Cruz, V., Nunez-Jaramillo, L., and Bermúdez-Rattoni, F. 2003a. Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* **80**: 323–331.
- Gutierrez, R., Tellez, L.A., and Bermúdez-Rattoni, F. 2003b. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 1556–1562.
- Jasmin, L., Granato, A., and Ohara, P.T. 2004. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: A tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **468**: 425–440.
- Kelley, A.E. and Domesick, V.B. 1982. The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: An anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* **7**: 2321–2335.
- Kelley, A.E. and Swanson, C.J. 1997. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: A microinfusion mapping study. *Behav. Brain Res.* **89**: 107–113.
- Kelley, A.E., Smith-Roe, S.L., and Holahan, M.R. 1997. Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 12174–12179.
- Louilot, A. and Besson, C. 2000. Specificity of amygdalostriatal interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience* **96**: 73–82.
- Mark, G.P., Blander, D.S., and Hoebel, B.G. 1991. A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res.* **551**: 308–310.
- Mark, G.P., Weinberg, J.B., Rada, P.V., and Hoebel, B.G. 1995.

- Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain Res.* **688**: 184–188.
- Martinez, G., Ropero, C., Funes, A., Flores, E., Landa, A.I., and Gargiulo, P.A. 2002. AP-7 into the nucleus accumbens disrupts acquisition but does not affect consolidation in a passive avoidance task. *Physiol. Behav.* **76**: 205–212.
- McDonald, A.J. 1991. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* **44**: 1–14.
- Mehendale, S., Xie, J.T., Aung, H.H., Guan, X.F., and Yuan, C.S. 2004. Nucleus accumbens receives gastric vagal inputs. *Acta. Pharmacol. Sin.* **25**: 271–275.
- Meredith, G.E. 1999. The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **877**: 140–156.
- Meredith, G.E., Blank, B., and Groenewegen, H.J. 1989. The distribution and compartmental organization of the cholinergic neurons in nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* **31**: 327–345.
- Miranda, M.I. and Bermúdez-Rattoni, F. 1999. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 6478–6482.
- Miranda, M.I., Ferreira, G., Ramírez-Lugo, L., and Bermúdez-Rattoni, F. 2002. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 11417–11422.
- Naor, C. and Dudai, Y. 1996. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.* **79**: 61–67.
- Neigh, G.N., Arnold, H.M., Rabenstein, R.L., Sarter, M., and Bruno, J.P. 2004. Neuronal activity in the nucleus accumbens is necessary for performance-related increases in cortical acetylcholine release. *Neuroscience* **123**: 635–645.
- Neigh-McCandless, G., Kravitz, B.A., Sarter, M., and Bruno, J.P. 2002. Stimulation of cortical acetylcholine release following blockade of ionotropic glutamate receptors in nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 1259–1266.
- Ohara, P.T., Granato, A., Moallem, T.M., Wang, B.R., Tillet, Y., and Jasmin, L. 2003. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J. Neurocytol.* **32**: 131–141.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, California.
- Pennartz, C.M., Groenewegen, H.J., and Lopes da Silva, F.H. 1994. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: An integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog. Neurobiol.* **42**: 719–761.
- Pezze, M.A., Heidbreder, C.A., Feldon, J., and Murphy, C.A. 2001. Selective responding of nucleus accumbens core and shell dopamine to aversively conditioned contextual and discrete stimuli. *Neuroscience* **108**: 91–102.
- Ramírez-Lugo, L., Miranda, M.I., Escobar, M.L., Espinosa, E., and Bermúdez-Rattoni, F. 2003. The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **79**: 184–193.
- Salamone, J.D. 1994. The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav. Brain Res.* **61**: 117–133.
- Salamone, J.D. 1996. The behavioral neurochemistry of motivation: Methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. *J. Neurosci. Methods* **64**: 137–149.
- Salamone, J.D., Correa, M., Mingote, S.M., and Weber, S.M. 2005. Beyond the reward hypothesis: Alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**: 34–41.
- Saul'skaya, N.B. and Mikhailova, M.O. 2003. The effects of motivational and emotional factors in glutamate release in the nucleus accumbens of the rat brain during food consumption. *Neurosci. Behav. Physiol.* **33**: 151–156.
- Sederholm, F., Johnson, A.E., Brodin, U., and Sodersten, P. 2002. Dopamine D(2) receptors and ingestive behavior: Brainstem mediates inhibition of intraoral intake and accumbens mediates aversive taste behavior in male rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **160**: 161–169.
- Swanson, L.W. and Petrovich, G.D. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* **21**: 323–331.
- Wright, C.I. and Groenewegen, H.J. 1996. Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* **73**: 359–373.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y., and Sakai, N. 1994. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav. Brain Res.* **65**: 123–137.
- Young, A.M. 2004. Increased extracellular dopamine in nucleus accumbens in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli: Studies using 1 min microdialysis in rats. *J. Neurosci. Methods* **138**: 57–63.
- Young, A.M., Joseph, M.H., and Gray, J.A. 1993. Latent inhibition of conditioned dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* **54**: 5–9.
- Zahm, D.S. 2000. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**: 85–105.
- Zahm, D.S. and Heimer, L. 1993. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: Comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J. Comp. Neurol.* **327**: 220–232.

Received September 30, 2005; accepted in revised form December 1, 2005.

4.2. Sección experimental 2

Participación del NAcc en la consolidación de la memoria gustativa

En el inicio de la década de 1960, Louis Flexner, posteriormente el grupo de Bernard Agranoff, y por último Samuel Barondes junto con Larry Squire, observaron que la formación de la MLP requiere de la síntesis de proteínas, a diferencia de la formación de la MCP. Barondes y Squire entrenaron a ratones en un laberinto en Y. Justo antes del entrenamiento, los animales fueron inyectados con sustancias que inhiben la síntesis de proteínas (ciclohexamida o anisomicina) o bien con solución salina. Ambos grupos de animales aprendieron la tarea. Cuando se midió la MCP a los quince minutos después del entrenamiento todos los animales ejecutaron adecuadamente la prueba. Pero, aquellos animales que habían recibido el inhibidor de síntesis de proteínas presentaron una pérdida grave de la MLP medida a partir de tres horas después del entrenamiento. En contraste, aquellos animales inyectados con solución salina no presentaron efectos en la MLP (Squire, 2000). Después de estos experimentos, varios trabajos han confirmado que para que se lleve a cabo la consolidación de la MLP es necesaria la síntesis de proteínas.

Por lo que, la MCP a diferencia de la MLP es independiente de la síntesis de proteínas. Durante la consolidación de la MLP, es necesaria la síntesis de proteínas para transformar la información que recientemente se ha adquirido en modificaciones estables.

Rosenblum estableció que la MLP depende de la síntesis de proteínas en CI (Rosenblum, 1993), y los resultados presentados hasta aquí, muestran una importante participación del NAcc en la formación del trazo de memoria gustativa y no se ha determinado la participación del NAcc en la consolidación de esta memoria. Se sabe que en el NAcc la síntesis de proteínas es necesaria en las etapas tempranas de la consolidación para formar una memoria instrumental en la que los ratones aprenden a palanquear para obtener comida (Hernandez, 2002).

Así que ¿cuál es la participación del NAcc en la consolidación del trazo de memoria gustativa? Para responder esta pregunta se desarrolló la siguiente etapa experimental del proyecto doctoral. Teniendo como objetivo mostrar el papel del NAcc en la consolidación de la memoria gustativa.

Entonces, si el NAcc participa en la consolidación de la memoria gustativa, la inhibición de síntesis de proteínas en este núcleo afectará la formación de la memoria gustativa a largo plazo tanto. Se exploraron ambos tipos de memoria gustativa a través del CAS y la AN.

Método

1. Sujetos

Ratas machos de la cepa Wistar, de pesos entre 250 y 325 g, al momento de realizarse la cirugía. Se mantuvieron todo el tiempo en cajas independientes con agua y comida *ad libitum*, en un ciclo luz-oscuridad de doce horas.

2. Implantación de cánulas guías

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (40 mg/kg) y fueron implantados con una guía cánula en el NAcc medial, de acuerdo a procedimientos estereotáxicos (anteroposterior = +2 mm, lateral = -1 mm de bregma, ventral = -5.3 mm de bregma). La cánula guía fue colocada al cráneo con un soporte de tres tornillos y cemento dental.

3. Fármacos

Se utilizó una solución artificial de líquido cefalorraquídeo ACSF (125 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄·H₂O, 1.5 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM C₆H₁₂O₆, 2.5 mM CaCl₂ y pH=7.4) como vehículo. La anisomicina se disolvió en HCl equimolar, se ajustó el pH a 7.4 y llevada a su concentración final de 100 µg/µl en solución de ACSF.

4. Microinyecciones

El inyector fue conectado a un tubo de teflón, y éste a su vez con una microjeringa Halmiton de 10 µl montada en una bomba de inyección. Se inyectó un volumen de 1 µl de anisomicina o vehículo con un flujo de 0.5 µl en 60 segundos. Los inyectores tenían un largo adicional a la guía cánula de 2.5 mm.

5. Histología

Para confirmar el lugar de la microinyección se realizó una técnica histológica. Una vez concluido el experimento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital y perfundidos a través de la aorta ascendente con solución salina (0.15 M) y después con paraformaldehído al 4 % en un amortiguador de fosfatos (0.15 M, pH=7.4). Los cerebros se mantuvieron 24 horas en solución de paraformaldehído para después ser cambiados a una solución al 20 % de sacarosa en el amortiguador y fueron almacenados a una temperatura de 4°C hasta que fueron cortados. Se realizaron cortes coronales (40 µm) del cerebro a la altura del NAcc. Los cortes fueron montados en laminillas y se utilizó la técnica de tinción de violeta de cresilo para ser observados al microscopio. Aquellos animales que no cumplieran el requisito de ubicación de la cánula y la microinyección en el NAcc fueron excluidos del análisis estadístico.

6. Procedimiento conductual de memoria gustativa

Cuatro días después de la cirugía los animales fueron privados de agua por veinticuatro horas, tras las cuales inicio el procedimiento conductual.

Condicionamiento aversivo al sabor

Durante los siguientes cuatro días se estableció la línea base en la que las ratas fueron entrenadas a tomar agua dos veces diarias en sus cajas para poder medir la MCP. Por las mañanas los animales tuvieron acceso a 10 ml de agua durante un periodo de quince minutos y cuatro horas y media después tenían acceso a 40 ml de agua en quince minutos. La presentación del agua se hizo en probetas graduados que permiten medir el consumo.

Una vez establecida la LB, las ratas tuvieron acceso a 10 ml de una solución con sabor nuevo (0.1% sacarina, Sigma St. Louis MO). Quince minutos después del consumo se les inyectó intra-peritonealmente una solución de cloruro de litio (LiCl, 0.4 M, 7.5 ml/kg, Baker, Phillipsburg, NJ). Cuatro horas después de la inyección de LiCl, las ratas fueron expuestas a la solución de sacarina durante 15 minutos para medir MCP del CAS (Figura 4.2).

Durante los dos días siguientes, el consumo de agua por la mañana y por la tarde fue reestablecido. Tres días después de la adquisición, las ratas fueron expuestas a la solución de sacarina durante 15 minutos para medir la MLP.

El número de animales fue contrabalanceado por promedio de línea basal y dividido en el grupo que fue microinyectado veinte minutos antes de la presentación de sacarina (ani-antes, veh-antes) y el que fue inyectado justo después de la presentación del sabor (ani-desp, veh-desp).

En ambas pruebas de MCP y MLP, se obtuvo el porcentaje del consumo de sacarina con respecto al promedio del consumo de la línea base que se calcula como

$$\text{Porcentaje de consumo con respecto a la línea base} = 100 \times \frac{\text{consumo de sacarina MCP o MLP}}{\text{promedio de la línea base}}$$

Neofobia y atenuación de la neofobia

Cuatro días después de la cirugía los animales fueron privados de agua por veinticuatro horas. Como línea basal las ratas tuvieron acceso a agua durante quince minutos cada veintitres horas y media por cuatro días, registrándose su consumo.

En el quinto día el número de animales fue contrabalanceados por su línea basal para formar los grupos correspondientes a las manipulaciones farmacológicas hechas 20 minutos antes (veh-antes, ani-antes) o justo después (veh-desp, ani-desp) de la presentación de la sacarina (ver Figura 4.3 A).

La respuesta de neofobia fue medida presentando una concentración de sacarina 0.5% durante 15 minutos. Luego, las ratas tuvieron acceso a agua durante 15 minutos para asegurar que todos los animales tuvieran su consumo de líquido requerido diariamente independientemente de su consumo de sacarina.

El mismo procedimiento fue repetido durante los siguientes dos días para probar la atenuación de la neofobia.

La respuesta neofóbica fue analizada en términos de la reducción del consumo ingerido del sabor

nuevo en relación con el promedio de línea basal de agua. La AN fue observada por el incremento del consumo de sacarina en las siguientes presentaciones.

Las microinyecciones se realizaron 20 minutos antes o bien inmediatamente después de la presentación de sacarina en ambos procedimientos conductuales.

En todos los casos de comparación estadística entre dos grupos se utilizó una prueba t de Student de muestras no pareadas.

Resultados

En la figura 4.1 se observa un corte coronal de la ubicación de cánula guía.

La inhibición de síntesis de proteínas en el NAcc antes, pero no después, afecta la formación la memoria gustativa de aversión de largo plazo.

La Figura 4.2 muestra los efectos en la MCP y la MLP de la inyección de anisomicina veinte minutos antes o inmediatamente después de la presentación de la sacarina. El análisis de la t de Student de muestras no pareadas, no muestra diferencias significativas entre los consumos de la línea basal de agua entre el grupo ani-antes ($n = 19$) y su grupo control veh-antes ($n = 21$) ($t_{38} = -0.101$, $p > 0.05$, datos no presentados) o en la prueba de la MCP ($t_{38} = 1.261$, $p > 0.05$). El análisis en la MLP, muestra diferencias significativas entre ambos grupos ($t_{38} = 2.418$, $p < 0.05$) como se muestra en la parte B de la Figura 4.2.

Como puede observarse en la Figura 4.2 C, la inhibición de síntesis de proteínas justo después de la presentación de la sacarina no afecta la formación de la MLP entre los grupos veh-desp ($n = 16$) y ani-desp ($n = 10$) ($t_{24} = 0.526$, $p > 0.05$). Tampoco se observaron diferencias en el consumo basal de agua ($t_{24} = -0.327$, $p > 0.05$) o en la MCP ($t_{24} = 0.477$, $p > 0.05$).

La inhibición de síntesis de proteínas en el NAcc después, pero no antes, afecta la formación de la memoria gustativa a largo plazo.

La Figura 4.3 muestra los resultados tras la aplicación de anisomicina veinte minutos antes o inmediatamente después de la presentación de sacarina.

El promedio de los consumos de agua durante la línea base ($t_{17} = 0.73$) no presenta diferencias entre los grupos veh-antes ($n = 6$) y ani-antes ($n = 13$). La respuesta a la novedad tampoco muestra diferencias significativas entre los grupos ($t_{17} = -0.509$, $p > 0.05$) o durante la AN ($t_{17} = 0.770$, $p > 0.05$).

Los grupos que fueron inyectados inmediatamente después de la presentación de sacarina, veh-desp ($n = 9$) y ani-desp ($n = 12$), no tuvieron diferencias significativas en el promedio de los consumos de agua durante la línea basal ($t_{19} = 0.204$) o durante la primera presentación de sacarina ($t_{19} = -1.097$). Como se puede observar en la Figura 4.3, la inhibición de síntesis de proteínas en el NAcc justo después de la presentación de sacarina recorre la AN ($t_{19} = -3.401$), es decir, los

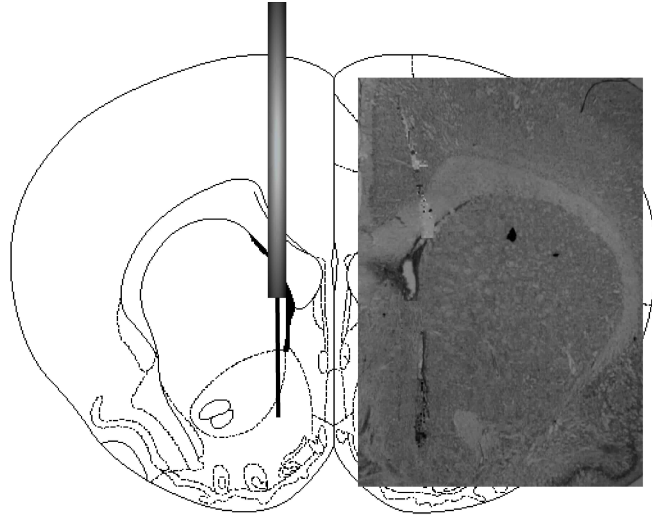


Figura 4.1: Corte coronal de ubicación de la cánula guía. Se utilizó una tinción de violeta de cresilo. La cánula guía se encuentra en la periferia del NAcc medial y el NAcc lateral.

animales consumen la misma cantidad de sacarina observada durante la primera presentación.

Discusión

El propósito de este estudio fue determinar el papel del NAcc en la consolidación del trazo de memoria gustativa. La misma dosis de anisomicina utilizada en este trabajo, inhibe más del 90% de proteínas en CI y tiene efecto hasta cuatro horas después de su aplicación ^a. (Rosenblum, et al., 1993). Los resultados obtenidos muestran que la memoria gustativa de aversión de largo plazo fue afectada cuando la anisomicina fue administrada veinte minutos antes de la presentación de la sacarina, sin afectar a la MCP. Este resultado sugiere que la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas, no afecta la percepción del sabor o la posterior asociación de los estímulos. Por lo tanto, el efecto observado a largo plazo se debe a una interferencia en la consolidación de la memoria. No obstante, si se administra anisomicina en el NAcc inmediatamente después de la presentación de la sacarina, no se encuentran efectos en la consolidación del trazo de memoria.

Adicionalmente, se estudió la participación del NAcc en la consolidación del trazo de la MLP de la AN. El modelo del aprendizaje de lo seguro no permite medir la MCP sin interferir con la MLP, por ello, en este trabajo sólo se exploró la MLP de la memoria de lo seguro. A diferencia de la memoria aversiva, la administración inmediatamente después, pero no antes de la presentación de sacarina, afecta la MLP de la AN.

^aLa inhibición de síntesis de proteínas fue medida por la inyección intraventricular o localmente de [35 S]metionina 20 min antes del sacrificio del animal. Se procesó la muestra hasta obtener el total de la radioactividad en un pellet. La radioactividad del pellet fue tomada como medida del precursor incorporado en la proteína

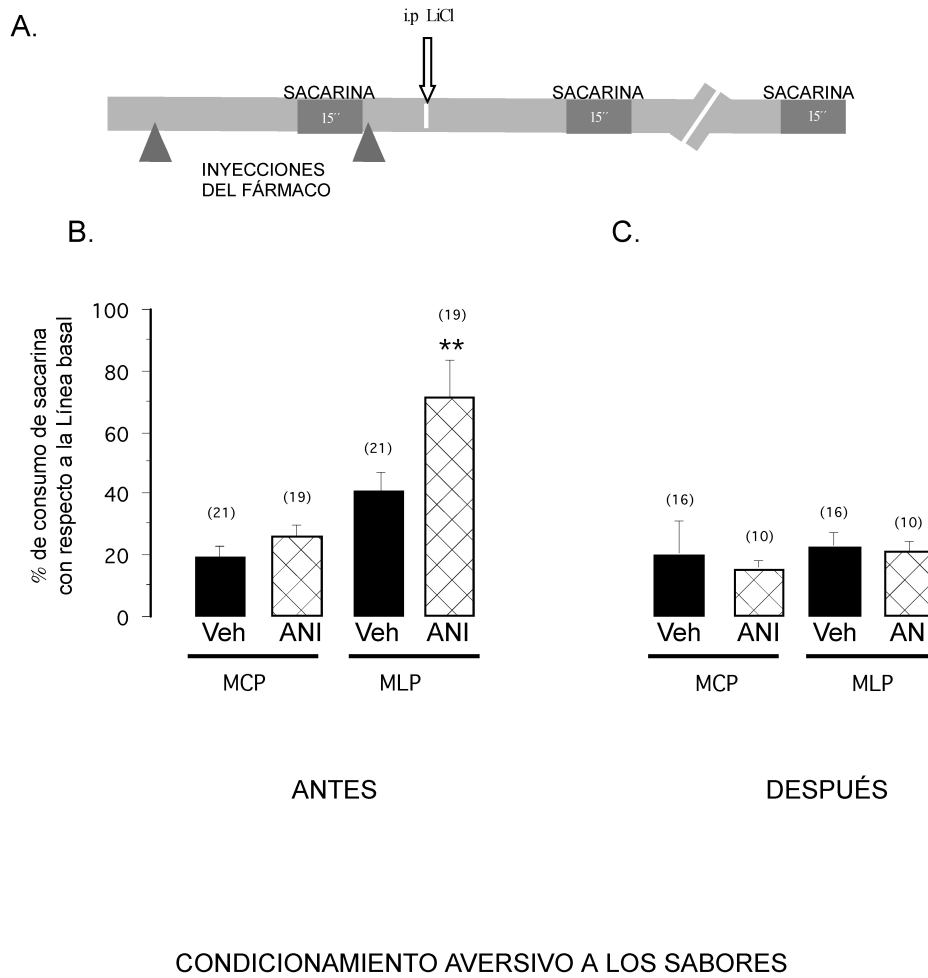
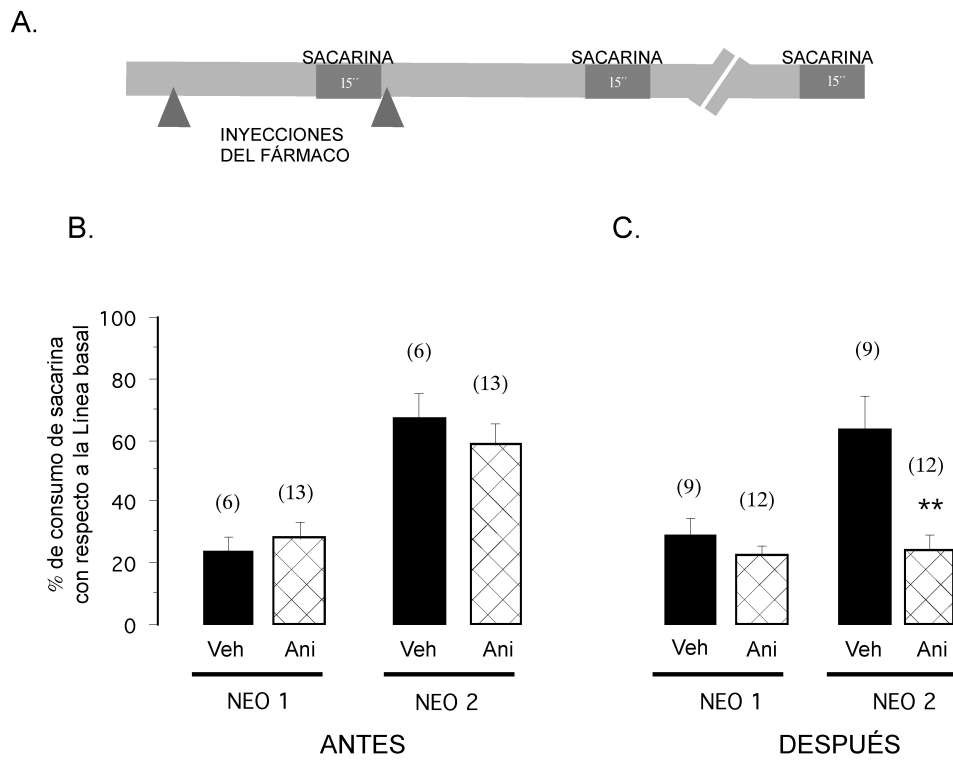


Figura 4.2: A. Procedimiento experimental para las microinyecciones en el condicionamiento aversivo al sabor. B. Resultados de las inyecciones anteriores a la presentación de la sacarina en las pruebas de MCP y MLP. C. Resultados de las inyecciones que se realizaron inmediatamente después a la presentación de la sacarina en las pruebas de MCP y MLP. $^{**}p < 0.05$



ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA

Figura 4.3: A. Procedimiento experimental para las microinyecciones en la neofobia y su atenuación. B. Resultados de las inyecciones anteriores a la presentación de la sacarina en la prueba de MLP. C. Resultados de las inyecciones que se realizaron inmediatamente después a la presentación de la sacarina en la prueba de MLP. ** $p < 0.05$

Estos resultados sugieren la existencia de procesos diferentes en la consolidación del trazo de memoria gustativa de lo seguro y lo aversivo. La síntesis de nuevas proteínas es requerida en diferentes momentos para la formación de una u otra memoria. En el caso del trazo de memoria de aversión, la síntesis de proteínas en el NAcc es necesaria durante las etapas tempranas de la consolidación, y para el trazo de memoria de lo seguro en etapas más tardías.

Como se ha mencionado anteriormente, el trazo de memoria se lleva a cabo en paralelo en varias estructuras del sistema nervioso central. En el aprendizaje de aversión, el efecto observado tras inyecciones de anisomicina antes pero no después de la presentación de la sacarina, puede ser explicado por la existencia de una posible distribución del trazo de memoria en diferentes estructuras del sistema nervioso central dependiente del tiempo (Routtenberg, 2005). En este sentido, varios estudios han demostrado que la consolidación de diferentes tipos de memorias requiere de distintas regiones cerebrales. Por ejemplo, la consolidación de muchos tipos de memorias depende de procesos hipocampales durante las primeras semanas después del entrenamiento y posteriormente llegan a ser independientes del hipocampo (Anagnostaras SG, 1999).

La aplicación de algunos inhibidores de síntesis de proteínas inmediatamente después, pero no una o dos horas más tarde del entrenamiento, afecta la formación de la MLP. Estos resultados proponen la existencia de una fase temprana independiente de síntesis de proteínas (Routtenberg, 2005). Los experimentos hasta ahora realizados en el NAcc no descartan un posible efecto tras la inyección de anisomicina en tiempos posteriores al entrenamiento ni la existencia de una fase independiente de síntesis de proteínas para la memoria de lo seguro como la aversiva.

Desafortunadamente no podemos descartar algún efecto inespecífico de la anisomicina, dado que se ha demostrado que es un potente inhibidor de la traducción de ARN mensajero. A bajas concentraciones funciona como activador de las MAP cinasas, mientras que a altas dosis actúa como un inhibidor de la síntesis de proteínas (Routtenberg et al, 2005).

En la memoria gustativa un sabor nuevo, mas no uno familiar, induce la activación de ERK 1/2 (cinasas reguladoras de señales extracelulares) en la corteza gustativa (Rosenblum, 1993). En el NAcc, la inyección bilateral de inhibidores de la activación de ERK afecta el condicionamiento de lugar con anfetaminas, sugiriendo la participación de la vía de las MAP cinasas en el aprendizaje (Gerdjikov et al, 2004). Aunque no existen reportes de la activación de estas cinasas en el NAcc como consecuencia del aprendizaje gustativo, no se puede descartar un efecto inespecífico de la anisomicina sobre la vía MAP cinasa y su posible participación en la memoria.

Por otra parte, la anisomicina inhibe la función de catecolaminas y el grupo de Fenu mostró que el sistema dopaminérgico tiene un papel muy importante dentro del NAcc en la formación del trazo de memoria gustativa (Fenu et al., 2001).

Los resultados obtenidos sugieren que la memoria gustativa de aversión y la segura difieren en los mecanismos que subyacen la consolidación de ambas memorias dentro del NAcc medial. El establecimiento de los mecanismos involucrados en la consolidación de la memoria gustativa en los

subnúcleos NAcc medial y lateral deberá ser el objetivo de experimentos futuros.

4.3. Resumen de resultados sección 1 y sección 2

Se ha determinado que los receptores tipo NMDA de glutamato al menos en la corteza insular, son necesarios para el almacenamiento de la memoria gustativa de aversión y que los receptores muscarínicos de ACh a nivel cortical son indispensables para formar cualquiera de las dos memorias gustativas. Esta activación cortical es modulada por la activación del NBM. Y se ha descrito que a su vez la actividad del NBM, es modulada por la activación del NAcc.

El sistema dopaminérgico es el más estudiado dentro del NAcc, y en este sentido también se ha propuesto que el NAcc a través de DA participa en la formación de la memoria. Sin embargo el NAcc tiene proyecciones glutamatérgicas provenientes de la amígdala y la CI, y tiene una población de interneuronas colinérgicas.

Los trabajos anteriores tuvieron como objetivo estudiar la participación de ambos subnúcleos del NAcc en la formación del TMS a través de la participación de los receptores tipo NMDA de glutamato y muscarínicos de ACh.

La inyección bilateral de escopolamina en el NAcc medial hechas antes, pero no después, del entrenamiento del CAS afecta la formación de la MCP y la MLP, es decir los animales tienen altos consumos de la sacarina durante las pruebas realizadas. La aplicación de escopolamina antes de la presentación de sacarina no afecta la respuesta a la novedad del estímulo, es decir, los efectos observados en el CAS no son consecuencia de afectar la detección del estímulo gustativa como nuevo. Al estudiar la memoria gustativa de lo seguro, el bloqueo de los receptores muscarínicos de ACh afectan la AN.

Por el contrario, los resultados muestran que en el NAcc lateral no es necesaria la activación de los receptores muscarínicos de ACh para ninguna de las tareas estudiadas en este trabajo. En el caso del bloqueo de los receptores tipo NMDA, en ambos subnúcleos del NAcc, evidencian que es necesaria su activación únicamente en la formación del TMS aversivo y no en el seguro.

Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que en ambos subnúcleos del NAcc, existen mecanismos diferenciales como la activación de los receptores tipo NMDA en la formación del TMS aversivo y no en el seguro. Pero solamente el NAcc medial participa, a través de los receptores muscarínicos de ACh, en la formación de ambos TMS.

Existe evidencia de que el NAcc participa en procesos de consolidación en una tarea instrumental. Uno de los objetivos en esta tesis fue determinar si el NAcc participa en la consolidación de la memoria gustativa. Los resultados obtenidos muestran que es necesaria la síntesis de proteínas al menos en el NAcc medial tanto para la memoria gustativa aversiva como la segura. Las inyecciones bilaterales en el NAcc medial de un inhibidor de síntesis de proteínas afecta diferencialmente la memoria gustativa de aversión y la segura. Las inyecciones hechas antes del entrenamiento, pero no después del mismo, afecta la MLP en el CAS. Para la AN, las inyecciones hechas justo después del

entrenamiento, pero no antes, afecta la MLP de la memoria gustativa segura.

Finalmente, existen dos maneras propuestas para explicar la formación de la MCP y la MLP. Por una parte, la MLP es dependiente de la formación de la MCP, y la otra propuesta es un mecanismo independiente para la formación de ambas memorias. Hasta ahora, las estructuras exploradas en la memoria gustativa muestran un mecanismo lineal y dependiente en ambas memorias, es decir, al afectarse la MCP se ve alterada la MLP. Los trabajos presentados aquí, muestran que en todos los tratamientos farmacológicos en el NAcc, la MLP es dependiente de la MCP.

4.4. Sección experimental 3

Como se describió en la introducción, se ha propuesto que la DA en el NAcc, vía proyecciones GABAérgicas al cerebro anterior basal, modula la actividad colinérgica cortical (Arnold, et al, 2000). La actividad del NAcc a su vez puede ser modulada por varias estructuras, entre ellas, se ha observado que NPB puede modular la actividad del NAcc a través de conexiones al VTA.

Hasta ahora se ha descrito la participación del NAcc en la formación de la memoria gustativa, particularmente se mostro su función en la formación del TMS a través de la actividad de los receptores muscarínicos independientemente de las consecuencias que siga la ingesta de un sabor nuevo; o bien a través de la actividad de los receptores tipo NMDA únicamente en la formación de la memoria de aversión.

El sistema glutamatérgico en NPB se ha relacionado con la formación de la memoria gustativa. No se conoce si la activación de los receptores tipo NMDA están participando en la adquisición de la memoria gustativa de aversión.

Hasta ahora, al menos a nivel cortical y en el NAcc, al afectarse la MCP se observan efectos en la memoria gustativa de aversión a largo plazo. En el NPB, no se ha explorado si la formación de ambas memorias es a través de un proceso líneal o bien son formadas como consecuencia de procesos independientes entre sí.

El objetivo principal de esta sección experimental fue explorar el papel de los receptores tipo NMDA en la formación de la memoria gustativa de aversión en el NPB. Se considero la medición de la MCP y la MLP en el mismo sujeto con la finalidad de estudiar la dependencia o independencia de formación de ambas memorias.

Cortical and parabrachial nucleus NMDA receptors activity are differentially involved in Short and Long-Term taste memory formation

María Angeles Ballesteros^{1,2}; Leticia Ramírez-Lugo²; Luis Nuñez-Jaramillo² and Federico Bermúdez-Rattoni^{2*}.

¹Departamento de Psicología y Fisiología Experimental del Comportamiento, Universidad de Granada, Granada, España. ²Departamento de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

*Correspondence and reprints request should be addressed to Federico Bermúdez-Rattoni, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, A.P 70-253, México D.F, 04510, México. e-mail: fbermude@ifc.unam.mx; phone: 011 52 55 5622 5626; fax: 011 52 55 5622 5607

Running title: Differential effects on STM and LTM in taste aversion memory.

Number of figures: 3

Number of text pages: 19

Number of words: Manuscript: 4594. Abstract: 160. Introduction: 541.

Acknowledgments. The CICYT Grant BSO2002-01215 (MICYT, Spain) to MAB, and grants from CONACYT 42657Q and DGAPA-UNAM IN 220706-3 to FB-R supported this research. We acknowledge the technical assistance of Federico Jandete, Oreste Carbajal, Francisco Pérez Eugenio.

ABSTRACT

We administered bilateral infusions of DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, APV a NMDA receptors antagonist or vehicle solution in the Insular Cortex (IC) or in the Parabraquial Nucleus (PBN) during aversive taste memory formation. Like in previous studies, blockade of the NMDA receptor in IC by APV before, but not after the presentation of the taste stimulus impaired long-term memory (LTM) but left short-term memory (STM) intact. However, blockade of the NMDA receptor in PBN by APV before the presentation of the taste stimulus impaired both STM and LTM. When administration of APV on PBN was performed after taste consumption, the blockade of glutamatergic receptors impairs STM without affecting LTM formation. These results suggest that the role of NMDA receptors in the PBN and the IC is quite different and support the hypothesis that STM and LTM involve separate mechanisms. Additionally, our results propose a novel participation of NMDA receptor only for STM but not for LTM in PBN during CTA memory formation.

Key words: Parabrachial nucleus, conditioned taste aversion, short-term memory, long-term memory, insular cortex.

1. Introduction.

Taste Recognition Memory allows recognizing tastes in terms of previous experiences (Bermudez-Rattoni, 2004). Conditioned taste aversion (CTA) is a form of learning in which a gustatory memory is established whereby animals avoid ingesting a flavored substance (conditioned stimulus, CS) whose previous ingestion has been associated with a malaise signal (unconditioned stimulus, US). However, if that taste is not followed by malaise it is recognized as a safe taste.

The early phylogenetic appearance of CTA suggests that this type of learning is dependent on caudal brain structures present in early evolutionary stages. However, it is now known that this learning depends on the interaction between multiple brain structures from the forebrain and brainstem (Bermudez-Rattoni, 2004). Undoubtedly, one of the most studied structures is the Insular Cortex (IC), where cholinergic activity has been involved in the formation of Taste Memory Trace (TMT), while cortical glutamatergic activity seems to participate in transforming a safe taste memory into an aversive one (Ferreira, Gutierrez, De La Cruz, & Bermudez-Rattoni, 2002; Gutierrez, Rodriguez-Ortiz, De La Cruz, Nunez-Jaramillo, & Bermudez-Rattoni, 2003). The IC has important connections with brainstem structures such as the parabrachial nucleus (PBN), with whom it shares reciprocal connections (Frey, Morris, & Petrides, 1997; Gallo & Bures, 1991). The PBN, besides being the second relay station in both taste and visceral sensory pathways, has also been related with associative processes during CTA learning (Ballesteros et al., 2002; Bures, 1998; Gallo, Marquez, Ballesteros, & Maldonado, 1999; Ivanova & Bures, 1990a, 1990b; Reilly, 1999; Reilly, Grigson, & Norgren, 1993; Spector, 1995; Yamamoto, Shimura, Sako, Yasoshima, & Sakai, 1994).

Glutamate plays a crucial role in PBN neurotransmission, specifically in autonomic and oromotor behaviors in response to taste input (Galvin, King, & King, 2004). Moreover, the glutamatergic participation in PBN during CTA memory formation has already been shown. Bielavska and coworkers (Bielavska, Miksik, & Krivanek, 2000) demonstrated by free moving microdialysis that the level of glutamate release in PBN increases during saccharin drinking and after i.p. LiCl administration. A posterior study reported that metabotropic glutamate receptors in PBN participated in CTA memory formation (Vales, Zach, & Bielavska, 2006).

It has been widely suggested that glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are related with associative processes. There are reports that suggest the activation of NMDA receptors in processes that influence long-term stability of memories. In this regard, it has been demonstrated that a NMDA antagonist blocks the consolidation of long-term memory (LTM), but not short-term memory (STM), of fear conditioning (Kim, Fanselow, DeCola, & Landeira-Fernandez, 1992) inhibitory avoidance (I. Izquierdo, Medina, Vianna, Izquierdo, & Barros, 1999) and CTA (Ferreira et al., 2002). It would be interesting to determine the glutamatergic role in a troncoencephalic structure like the PBN during STM and LTM formation.

The aim of the present study was to explore the role of NMDA receptors in both, PBN and IC, during short and long-term aversive taste memory formation. We found that the role of NMDA receptors in the PBN and the IC is quite different. While in the IC NMDA receptors are involved only in LTM formation, in the PBN the NMDA receptors are involved in both STM and LTM formation. Surprisingly these results

also suggest that the LTM formation could be independent of STM formation in the PBN.

2. Materials and methods.

2.1 Animals

The experiments were made with 65 male Wistar rats, weighing between 280 and 320 g. They were housed individually and kept in a 12 h light: 12 h dark cycle phase. All behavioral manipulations were performed in the light cycle phase. Food and water were available ad libitum until the beginning of the behavioral procedures. Experiments were performed in accordance with the Rules in Health Matters (Ministry of Health, Mexico) and with approval of the local Animal Care Committee.

2.2 Surgery

The animals were implanted bilaterally with 12-mm 23-gauge stainless steel cannulae under anesthesia (Ketamine 84mg/Kg and Xylacine, 0.4mg/kg, i.p.) using standard stereotaxic procedures. The tips of the cannulae were aimed 2.5 mm above of either PB nucleus (anteroposterior, - 9.2 mm; lateral, $\pm 1,8$; ventral, - 4.5 mm; from Bregma) or CI (anteroposterior, + 1.2 mm; lateral, ± 5 ; ventral, - 3 mm; from Bregma) (Paxinos, 1998). The cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed in the skull. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent clogging.

2.3 Microinjection

The microinjections were given to hand restrained, conscious animals. The stylets were withdrawn from the guide cannulae and injection needles (30 gauge) were inserted, extending 2.5 mm from the tip of the guide cannulae. The injection needles were connected via polyethylene tubing to two 10 μ L Hamilton microsyringes driven by an automated micro infusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). A total volume of 1 μ l and 0.5 μ l/ min per hemisphere was delivered in PBN and IC respectively. After the injections, the needles were retained in the guide cannulae for one additional min to allow diffusion of the solution into the tissue and to minimize the reflux along the injection track.

2.4 Chemicals and drugs.

ACSF solution (118 mM NaCl, 19 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, and 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4; T.J. Baker, Xalostoc, Mexico; 3.3 mM glucose, Sigma, St. Louis MO) was used as vehicle. The NMDA receptor antagonist, DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV; RBI, Natick, MA) was dissolved in ACSF solution. The dose of DL- APV that we chose was the same concentration used in insular cortex during the taste memory formation (10 μ g/ μ l) (Ferreira et al., 2002; Gutierrez, Tellez, & Bermudez-Rattoni, 2003). In the case of PBN, the same dose used on IC injection produced motor abnormalities in some animals when injected into PBN (data no shown), after testing different doses, the final dose for the PBN was 5 μ g/ μ l.

2.5 Behavioral procedures

In order to determine the possible early and/or late involvement of the glutamatergic system on both IC and PBN in CTA, APV was administered either 15 min before

(see figure 1C) or immediately after (see figure 1D) the CS presentation (saccharin) on acquisition day. STM and LTM were evaluated as described below. Rats received tap water for 15 min just after saccharin presentation in STM and LTM tests.

The behavioral procedure for CTA was a modification of a procedure described previously (Ferreira et al., 2002). Five days after surgery, all the animals were deprived of water for 24 h and then rats were trained to take a water ration three times a day in their home cages. Each morning, subjects had access to 10 ml of tap water during a 15-min period, then, 15 min after the end of that period, they had access to 40 ml to water for 15 min. In order to test STM, 4.5 h later, all the animals had access to 40 ml to water for 15 min. During each presentation, water was given in graduated test tubes that allowed consumption to be measured.

On the acquisition day, rats were divided in different groups (see below), and subjects were allowed to drink 10 mL of water and 15 min later they had access to 40 ml a novel taste solution (0.1% saccharin, Sigma St. Louis MO), the same volume of water to which the rats had access at the same hour in previous days. Fifteen minutes after the second drinking session time, a malaise-inducing drug (Lithium Chloride, LiCl, 0.4 M, 7.5 mL/kg; Baker) was administered i.p. Four hours after the LiCl injection, rats were exposed to saccharin solution for 15 min to assess the STM of CTA.

During the next two days, baseline intake of tap water was re-established. Three days after acquisition and STM, all rats were allowed to drink 10 mL of water and 15 min later they had access to 40 ml of saccharin solution for 15 min to assess the LTM of CTA. In both STM and LTM tests, reduction of liquid consumption with respect to

baseline water intake (average of the last 5 days of water intake), was used as a measure of the strength of the aversion: percentage of baseline consumption = $100 \times (\text{saccharin solution intake} / \text{mean baseline water consumption})$. For both, STM and LTM we used as a reference point the baseline consumption of water of the corresponding time of the day. For STM we used the baseline obtained during the afternoon consumption, and for LTM we used the baseline obtained from the morning consumption.

The animals with cannulae in IC were divided into 4 groups. Two groups received drug injections 20 min before saccharin presentation of either ACSF (IC-Veh before; n=9) or APV (IC-APV before; n=8), the other two groups received drug injections immediately after saccharin consumption of either ACSF (IC-Veh after; n=6) or APV (IC-APV after; n=6). The animals with cannulae in PBN were also divided into 4 injection groups. Two groups received injections of either ACSF (PBN-Veh before; n=8), or APV (PBN-APV before; n=8) 20 min before the saccharin consumption. Another two groups received either vehicle (PBN-Veh after; n=10) or APV (PBN-APV after; n=10) immediately after the saccharin consumption. All the animals that received injection before saccharin consumption were injected with ACSF solution a day before the drug injection to avoid a nonspecific effect caused by the volume injected in the drug injection day.

2.6 Histology.

After completion of behavioral experiments, animals were overdosed with sodium pentobarbital, and perfused with 0.9% saline followed by a buffered 4% paraformaldehyde solution. The brains were removed and stored at 4-10 °C in the

same paraformaldehyde solution during 24 h. They were then put in a 30% glucose solution until they sank. The brains were cut on a freezing cryostat in 40 μm slices. Mounted samples were stained with cresyl violet and then examined in light microscope.

Results.

The figure 1 shows an example of PBN and IC cannulae placement. Histological analysis shows that in the majority of animals, the injection site was located in the IC (see figure 1A) or in the PBN (see figure 1B) respectively. Only the animals showing a correct placement of the cannulae were included in the statistical analysis. 10 animals were excluded from the analysis because the tips or their cannulae were misplaced.

Pre-training injection of APV on IC disrupts LTM but not STM aversive memory

Figure 2 shows the effect of NMDA receptor antagonist into IC on both STM (fig. 2A) and LTM (fig. 2C) injected before the conditioned taste aversion training. No significant differences between groups were found in water baseline from the morning consumption ($t_{14} = 0.486$, $p > 0.05$) or from the afternoon consumption ($t_{14} = -0.684$, $p > 0.05$) or during the acquisition ($t_{14} = 0.186$, $p > 0.05$, data no shown). Unpaired t-test showed no significant differences between groups in STM test ($t_{14} = -0.979$, $p > 0.05$) or water consumption after the STM ($t_{14} = 1.246$, $p > 0.05$, data no shown). In the case of LTM test, the APV group had significantly higher saccharin consumption than the vehicle-injected group revealed by an unpaired t-test ($t_{14} = -2.533$; $p < 0.05$, see fig. 2C).

Post-training injection of APV on IC do not affect taste aversive memory formation

The results of the APV effects injected after the CTA training on short and long-term memory are shown in figure 2. No significant differences among groups were found in water baseline during the morning consumption ($t_8 = 0.975$, $p > 0.05$) or during the afternoon consumption ($t_8 = -0.873$, $p > 0.05$). The unpaired t-test analysis showed no significant differences between the group injected with APV and the vehicle group in the acquisition consumption ($t_8 = 0.125$, $p > 0.05$, data no shown) or water consumption after the STM ($t_8 = -1.307$, $p > 0.05$, data no show), or in saccharin consumption during STM test ($t_8 = -0.744$, $p > 0.05$, fig. 2B) or LTM test ($t_8 = -0.590$, $p > 0.05$, fig. 2D).

Thus, pre-training injections of APV in the IC impaired LTM, but not STM of CTA, while APV on IC do affect neither STM nor LTM formation when injected after taste presentation.

Pre-training injection of APV on PBN disrupts both STM and LTM aversive memory

Figure 3 shows the effects of NMDA receptor antagonist into PBN injected before CTA training. No significant differences between groups were found in water baseline in the morning or afternoon consumption, ($t_9 = -6.637$, $p > 0.05$) and ($t_9 = -1.312$, $p > 0.05$) respectively, during the acquisition ($t_9 = 0.3190$, $p > 0.05$, data no shown) or in the water consumption after the STM ($t_9 = -1.281$, $p > 0.05$, data no show). Significant differences between APV and vehicle groups were found in saccharin consumption on the STM and LTM test as revealed by an unpaired t-test ($t_9 = -4.640$, $p < 0.01$, fig, 3A) and ($t_9 = -2.664$, $p < 0.05$, fig, 3C) respectively.

Post-training injection of APV on PBN disrupts STM but not LTM aversive memory

The figure 3 shows the effects of injection of APV before or after the taste consumption, no significant differences between groups were found in water baseline in the morning consumption ($t_{16} = 0.739$, $p > 0.05$), afternoon consumption ($t_{16} = 0.218$, $p > 0.05$) or during the acquisition ($t_{16} = 0.109$, $p > 0.05$, data not shown). The unpaired t-test analysis showed significant differences between vehicle and APV injection in saccharin consumption in STM test ($t_{16} = -2.63$, $p < 0.05$, fig. 3B), but not during water consumption after STM ($t_{16} = -1.585$, $p > 0.05$, data not shown). In the case of LTM test, no significant differences between groups were found ($t_{16} = 0.606$, $p > 0.05$, fig. 3D).

Thus, pre-training injections of APV in the PBN impaired both STM and LTM, whereas post-training NMDA receptors blockade in the PBN affected only the STM but not LTM formation.

Discussion.

In the present study we found that NMDA receptors play a different role in the IC and in the PBN during taste aversion memory formation. In the IC, as previously reported, the blockade of NMDA receptors before, but not immediately after taste consumption impairs long but not short-term aversive memory formation (Ferreira et al., 2002). In the PBN the injection of APV before taste consumption impairs both STM and LTM. Interestingly, the injection of APV in PBN immediately after taste consumption impairs STM without effect on LTM.

In a previous study we found that NMDA receptors participate on LTM but not on aversive STM formation in the insular cortex (Ferreira et al., 2002). Despite small

variations in the experimental protocol, we replicated previous studies in which application of APV in the insular cortex affects only LTM consolidation when the injection of APV was made before taste consumption. Similarly, we corroborated that when APV was applied after CS presentation, it did not have any effects either on STM or on LTM (Ferreira et al., 2002).

In the case of PBN, the injection of APV before taste consumption affects both, short and long-term aversive taste memory formation. This effect could be due to impairment either in the stimulus processing (either CS or US) or in the stimulus association. In accordance with previous studies (Vales et al., 2006) the injection of APV after taste consumption did not affect the formation of LTM. However, in the present study the same procedure affects the formation of STM, thus discarding any possible effects on CS-US association or US processing, since LTM remains intact. The STM and the LTM have classically been seen as serial processes, being indispensable the formation of STM for the subsequent formation of LTM (McGaugh, 2000). Nevertheless, this view has been recently challenged by a number of works describing the impairment of STM without evident effect on LTM (I. Izquierdo, Medina et al., 1998). But it is still unknown whether it is a general mechanism possibly seen in many learning tasks or if it is only seen in the model employed by the authors. A very simple model widely used for the study of the mechanisms involved in learning and memory is CTA, a task in which we also observed independence between LTM and STM formation.

Our results are in agreement with those reported by Izquierdo and coworkers, who showed that different treatments administered into CA1 or entorhinal cortex were able

to block STM but not LTM of one-trial step-down avoidance task. Each animal was tested twice, first for STM that was measured 1.5 h after training and then for LTM 24 h after training. Rats that received immediate post-training bilateral infusions of D1 receptor agonist SKF38393, 5HT1A receptor agonist 8-HO-DPAT (I. Izquierdo, Medina et al., 1998) or the serotonin 1A receptor antagonist DPTA (I. Izquierdo, Barros et al., 1998) on CA1, presented impairments on STM without altering LTM. Similar effects were found after injections of SKF38393, 5HT1A receptor antagonist NAN-190, the β blocker tomolol (I. Izquierdo, Medina et al., 1998), the glutamate AMPA receptor antagonist CNQX or GABAA receptor agonist muscimol (I. Izquierdo, Barros et al., 1998) into the entorhinal cortex. Those findings support the idea that STM involves different mechanisms from those involved in LTM, and that several drugs have different effects on both memory types depending on the time and place of administration (L. A. Izquierdo et al., 2002).

Moreover, it has been previously reported that in CTA, STM test does not either interfere with LTM formation or induces extinction (Ferreira et al., 2002). Furthermore, in this work we demonstrate that STM abolishment by NMDA receptor blockade in the PBN does not interfere with LTM test, supporting the theory that these two forms of memory can be generated in a parallel, and not in a serial form, at least in some of the brain structures studied.

In the present work we found that NMDA receptors are in fact participating differentially in the PBN for STM and LTM. NMDA receptors have already been reported to participate in both memories, as is the case when NMDA receptor antagonists applied just after the LiCl injections disrupted both STM and LTM

(Ferreira et al., 2002). Surprisingly, we found that APV application in the PBN after the CS presentation blocks STM but not LTM formation. The NMDA receptor, has been classically associated with long-term changes (Platenik, Kuramoto, & Yoneda, 2000) however in our results it participates only in STM, but not in LTM formation. Which downstream mechanisms of NMDA receptor activation could be participating in STM formation? While our results can not answer this question, there are reports in the literature that shade some light on this problem.

Among the mechanisms reported to be involved differentially in STM and LTM, it has been reported that PKA inhibitor Rp-cAMPS or the activator of the regulatory subunit of PKA, show that STM and LTM formation require separate PKA-dependent processes in CA1 for one-trial step-down avoidance task. Rp-cAMPS blocked and Sp-cAMPS enhanced STM when given at 0, 22, 45 or 90 min, and Rp-cAMPS blocked and Sp-cAMPS enhanced LTM when given at 0 or 175 min after training, but not at the intermediate times (Vianna et al., 2000). Additionally, it has been shown that intra-CA1 infusion of an inhibitor of the MAPK c J-un amino terminal kinase (JNK), SP600125, enhanced STM but blocked LTM formation of an inhibitory avoidance learning task (Bevilaqua, Kerr, Medina, Izquierdo, & Cammarota, 2003). Altogether these results suggest differential intracellular mechanisms during the STM and LTM. Future experiments should explore the intracellular process as a consequence of the NMDA receptors activity underlying the STM formation in PBN.

Thus, kinases whose role has been proven in LTM, such as PKA, are also involved in STM expression. Future experiments are necessary in order to determine the

intracellular mechanisms started after NMDA receptor activation in the PBN for STM formation of CTA.

In conclusion, the NMDA receptor has a differential role in taste aversion memory formation in the IC and in the PBN. While in the IC it is only necessary for the establishment of LTM, in the PBN it is needed for both STM and LTM during taste memory formation, or exclusively for STM and not for LTM after taste consumption. These results support the idea that STM and LTM are processed in parallel in some structures, and that the NMDA receptor activity of the IC and PBN have different roles on taste aversive memory formation.

Reference list

- Ballesteros, M. A., Gonzalez, F., Moron, I., DeBrugada, I., Candido, A., & Gallo, M. (2002). Dissociation of the associative and visceral sensory components of taste aversion learning by tetrodotoxin inactivation of the parabrachial nucleus in rats. *Neurosci Lett*, *322*(3), 169-172.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci*, *5*(3), 209-217.
- Bevilaqua, L. R., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2003). Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*, *17*(4), 897-902.
- Bielavska, E., Miksik, I., & Krivanek, J. (2000). Glutamate in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion. *Brain Res*, *887*(2), 413-417.
- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). *Conditioned taste aversion : Memory of a special kind*. New York: Oxford University Press.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V., & Bermudez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci*, *16*(6), 1139-1145.
- Frey, S., Morris, R., & Petrides, M. (1997). A neuroanatomical method to assess the integrity of fibers of passage following ibotenate-induced damage to the central nervous system. *Neurosci Res*, *28*(3), 285-288.
- Gallo, M., & Bures, J. (1991). Acquisition of conditioned taste aversion in rats is mediated by ipsilateral interaction of cortical and mesencephalic mechanisms. *Neurosci Lett*, *133*(2), 187-190.
- Gallo, M., Marquez, S. L., Ballesteros, M. A., & Maldonado, A. (1999). Functional blockade of the parabrachial area by tetrodotoxin disrupts the acquisition of conditioned taste aversion induced by motion-sickness in rats. *Neurosci Lett*, *265*(1), 57-60.
- Galvin, K. E., King, C. T., & King, M. S. (2004). Stimulation of specific regions of the parabrachial nucleus elicits ingestive oromotor behaviors in conscious rats. *Behav Neurosci*, *118*(1), 163-172.

- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C. J., De La Cruz, V., Nunez-Jaramillo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2003). Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem*, 80(3), 323-331.
- Gutierrez, R., Tellez, L. A., & Bermudez-Rattoni, F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci*, 17(8), 1556-1562.
- Ivanova, S. F., & Bures, J. (1990a). Acquisition of conditioned taste aversion in rats is prevented by tetrodotoxin blockade of a small midbrain region centered around the parabrachial nuclei. *Physiol Behav*, 48(4), 543-549.
- Ivanova, S. F., & Bures, J. (1990b). Conditioned taste aversion is disrupted by prolonged retrograde effects of intracerebral injection of tetrodotoxin in rats. *Behav Neurosci*, 104(6), 948-954.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635-636.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., de Souza, M. M., & Mello e Souza, T. (1998). Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem*, 69(3), 219-224.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, 103(1), 1-11.
- Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Vianna, M. R., Coitinho, A., deDavid e Silva, T., Choi, H., et al. (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol*, 22(3), 269-287.
- Kim, J. J., Fanselow, M. S., DeCola, J. P., & Landeira-Fernandez, J. (1992). Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behav Neurosci*, 106(4), 591-596.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.
- Paxinos, G. a. W. C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California, USA: Academic Press.
- Platenik, J., Kuramoto, N., & Yoneda, Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci*, 67(4), 335-364.

- Reilly, S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res Bull*, 48(3), 239-254.
- Reilly, S., Grigson, P. S., & Norgren, R. (1993). Parabrachial nucleus lesions and conditioned taste aversion: evidence supporting an associative deficit. *Behav Neurosci*, 107(6), 1005-1017.
- Spector, A. C. (1995). Gustatory function in the parabrachial nuclei: implications from lesion studies in rats. *Rev Neurosci*, 6(2), 143-175.
- Vales, K., Zach, P., & Bielavska, E. (2006). Metabotropic glutamate receptor antagonists but not NMDA antagonists affect conditioned taste aversion acquisition in the parabrachial nucleus of rats. *Exp Brain Res*, 169(1), 50-57.
- Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Ardenghi, P., Pereira, P., Rodrigues, C., et al. (2000). Differential role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short- and long-term memory. *Neurochem Res*, 25(5), 621-626.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y., & Sakai, N. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res*, 65(2), 123-137.

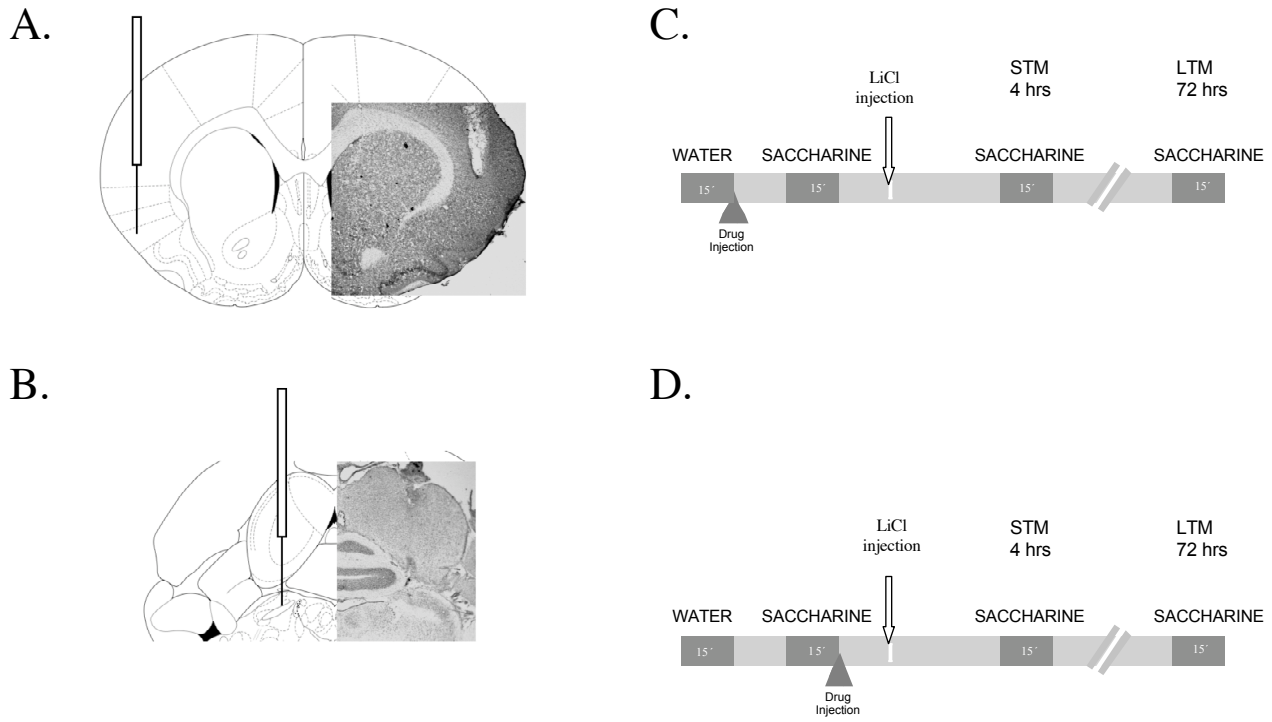


Figure 1. Photomicrograph of a coronal section of the rat brain stained with cresyl violet and diagram of the cannulae location in the IC (A) or in the PBN (B). Schematic representations of experimental protocols used to study the aversive TMT. In (C) injections were made before saccharin consumption, and in (D) injections were done immediately after saccharin consumption.

Insular cortex

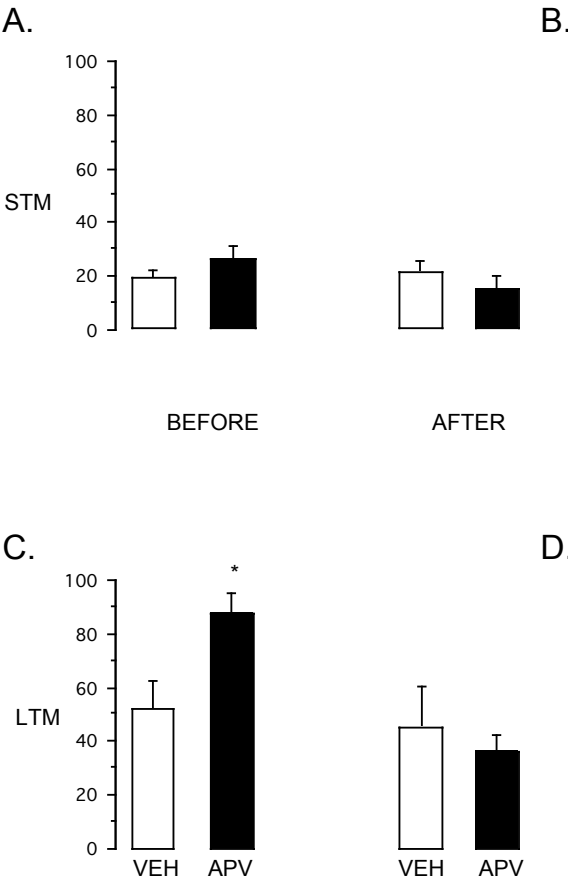


Figure 2. A and C show the pre-training effects of APV microinjection in the IC on STM and LTM tests. B and D show the post-training effects of APV in the IC on STM and LTM tests . Percent of water baseline standard error. * $p < 0.05$.

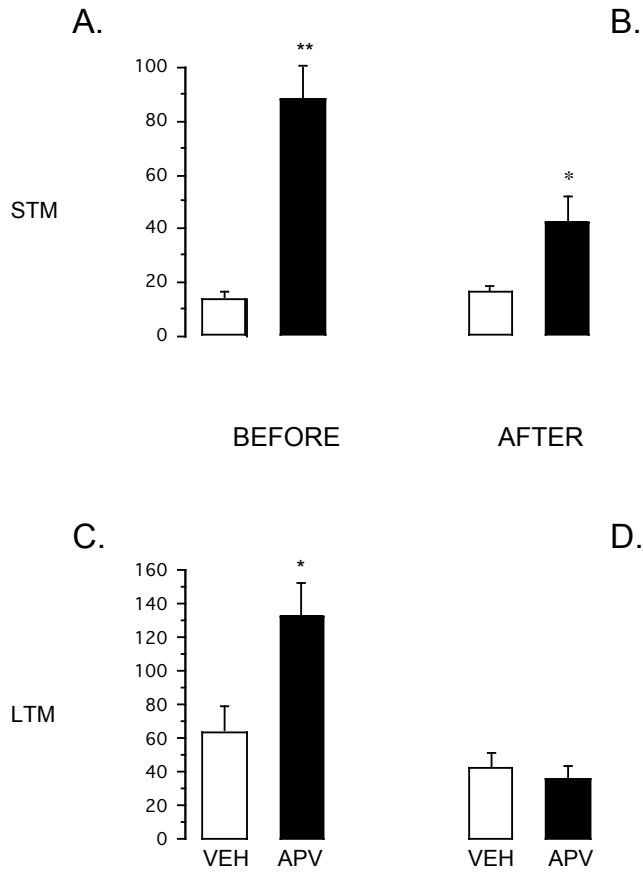


Figure 3. A and C show the pre-training effects of APV microinjection in the PBN on STM and LTM tests. B and D show the post-training effects of APV microinjections in the PBN on STM and LTM respectively. Percent of water baseline standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.5. Resumen de resultados sección 3.

En esta sección de la tesis, se exploró la participación de los receptores tipo NMDA en la formación del TMS aversivo, considerándose la medición de la MCP y la MLP en CI y el NPB.

Inyecciones bilaterales de APV, bloqueador de los receptores tipo NMDA, en CI, hechas antes del consumo de sacarina afectan la MLP y dejan intacta la MCP. Las inyecciones hechas inmediatamente después del consumo del estímulo gustativo no tienen ningún efecto en la formación de la memoria. Estos resultados concuerdan con lo ya reportado por Ferreira y colaboradores (2002).

Las inyecciones bilaterales de APV en el NPB, hechas antes de la presentación del estímulo gustativo afectan la formación de la MCP y la MLP. Por otra parte, el bloqueo de los receptores tipo NMDA justo después del consumo de la sacarina no tiene efecto en la MLP, sin embargo, esta manipulación farmacológica afecta la MCP. Este resultado sugiere que en el NPB, la MLP es un proceso independiente de la formación de la memoria gustativa a corto plazo, apoyando la propuesta del grupo de Izquierdo de que ambas memorias son generadas de manera independiente.

Capítulo 5

Discusión general

El sistema colinérgico cortical esta ampliamente relacionado con procesos asociativos y en etapas tempranas de la formación de la memoria (Miranda, 1999; Sarter, 1999). Se ha mostrado que la actividad neuronal del NAcc, a través de proyecciones GABAérgicas al cerebro anterior basal, puede afectar la actividad colinérgica cortical (Arnold et al., 2000).

Sin embargo, hasta ahora no se había descrito la participación del NAcc en un circuito estructural para la formación de una memoria en la cual sea importante la modulación colinérgica cortical a través del NBM.

Además se ha descrito que el NPB puede modular la actividad del NAcc, a través de las proyecciones provenientes del VTA.

Los trabajos presentados en esta tesis, se enfocaron en caracterizar la formación del trazo de memoria gustativa en las estructuras subcorticales NAcc y NPB.

Los resultados obtenidos en la sección 1 de esta tesis confirman la existencia de dos trazos de memoria del sabor, el TMS seguro y el TMS aversivo, activados por el consumo de un estímulo gustativo nuevo (Gutiérrez, 2003a, b) (Figura 5.1 A y B) y los resultados en la sección 2, sugieren que al menos en el NAcc, ambos TMS requieren de síntesis de proteínas en momentos distintos durante la consolidación de la memoria gustativa. Por lo que, en ambos subnúcleos del NAcc, existen mecanismos diferentes como la activación de los receptores tipo NMDA en la formación del TMS aversivo y no en el seguro. Pero solamente el NAcc medial participa, a través de los receptores muscarínicos de ACh, en la formación de ambos TMS. Por otra parte, en todos los tratamientos farmacológicos utilizados en el NAcc en los experimentos de esta tesis, se observó que la MLP es dependiente de la MCP, es decir al afectar la MCP se altero la MLP.

Posteriormente, los resultados presentados en la sección 3 muestran que en el NPB es necesaria la activación de los receptores tipo NMDA de glutamato durante la formación del TMS aversivo. Además se observó que la formación de las memorias de corto y largo plazo son procesos independientes, es decir al afectarse la MCP quedó intacta la MLP.

5.1. La formación de los elementos del TMS comparten mecanismos de procesamiento. Receptores muscarínicos

La actividad de los receptores muscarínicos de ACh es necesaria, en las cortezas insular y perirrinal, en la formación del TMS sin importar las consecuencias gástricas que sigan al consumo de un sabor nuevo. La inyección bilateral de un antagonista a estos receptores, como la escopolamina, hecha antes del consumo del sabor nuevo en el NAcc medial afecta de igual manera la formación del TMS, es decir, cuando el consumo de sacarina no fue seguido por malestar gástrico, los animales no presentaron un incremento en su consumo de sacarina como lo esperado durante la AN, mantuvieron un consumo disminuido muy semejante al consumo observado durante la primera presentación. Cuando la sacarina fue seguida de señales de intoxicación, los animales con el bloqueo de los receptores muscarínicos, mas alla de presentar una aversión al sabor, presentaron un incremento en el consumo de sacarina.

Es importante destacar que las manipulaciones farmacológicas con escopolamina antes de la presentación del estímulo gustativo, no afectaron la percepción y reconocimiento del estímulo gustativo nuevo: todos los animales presentaron una clara respuesta neofóbica, observada por un consumo reducido con respecto al consumo basal de agua, a la sacarina 0.5 %. Por tanto, los resultados obtenidos son como consecuencia de afectar la formación del TMS.

Las manipulaciones farmacológicas hechas justo después de la presentación de la sacarina en el NAcc medial, no afectaron la formación del CAS. Es decir, que la actividad de los receptores muscarínicos no es necesaria una vez que el animal ha consumido el estímulo gustativo nuevo. Esto implica que la activación de los receptores metabotrópicos de ACh es necesaria para que se lleve a cabo la formación del TMS en el NAcc medial.

Por lo tanto, los receptores muscarínicos de ACh en el NAcc medial participan en la formación del TMS independientemente de las consecuencias del consumo del sabor.

En el caso del NAcc lateral, los resultados encontrados tras inyectar escopolamina antes y después de la presentación de la sacarina muestran que este subnúcleo no participa en la formación de la memoria gustativa de aversión ni de lo seguro. Esto sugiere una participación diferencial de ambos subnúcleos del NAcc en la formación del trazo de memoria gustativa.

Este efecto diferencial puede explicarse con base al número de neuronas colinérgicas en ambos subnúcleos del NAcc. La actividad colinérgica dentro del NAcc proviene de sus interneuronas colinérgicas (Pennartz et al., 1994), y existen tres veces mas neuronas inmunoreactivas a acetilcolinesterasa en el NAcc medial que en el NAcc lateral (Meredith, et al, 1989). Otra posibilidad es que el NAcc lateral participe en etapas mas tardías en la formación de la memoria, posibilidad que no se exploró en esta tesis.

El NAcc medial posiblemente participa en la formación de la memoria gustativa modulando la actividad del NBM y este a su vez en las proyecciones colinérgicas hacia la CI (Figura 5.2). Esta

hipótesis se basa en que la actividad colinérgica en CI es necesaria para la formación de ambos TMS (Gutiérrez et al., 2003 b).

Por lo tanto, al menos a nivel cortical (cortezas insular y perirrinal) y subcortical (NAcc medial), ambos TMS necesitan la activación de los receptores muscarínicos de ACh, sin importar las consecuencias gástricas que siguen a la ingesta del sabor (Figura 5.1 C).

5.2. La formación de los elementos del TMS difieren en los mecanismos de procesamiento. Receptores tipo NMDA

Buresova y Bures postularon la posibilidad de que los elementos aversivo y seguro de la memoria del trazo gustativo sean mediados por diferentes mecanismos, ambos iniciados por un sabor nuevo, (Buresova, 1980). Los animales que quedan en profunda anestesia inmediatamente después de la presentación de un sabor nuevo y que se mantienen anestesiados por horas después de la inyección del agente que genera malestar, presentan aprendizaje aversivo. Sin embargo, la AN fue afectada por el mismo procedimiento (Buresova, 1980), reflejándose en un consumo similar a la primera vez de la ingesta.

Los resultados de esta tesis muestran que el NAcc tiene un papel importante dentro del circuito en la formación del TMS. Se mostró que la activación de los receptores tipo NMDA de glutamato participan diferencialmente en la formación del TMS aversivo y seguro. Estos receptores son importantes en el NAcc medial y el lateral en la formación de la memoria gustativa de aversión de corto y largo plazo. No se encontró efecto alguno en la formación de largo plazo del TMS seguro. Es decir, la activación de los receptores tipo NMDA es necesaria únicamente cuando el consumo de un estímulo gustativo nuevo es seguro de señales de intoxicación.

También se exploró la participación de los receptores tipo NMDA en la formación del trazo gustativo en CI y NPB. El bloqueo de estos receptores en CI, previo mas no posterior al consumo de sacarina, afecta la MLP y deja intacta la MCP. Este resultado es similar al reportado por Ferreira y sus colaboradores (Ferreira et al., 2002). Es decir, el TMS permanece en el sistema permitiendo la asociación de ambos estímulos para la MCP.

Al medir la liberación de glutamato en CI, después de presentar un estímulo gustativo (sacarina) o inducir malestar gástrico con una inyección intraperitoneal de LiCl, se observó un incremento de la liberación de glutamato únicamente con la inyección de LiCl (Miranda et al., 2002). Esto sugiere que el sistema glutamatérgico en CI está relacionado con la representación del malestar gástrico. Los efectos de las inyecciones de APV en CI, anteriores y posteriores a la presentación de la sacarina, pueden ser explicados por una participación de los receptores tipo NMDA en CI sobre el trazo de memoria de aversión de largo plazo. Es decir, los mecanismos involucrados en la MCP en CI no necesita la activación de los receptores tipo NMDA de glutamato.

También se sabe que la inhibición de estos receptores una hora después de inducir el malestar

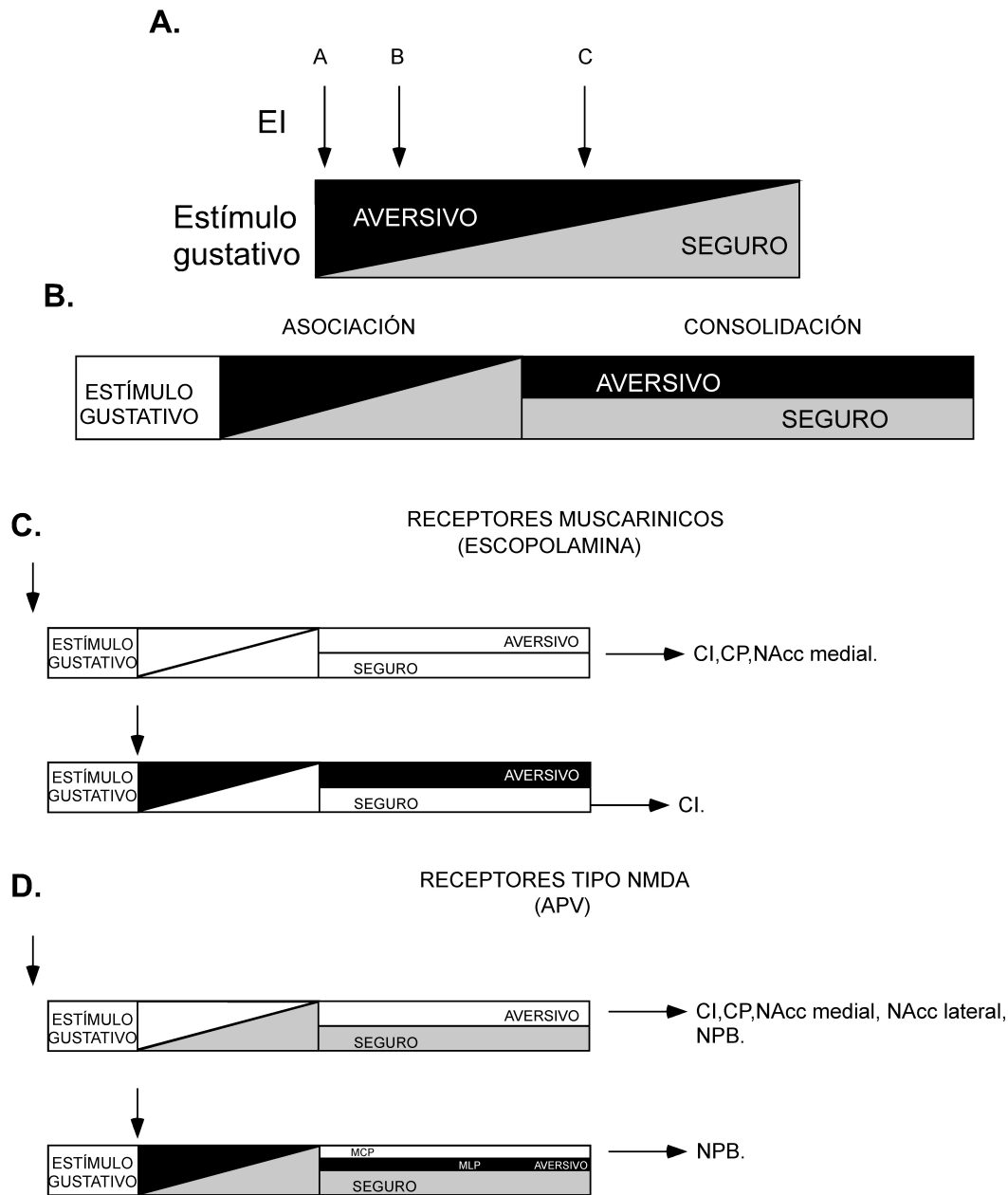


Figura 5.1: Trazo de memoria del sabor: dos elementos, TMS seguro y TMS aversivo. A) Modelo propuesto de la formación de ambos elementos del TMS. Cuando un animal ingiere un alimento por primera vez, dependiendo de las consecuencias de la ingesta, el animal aprenderá si el consumo de ese alimento es seguro o aversivo. Las flechas representan la llegada del malestar (estímulo incondicionado, EI). Si el malestar llega en el tiempo A, el animal desarrollará mayor aversión al sabor en comparación con la llegada del EI en el tiempo C. Si el periodo para la asociación del sabor y el malestar ha terminado (triángulo aversivo) y no llega el malestar gástrico, el animal desarrollará atenuación de la neofobia (triángulo seguro). B) Curso temporal de los eventos durante la formación del aprendizaje gustativo. El consumo del estímulo gustativo genera la formación del trazo de memoria del sabor (TMS), existe un periodo de asociación seguido por un periodo de consolidación del TMS correspondiente a las consecuencias del consumo del estímulo gustativo. Representación de los efectos de la inyección bilateral de C) escopolamina (antagonista muscarínico de ACh) y D) APV (antagonista de los receptores tipo NMDA de glutamato) antes o después de la presentación del estímulo gustativo. Los cuadros en blanco significan que hubo un efecto en la formación del TMS en las estructuras que siguen a la flecha. Por los resultados obtenidos con inyecciones de APV después de la presentación del estímulo gustativo, se propone que el TMS aversivo al menos en el PBN, la MCP y la MLP son procesados por mecanismos independientes. Abreviaturas: CI - corteza insular; CP - corteza perirrinal; NAcc - núcleo accumbens; NPB - núcleo parabraquial; EI - estímulo incondicionado; TMS - trazo de memoria del sabor. Modificado de Gutiérrez, 2003b.

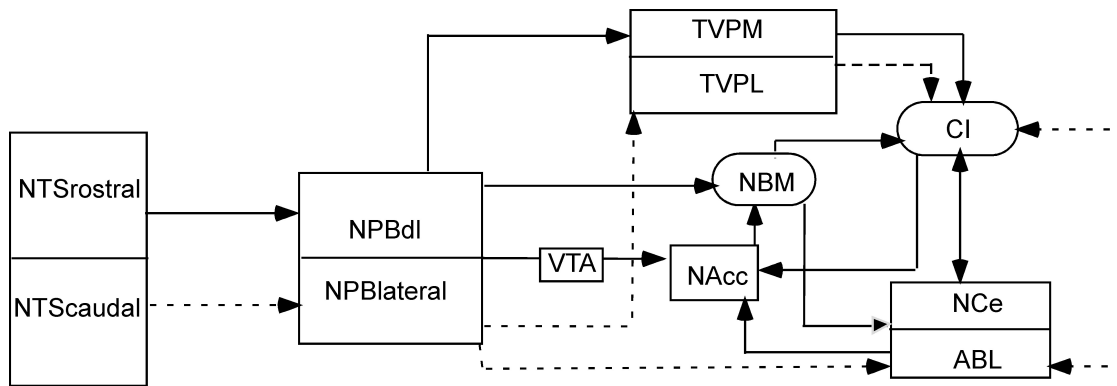


Figura 5.2: Esquema de la comunicación entre estructuras para la formación del TMS incluyendo al NAcc. Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004.

gástrico afecta la formación de MCP y MLP. Estos resultados sugieren que tales receptores en esta corteza participan en la consolidación de la memoria gustativa y en la señal consecuencia del malestar (Ferreira et al., 2002).

En el caso de la formación de la memoria gustativa de lo seguro, las inyecciones de APV en CI antes e inmediatamente después de la presentación del sabor nuevo, no afectan la respuesta neofóbica ni su atenuación. Es decir, la CI al igual que el NAcc, no participa en la formación del trazo de memoria de lo seguro a través de los receptores tipo NMDA (Gutiérrez et al., 2003b).

Por otra parte, la aplicación bilateral de un antagonista de los receptores tipo NMDA en el NPB afecta la formación de la MCP y la MLP cuando se hace antes de la presentación de la sacarina. Este resultado puede explicarse de la siguiente manera. El NPB es el segundo relevo en el procesamiento de los estímulos gustativo y visceral (Yamamoto et al., 1994). Entonces, cuando se aplica APV en esta estructura debe existir una interferencia en el procesamiento de ambos estímulos involucrados en la formación de la memoria aversiva. Sin embargo, la inyección de APV después del consumo de la sacarina deja intacta la formación de la MLP, descartando cualquier posible efecto de la inyección de APV previa a la presentación del sabor sobre el procesamiento de la señal visceral o bien en la asociación de ambos estímulos. Además, se sabe que lesiones totales del NPB no afectan la capacidad del animal en procesar el estímulo gustativo (Grigson et al., 1998). Así que el efecto observado con las inyecciones de APV antes de la presentación de sacarina se debe a que la activación de los receptores tipo NMDA en el NPB es necesaria para la formación del TMS aversivo. Los resultados presentados en este trabajo de tesis, se limitaron a describir los sustratos neuroquímicos a través de los receptores tipo NMDA del NPB cuando el TMS adquiere un valor aversivo. Pero, queda por describir la participación de este núcleo en la formación del TMS seguro.

Por lo tanto, cuando el consumo de un estímulo gustativo nuevo es seguido de señales de intoxicación, a nivel cortical y subcortical, es necesaria la activación de los receptores tipo NMDA como se muestra en la Figura 5.1 D.

Finalmente, los datos preliminares de la síntesis de proteínas para la consolidación del trazo de memoria gustativa en el NAcc constituyen evidencia adicional que los procesos que forman ambos TMS son diferentes.

5.3. La memoria de corto plazo no es necesaria para formar memorias más duraderas

El modelo de memoria aversiva a los sabores permite medir las memorias de corto y largo plazo en el mismo animal, sin tener interferencia en la expresión conductual de la MLP tras medir la MCP. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que tanto la MCP como la MLP son formadas por el mismo trazo de memoria (ver Cuadro 5.1). En contraste con estos resultados, la inyección de APV en el NPB justo después de la presentación de la sacarina afecta la formación de la MCP dejando intacta la formación de la MLP. Estos resultados apoyan la idea de que la MCP no es necesaria para la formación de la MLP, tratándose de dos trazos de memoria independientes (Figura 5.1 D).

Los receptores tipo NMDA de glutamato han sido ampliamente involucrados en procesos de consolidación de la memoria (McGaugh, 2000). Las vías que activan estos receptores son muy variadas, y van desde cinasas como CamkII hasta otras enzimas como la adenilato ciclasa vía Ca-calmodulina (Groc, et al, 2004). Estas cinasas pueden llevar a la expresión de genes, proporcionando evidencia de la participación de este receptor en el establecimiento de la MLP. También pueden regular la actividad de la sinápsis al fosforilar receptores o inducir su relocalización (Nong, et al, 2004) cambiando la forma en que la membrana sináptica responde a la estimulación de la presinápsis. Se sabe que el receptor tipo NMDA puede estar localizado en diferentes zonas dentro de la neurona. En el caso del NPB, la participación diferencial del receptor tipo NMDA en MCP y MLP puede ser consecuencia de que el receptor sea relocalizado a una zona donde puede activar únicamente los mecanismos involucrados en la formación de la MCP y no de la MLP. Aún resta dilucidar los mecanismos intracelulares involucrados en la formación de la MCP que no participan en la MLP.

Se concluye que al menos a través de la activación de los sistemas glutamatérgicos y colinérgicos, la MLP depende de la formación de la MCP en CI, corteza perirrinal y en los subnúcleos medial y lateral del NAcc. Y que la MLP es independiente de la MCP en el NPB, a través de la activación de sus receptores tipo NMDA, apoyando la propuesta de que la MCP no necesariamente es el primer paso para formar la MLP. No se descarta la posibilidad de que el estudio de los demás sistemas de neurotransmisión involucrados en el trazo de memoria gustativa a nivel subcortical o cortical participen en la formación de la MCP y no en la MLP (Figura 5.1 D).

5.4. Modelo propuesto para la formación del TMS: comunicación interestructural

Como se puede observar en el cuadro 5.1, en CI, corteza perirrinal y NAcc medial los receptores muscarínicos de ACh procesan ambos TMS. La representación del TMS aversivo, pero no del seguro, es mediado por la actividad de los receptores tipo NMDA en CI, ambos subnúcleos del NAcc y de manera particular por el NPB.

En todos los casos, las inyecciones se realizaron entre quince y veinte minutos antes de la presentación de sacarina o bien inmediatamente después de su consumo. En esta tesis se propone que la formación del TMS es procesada de manera distribuida a nivel cortical y subcortical, a través de la activación de los receptores muscarínicos de ACh y receptores tipo NMDA de glutamato.

Por los datos presentados en esta tesis respecto a la participación del NAcc medial en el procesamiento del TMS, se propone que la liberación de ACh en la CI como consecuencia del sabor nuevo puede estar regulada por la conexión NAcc–NBM–CI. De ser así, aquellos eventos en la CI desencadenados por el estímulo gustativo, y dependientes de la actividad de los receptores muscarínicos de ACh, como la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B del receptor glutamatérgico tipo NMDA (Rosenblum et al., 1997), deben ser afectados al interrumpir esta vía. Experimentos futuros podrían probar esta hipótesis.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren un proceso en paralelo a nivel cortical y subcortical en la formación del TMS aversivo en un sistema de comunicación NAcc–ABL–CI. Se propone que el NAcc a través de los receptores tipo NMDA de glutamato procesa el trazo de memoria concerniente a la señal aversiva que posteriormente junto con la ABL, la CI y el NPB, le otorgarían la etiqueta de aversivo al estímulo gustativo (ver Figura 5.2).

Por otra parte, las lesiones del NPB producen cambios en la liberación de dopamina en el NAcc y se ha propuesto que el NPB puede influenciar la actividad dopaminérgica dentro del NAcc a través de conexiones con el VTA (Hajnal and Norgren, 2005). Así que una posible vía de procesamiento del TMS podría ser NPB–VTA–NAcc.

Cuadro 5.1: Resumen de los efectos de inyecciones bilaterales de APV y escopolamina antes o inmediatamente después de la presentación de la sacarina en diversas estructuras durante la formación del trazo de memoria gustativa seguro (AN) y aversivo (CAS).

	APV						Referencias
	CAS				AN		
	Antes		Después		Antes	Después	
	MCP	MLP	MCP	MLP	MLP	MLP	
NPB	×	×	×	✓	¿?	¿?	Ballesteros et al. , en preparación
NAcc medial	×	×	✓	✓	✓	¿?	Ramírez-Lugo et al. , 2006
NAcc core	×	×	✓	✓	✓	¿?	Ramírez-Lugo et al. , 2006
CI	✓	×	✓	✓	✓	✓	Ferreira et al. , 2002; Ballesteros et al. , en preparación
CP	¿?	✓	¿?	¿?	✓	✓	Gutiérrez et al. , 2004

	Escopolamina						Referencias
	CAS				AN		
	Antes		Después		Antes	Después	
	MCP	MLP	MCP	MLP	MLP	MLP	
NPB	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	
NAcc medial	×	×	✓	✓	×	¿?	Ramírez-Lugo et al. , 2006
NAcc core	✓	✓	✓	✓	✓	¿?	Ramírez-Lugo et al. , 2006
CI	×	×	✓	✓	×	×	Ferreira et al. , 2002
CP	×	×	¿?	✓	×	×	Gutiérrez et al. , 2004

× = Si hay efecto en la formación de la memoria, ✓ = No hay efecto en la formación de la memoria, ¿? = No se sabe su efecto en la formación de la memoria.

**Artículo de revisión: participación del
núcleo Accumbens en la memoria
gustativa**

Taste Memory Formation: Role of Nucleus Accumbens

Leticia Ramírez-Lugo, Luis Núñez-Jaramillo and Federico Bermúdez-Rattoni

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510 México, DF, México

Correspondence to be sent to: Federico Bermúdez-Rattoni, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510 México, DF, México. e-mail: fbermude@ifc.unam.mx

Abstract

When a novel taste has been associated with postingestive malaise, animals recognize this taste as aversive. This associative learning is known as conditioned taste aversion. However, when an animal consumes a novel taste and no aversive consequences follow, it becomes recognized as a safe signal, leading to an increase in its consumption in subsequent presentations. In this review, we will discuss the results related to the taste memory formation focusing particularly on the nucleus accumbens (NAcc). The NAcc keeps projections with amygdala, insular cortex, parabrachial nucleus, and nucleus of the solitary tract areas important for taste memory formation. We will review the evidence relating to how the NAcc could be involved in taste memory formation, due to its role in the taste memory trace formation and its role in the association of the conditioned stimulus–unconditioned stimulus, and finally the retrieval of taste memory. In this context, we will review the participation of the cholinergic, dopaminergic, and glutamatergic systems in the NAcc during taste memory formation.

Key words: learning, memory formation, nucleus accumbens, taste memory trace

Introduction

A biologically important type of associative learning is the conditioned taste aversion (CTA). CTA is a robust type of learning in which the animal avoids consumption of a taste (conditioned stimulus [CS]) previously associated with gastric malaise (unconditioned stimulus [US]). However, when a novel taste is presented with no aversive consequences, it later becomes recognized as a safe signal, leading to an increase in its consumption.

Once a taste is ingested, it generates a taste memory trace (TMT), which is the neural representation of the taste and most likely remains temporally stored in parallel along several brain regions. This TMT has at least two components, safe and aversive, which share some common mechanisms, whereas differing in others (Gutierrez et al. 2003b; Bermudez-Rattoni 2004). Particularly, descriptions have been made referring to the fact that the safe TMT depends on cortical muscarinic receptor activity, whereas the aversive TMT is at least partially dependent on the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor activity (Gutierrez et al. 2003a). Once the consequences of taste ingestion have been established, a taste memory is formed, which can be either safe or aversive depending on those consequences.

A structure that has been recently linked to taste memory formation is the nucleus accumbens (NAcc). Most of the

research on the functions of the NAcc has focused on its role in reward (Kelley et al. 1997), addiction (Everitt et al. 1999), feeding (Saul'skaya and Mikhailova 2003), motivation (Salamone 1996) and learning (Setlow 1997; Martinez et al. 2002).

The NAcc

The NAcc is a structure in the rostromedial forebrain and is the major component of the ventral striatum. Three fundamental subterritories of the NAcc have been described. The caudal two-third subregions are called core and shell, whereas the rostral pole comprises the third compartment (Delfs et al. 1998; Zahm 2000). The shell projects to the medial part of the ventral pallidum, the lateral hypothalamus, the ventral tegmental area (VTA), the parabrachial nucleus (PBN), and the substantia nigra pars compacta; on the other hand, the core projects to the dorsolateral part of the ventral pallidum, the entopeduncular nucleus, and substantia nigra pars compacta (Heimer et al. 1991; Usuda et al. 1998). Some studies have suggested that the medial region of the NAcc shell is more intimately connected to visceral and autonomic effector systems and the core to somatic motor effector systems (Zahm and Heimer 1990; Zahm 2000). Regarding neurotransmitter inputs, the NAcc receives dopaminergic

innervation from VTA (Zahm and Heimer 1993), and GABAergic and glutamatergic from basolateral amygdala (BLA) and from the insular cortex (IC) (Kelley and Domesick 1982; Wright and Groenewegen 1996). In addition, noradrenergic innervation from nucleus coeruleus and nucleus of the solitary tract (NTS) has been described (Pennartz et al. 1994). Among these structures, the IC, BLA, PBN, and NTS play a very important role in TMT processing (Yamamoto et al. 1994).

NAcc and taste memory formation

The development of a gustatory memory begins with the consumption of a food or drink, which has been suggested to be regulated by the NAcc system (Maldonado-Irizarry et al. 1995; Kelley and Swanson 1997; Rada et al. 1997; Stratford and Kelley 1997; Saul'skaya and Mikhailova 2003). Regarding CTA memory formation, taste and visceral information could reach the NAcc via 2 pathways: the NTS–PBN–central nucleus of amygdala–VTA–NAcc connection and the IC–BLA–NAcc pathway (McDonald 1991). The BLA sends a direct glutamatergic projection to the NAcc (Kelley and Domesick 1982; Robinson and Beart 1988; Groenewegen et al. 1996). The possibility that the connection from the BLA could regulate NAcc activity has also been shown (Louilot et al. 1985; Howland et al. 2002). In particular, the BLA and central amygdala modulate NAcc dopamine (DA) efflux; the latter modulates NAcc DA via a GABAergic projection to the VTA (Everitt et al. 1999). The regulation of NAcc activity by the amygdala, in synergism with the afferents from the agranular IC to the NAcc, has already been proposed to be an important factor in associative learning (Louilot and Besson 2000).

There are reports that suggest an important role of DA in the NAcc during associative processes. In this regard, increments of DA release during the formation of a conditioned association have been reported (Young et al. 1993, 1998; Datla 2002). For example, a neutral stimulus (tone or flashing light), which does not normally evoke any measurable change in DA in the NAcc, can evoke an increase above the one seen with the footshock alone, when they have previously been paired with it (Young et al. 1998). Conversely, in CTA, Mark et al. (1991) have demonstrated that intraoral saccharin (CS) increases DA levels in the NAcc before pairing it with an aversive stimulus (US), and once the 2 stimuli have been paired, saccharin consumption decreases DA levels in this nucleus. These results are in accord with those obtained with olfactory stimuli because conditioned odor stimulus when presented again decreases DA release in the NAcc (Louilot and Besson 2000). Thus, the involvement of NAcc in associative learning presents itself clearly, as well as the fact that this nucleus presents important changes in DA release as a consequence of CTA conditioning.

As mentioned before, the consumption of a novel taste can lead to two different outcomes, depending on its association,

safe or aversive taste memory. Thus, the novelty of the stimulus would be important in the formation of TMT. In this regard, it has been shown that NAcc neurons respond to the consumption of a novel food, characterized by a decrease in their spontaneous neuronal activity (Lee et al. 1998). Differential responses in DA release after novel or familiar taste presentations have been shown. In this regard, Bassareo et al. (2002) found that the intraoral infusion of gustatory stimuli increased DA release in the NAcc core and shell, independently of the novelty or valence; like positive (20% of sucrose or sucrose plus chocolate) or negative (aversive such as saturated NaCl and quinine solutions). In accordance, licking of novel taste increased basal DA in dialysates from the NAcc (Hajnal and Norgren 2005). Exposure to a familiar intraoral solution after a single preexposure increased DA from dialysates of the NAcc core but not of the NAcc shell (Bassareo et al. 2002). However, it has been shown that a DA D1 antagonist (SCH 39166) in the NAcc shell but not in the NAcc core impairs CTA learning (Fenu et al. 2001). The exact role of DA in the 2 NAcc sub regions remains to be established in the acquisition, association, and consolidation of aversive taste memory formation.

Taste and visceral inputs coming from the PBN could be modulating the DA activity in the NAcc. It has been shown that rats with lesions in the PBN showed less intense NAcc DA release during sucrose licking (Hajnal and Norgren 2005). The PBN sends axons to the central nucleus of the amygdala, the lateral hypothalamus, the bed nucleus of the stria terminalis (Fulwiler and Saper 1984), and the VTA (Oades and Halliday 1987). In this regard, it has been proposed that the PBN might influence NAcc DA activity via direct connections to the VTA, but it is equally likely that the route is multisynaptic through their extensive connections in the ventral forebrain (Hajnal and Norgren 2005).

Consumption of food with an appetitive taste induces a decrease in glutamate levels in the NAcc (Rada et al. 1997; Saul'skaya and Mikhailova 2003), whereas natural or conditioned aversive food produces significant glutamate release (Saul'skaya and Mikhailova 2002). Interestingly it has been demonstrated that glutamate release is mediated by D2 DA receptors (Saul'skaya and Mikhailova 2003). Accordingly, we recently found that the activity of NMDA receptors in the NAcc shell and core is necessary for the TMT processing. CTA allows to test short-term memory 4 h after the LiCl injection without interferences to long-term memory test 72 h after the acquisition day. We demonstrated that pretraining injection of DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV), an NMDA receptor antagonist, on either NAcc shell or core, impaired short-term and long-term aversive taste memory, without affecting the safe taste memory formation. Conversely, posttraining injections of APV did not have any effect on either task (Ramirez-Lugo et al. 2006). These results suggest that the NMDA receptors in the NAcc shell and core have an important role in the processing of aversive TMT, but not of safe TMT.

Interestingly, the cholinergic muscarinic receptors are needed in the NAcc shell but not in the NAcc core for the formation of either safe or aversive taste memory (Ramirez-Lugo et al. 2006). Pretraining injection of scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, on NAcc shell, but not core, disrupted both short-term and long-term aversive taste memory and also prevented the safe taste memory formation, whereas posttraining injections of scopolamine had no effects on either safe or aversive taste memory formation. These results suggest that the activation of muscarinic receptors in NAcc shell is necessary for the normal processing of a taste stimulus that can be later associated with either aversive or safe consequences (Ramirez-Lugo et al. 2006). Altogether these results support the proposed idea of the existence of two different memory traces generated by the consumption of a new taste (Gutierrez et al. 2003a, 2003b; Bermudez-Rattoni 2004) and that the NAcc is involved in both aversive and safe TMT (Ramirez-Lugo et al. 2006).

It is clear that the NAcc has an important role in taste memory formation, but its role should be mediated by its interactions with other structures. It is possible that, given the participation of BLA in processing the aversive stimulus (Miranda et al. 2002), the connection between BLA and NAcc could play a central role in relating the aversive TMT with the information of the malaise-inducing agent during aversive memory formation. Another possible mechanism for the participation of NAcc in taste learning is through its modulation to the nucleus basalis magnocellularis (NBM) that in turn projects cholinergic efferents to the cortical mantle, including the IC (see Figure 1). In this regard, it has been demonstrated that NAcc shell can regulate acetylcholine (ACh) release in the cortex via its modulation to NBM (Neigh-McCandless et al. 2002).

As mentioned above, the formation of the TMT takes place in several brain structures. However, if the taste stimulus is followed by gastric malaise (US), it will become the CS in order to form a conditioned taste aversion. Although where these stimuli convergence takes place remains to be established, several brain regions have been proposed as good candidates, like the insular and the perirhinal cortex (Gutierrez et al. 2003a, 2004; Bermudez-Rattoni 2004), the amygdala (Swank 2000), and the PBN (Yamamoto et al. 1994), and now the NAcc itself could also be participating in this process.

In addition, the role of the NAcc in the retrieval of aversive taste memory has been suggested. In this regard, the NAcc presents significant changes in ACh release when saccharin has been previously paired with LiCl but not with isotonic saline. Moreover, a significant increase in the ACh levels in the NAcc has been observed during intraoral infusion of saccharin and levels remained elevated for about 20 min (Mark et al. 1995). Similarly, the NAcc shows changes in *c-fos* expression during taste aversion retrieval but not after consumption an innately aversive tastant (quinine hydrochloride) consumption or LiCl-induced visceral stimulation in unconditioned animals (Yasoshima et al. 2006).

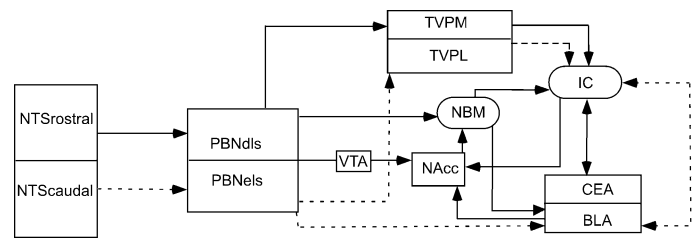


Figure 1 Schematic drawing of the principal taste and visceral brain pathways. BLA, basolateral amygdala; CEA, central nucleus of amygdala; dls, dorsolateral subnucleus; els, exterior lateral subnucleus; IC, insular cortex; NAcc, nucleus accumbens; NBM, nucleus basalis magnocellularis; NTS, nucleus of the solitary tract; PBN, parabrachial nucleus; VTA, ventral tegmental area; TVPL, ventral posterior lateral nucleus of the thalamus; TVPM, ventral posterior medial nucleus of the thalamus. Solid lines represent the gustatory projections, and the dashed lines represent the visceral projections. Modified from Bermudez-Rattoni (2004).

Conclusion

In this report, we have presented evidences of how the NAcc could be involved in processing the taste stimulus, as well as in the association of taste with visceral consequences. It has been proposed that TMT can be associated with either aversive or safe consequence (Bermudez-Rattoni 2004). Here we examine the current literature on the participation of 3 different neurotransmitter systems of the NAcc, dopaminergic, glutamatergic, and cholinergic, during the taste memory formation. In this regard, there is evidence that both aversive and safe memory traces are initially processed by cholinergic activation in the NAcc shell (Ramirez-Lugo et al. 2006). Additionally, the NAcc presents a significant increase in ACh release as a consequence of the consumption of a familiar-aversive conditioned taste but not as a consequence of familiar-safe unconditioned taste consumption (Mark et al. 1995). The cortical cholinergic activity related with the TMT formation is modulated by the NBM activity (Miranda and Bermudez-Rattoni 1999). Thus, the NAcc shell can regulate the ACh release in the cortex via its modulation through the NBM (Neigh-McCandless et al. 2002). Altogether, the results presented in this review suggest that the participation of NAcc in taste learning could be through its effect on cortical ACh release by its modulation of the NBM (see Figure 1).

There is an important participation of DA system during taste memory formation. It has been suggested that DA release into the NAcc is involved in aversive taste memory because its release decreases after presentation of conditioned aversive taste (Mark et al. 1991). Furthermore, a role for NAcc shell DA D1 receptors in CTA has been demonstrated by Fenu et al. (2001). Additionally, the consumption of a novel taste, independent of its intrinsic aversive/safe value, increases DA in both NAcc core and shell. However, familiar-aversive or -safe taste produces changes in DA release only into the NAcc core (Bassareo et al. 2002). The NAcc receives dopaminergic innervations from VTA

(Zahm and Heimer 1993), and it has been proposed that the PBN might influence NAcc DA activity via connections to the VTA (Hajnal and Norgren 2005).

The role of glutamate in the NAcc by its NMDA receptor activation seems to be involved in processing the aversive but not the safe taste memory formation (Ramírez-Lugo et al. 2006). In this regard, it has been demonstrated that natural or conditioned familiar-aversive stimulus produced significant increase of extracellular glutamate levels in NAcc (Saul'skaya and Marsden 1995; Saul'skaya and Mikhailova 2004). These results could be related with the glutamatergic pathways coming to the NAcc. Thus, the possible mechanism for the participation of NAcc in aversive taste learning is related to the interaction between the glutamate inputs to the NAcc, from the IC and the BLA. However, it does not rule out the possibility that there could be other brain systems participating in the aversive taste memory along with the NAcc circuit (see Figure 1).

Acknowledgements

This work was supported by IN 220706-03 and CONACYT 42657Q.

References

- Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G. 2002. Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. *J Neurosci* 22:4709–19.
- Bermudez-Rattoni F. 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5:209–17.
- Datla KP, RG, Young AMJ, Gray AJ, Josep MH. 2002. Conditioned appetitive stimulus increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat. *Eur J Neurosci* 16:1987–93.
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS. 1998. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res* 806:127–40.
- Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW. 1999. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann NY Acad Sci* 877:412–38.
- Fenu S, Bassareo V, Di Chiara G. 2001. A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J Neurosci* 21:6897–904.
- Fulwiler CE, Saper CB. 1984. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 319:229–59.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV. 1996. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res* 107:485–511.
- Gutierrez R, Rodriguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Nunez-Jaramillo L, Bermudez-Rattoni F. 2003a. Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 80:323–31.
- Gutierrez R, Tellez LA, Bermudez-Rattoni F. 2003b. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* 17:1556–62.
- Gutierrez R, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. 2004. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem* 11:95–101.
- Hajnal A, Norgren R. 2005. Taste pathways that mediate accumbens dopamine release by sapid sucrose. *Physiol Behav* 84:363–9.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. 1991. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89–125.
- Howland JG, Taepavarapruk P, Phillips AG. 2002. Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. *J Neurosci* 22:1137–45.
- Kelley AE, Domesick VB. 1982. The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7:2321–35.
- Kelley AE, Smith-Roe SL, Holahan MR. 1997. Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12174–9.
- Kelley AE, Swanson CJ. 1997. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res* 89:107–13.
- Lee RS, Koob GF, Henriksen SJ. 1998. Electrophysiological responses of nucleus accumbens neurons to novelty stimuli and exploratory behavior in the awake, unrestrained rat. *Brain Res* 799:317–22.
- Louilot A, Besson C. 2000. Specificity of amygdalostratial interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience* 96:73–82.
- Louilot A, Simon H, Taghzouti K, Le Moal M. 1985. Modulation of dopaminergic activity in the nucleus accumbens following facilitation or blockade of the dopaminergic transmission in the amygdala: a study by in vivo differential pulse voltammetry. *Brain Res* 346:141–5.
- Maldonado-Irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE. 1995. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 15:6779–88.
- Mark GP, Blander DS, Hoebel BG. 1991. A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res* 551:308–10.
- Mark GP, Weinberg JB, Rada PV, Hoebel BG. 1995. Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain Res* 688:184–8.
- Martinez G, Ropero C, Funes A, Flores E, Landa AI, Gargiulo PA. 2002. AP-7 into the nucleus accumbens disrupts acquisition but does not affect consolidation in a passive avoidance task. *Physiol Behav* 76:205–12.
- McDonald AJ. 1991. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* 44:1–14.
- Miranda MI, Bermudez-Rattoni F. 1999. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6478–82.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F. 2002. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11417–22.
- Neigh-McCandless G, Kravitz BA, Sarter M, Bruno JP. 2002. Stimulation of cortical acetylcholine release following blockade of ionotropic glutamate receptors in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 16:1259–66.
- Oades RD, Halliday GM. 1987. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117–65.

Apéndice

- Pennartz CM, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH. 1994. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol* 42:719–61.
- Rada P, Tucci S, Murzi E, Hernandez L. 1997. Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain Res* 768:338–40.
- Ramirez-Lugo L, Zavala-Vega S, Bermudez-Rattoni F. 2006. NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learn Mem* 13:45–51.
- Robinson TG, Beart PM. 1988. Excitant amino acid projections from rat amygdala and thalamus to nucleus accumbens. *Brain Res Bull* 20:467–71.
- Salamone JD. 1996. The behavioral neurochemistry of motivation: methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. *J Neurosci Methods* 64:137–49.
- Saulskaya N, Marsden CA. 1995. Extracellular glutamate in the nucleus accumbens during a conditioned emotional response in the rat. *Brain Res* 698:114–20.
- Saul'skaya NB, Mikhailova MO. 2003. The effects of motivational and emotional factors in glutamate release in the nucleus accumbens of the rat brain during food consumption. *Neurosci Behav Physiol* 33:151–6.
- Saul'skaya NB, Mikhailova MO. 2004. Increased glutamate release into the intercellular space of the nucleus accumbens (N. accumbens) during substitution of food reinforcement with aversive or neutral stimuli. *Neurosci Behav Physiol* 34:109–13.
- Saulskaya NB, Mikhailova MO. 2002. Feeding-induced decrease in extracellular glutamate level in the rat nucleus accumbens: dependence on glutamate uptake. *Neuroscience* 112:791–801.
- Setlow B. 1997. The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res* 49:515–21.
- Stratford TR, Kelley AE. 1997. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17:4434–40.
- Swank MW. 2000. Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning. *Neuroreport* 11:1625–30.
- Usuda I, Tanaka K, Chiba T. 1998. Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. *Brain Res* 797:73–93.
- Wright CI, Groenewegen HJ. 1996. Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 73:359–73.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N. 1994. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* 65:123–37.
- Yasoshima Y, Scott TR, Yamamoto T. 2006. Memory-dependent c-Fos expression in the nucleus accumbens and extended amygdala following the expression of a conditioned taste aversive in the rat. *Neuroscience* 141:35–45.
- Young AM, Joseph MH, Gray JA. 1993. Latent inhibition of conditioned dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 54:5–9.
- Young AM, Ahier RG, Upton RL, Joseph MH, Gray JA. 1998. Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat during associative learning of neutral stimuli. *Neuroscience* 83:1175–83.
- Zahm DS. 2000. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85–105.
- Zahm DS, Heimer L. 1990. Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 302:437–46.
- Zahm DS, Heimer L. 1993. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol* 327:220–32.

Accepted July 25, 2006

Bibliografía

- Anagnostaras S.G, et al (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J. Neurosci.* 19:1106-1114.
- Arnold HM, Nelson CL, Neigh GN, Sarter M, Bruno JP (2000) Systemic and intra-accumbens administration of amphetamine differentially affects cortical acetylcholine release. *Neuroscience* 96:675-685.
- Baddeley A (1999) *Memoria Humana. Teoría y práctica.* Madrid España.
- Bakin JS, Weinberger NM, (1996) Induction of a physiological memory in the cerebral cortex by stimulation of the nucleus basalis. *PNAS* 93:11219-11224
- Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414.
- Bermúdez-Rattoni F (1986) Neural integration of food habits. *Bol Estud Med Biol* 34:43-50.
- Bermúdez-Rattoni F (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5:209-217.
- Bielavska E, Miksik I, Krivanek J (2000) Glutamate in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion. *Brain Res* 887:413-417.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 338:255-278.
- Brundage JM, Williams JT (2002) Differential modulation of nucleus accumbens synapses. *J Neurophysiol* 88:142-151.
- Bures J, Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998) *Conditioned taste aversion : Memory of a special kind.* New York: Oxford University Press.
- Buresova O, Bures J (1980) Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats. *Behav Brain Res* 1:299-312.
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS (1998) Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res* 806:127-140.
- Everitt BJ, Robbins TW, Evenden JL, Marston HM, Jones GH, Sirkia TE (1987) The effects

of excitotoxic lesions of the substantia innominata, ventral and dorsal globus pallidus on the acquisition and retention of a conditional visual discrimination: implications for cholinergic hypotheses of learning and memory. *Neuroscience* 22:441-469.

Fenu S, Bassareo V, Di Chiara G (2001) A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J Neurosci* 21:6897-6904.

Ferreira G, Gutierrez 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. *Eur J Neurosci* 16:1139-1145.

Fulwiler CE, Saper CB (1984) Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 319:229-259.

Garcia y Robertson RG, J. (1984) *Cancer, Nutrition and eating behavior: A behavioral perspective*. New York.

Gerdjikov TV, Ross GM, Beninger RJ. (2004) Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by antagonists of ERK or p38 MAP kinases in rats. *Behav Neurosci* 111:180-187.

Grigson PS, Shimura T, Norgren R (1997) Brainstem lesions and gustatory function: III. The role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats. *Behav Neurosci* 118:740-750.

Grigson PS, Reilly S, Shimura T, Norgren R (1998) Ibotenic acid lesions of the parabrachial nucleus and conditioned taste aversion: further evidence for an associative deficit in rats. *Behav Neurosci* 112:160-171.

Groc, L., M. Heine, et al. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7:695-6.

Gutierrez R, Tellez LA, Bermúdez-Rattoni F (2003a) Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* 17:1556-1562.

Gutierrez R, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F (2004) Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem* 11:95-101.

Gutierrez R, Rodriguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Nunez-Jaramillo L, Bermúdez-Rattoni F (2003b) Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 80:323-331.

Hajnal A, Norgren R (2001) Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res* 904:76-84.

Hajnal A, Smith GP, Norgren R. (2004) Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Jan; 286:31-37.

Hajnal A, Norgren R (2005) Taste pathways that mediate accumbens dopamine release by sapid sucrose. *Physiol Behav* 84:363-369.

- Halsell CB. (1992) Organization of parabrachial nucleus efferents to the thalamus and amygdala in the golden hamster. *J Comp Neurol.* 317:52-78.
- Hernandez PJ, Sadeghian K, Kelley AE (2002) Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 5:1327-1331.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
- Ivkovich D, Thompson RF (1997) Motor cortex lesions do not affect learning or performance of the eyeblink response in rabbits. *Behav Neurosci* 111:727-738.
- Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T (1998a) Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem* 69:219-224.
- Izquierdo I, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T, Izquierdo, L, Medina, J (1998b) Mechanism for memory types differ. *Nature* 393:635-6.
- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, de David e Silva, T, Choi, H (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long- term memory. *Cell Mol Neurobiol* 22:269-287.
- Kelley AE, Domesick VB (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7:2321-2335.
- Kelley AE, Swanson CJ (1997) Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res* 89:107-113.
- Kilgard MP, Merzenich MM (1998) Plasticity of temporal information processing in the primary auditory cortex. *Nat Neurosci* 1:727-731.
- Kim, JJ., Fanselow, MS, DeCola, JP and Landeira-Fernandez, J (1992) Selective impairment of long term but not short term conditional fear by the N-Methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behav Neurosci* 106 4:591-596.
- Lee RS, Koob GF, Henriksen SJ (1998) Electrophysiological responses of nucleus accumbens neurons to novelty stimuli and exploratory behavior in the awake, unrestrained rat. *Brain Res* 799:317-322.
- Nong, Y., Y. Q. Huang, et al. (2004). NMDA receptors are involved in. *Curr Opin Neurobiol* 3:353-361.
- Maldonado-Irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE (1995) Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 15:6779-6788.
- Mark GP, Blander DS, Hoebel BG (1991) A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res* 551:308-310.

- Mark GP, Weinberg JB, Rada PV, Hoebel BG (1995) Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain Res* 688:184-188.
- Martinez G, Ropero C, Funes A, Flores E, Landa AI, Gargiulo PA (2002) AP-7 into the nucleus accumbens disrupts acquisition but does not affect consolidation in a passive avoidance task. *Physiol Behav* 76:205-212.
- McGaugh JL (2000) Memory—a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- Meredith, G.E., Blank, B., and Groenewegen, HJ. (1989) The distribution and compartmental organization of the cholinergic neurons in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*, 31:327-345.
- Mesulam MM (1990) Human brain cholinergic pathways. *Prog Brain Res* 84:231-241.
- Mesulam MM, Rosen AD, Mufson EJ (1984) Regional variations in cortical cholinergic innervation: chemoarchitectonics of acetylcholinesterase-containing fibers in the macaque brain. *Brain Res* 311:245-258.
- Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F (1999) Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6478-6482.
- Miranda MI, Ramirez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 882:230-235.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11417-11422.
- Morris GM, Kandel ER, Squire, LR (1988) *The Neuroscience of learning and memory: cells, neural circuits and behavior*. *TINS* 11:125-127.
- Oades, RD, Halliday, GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.
- Pennartz CM, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH (1994) The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol* 42:719-761.
- Rada P, Tucci S, Murzi E, Hernandez L (1997) Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain Res* 768:338-340.
- Ramirez-Lugo L, Zavala-Vega S, Bermúdez-Rattoni F (2006) NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learn Mem* 13:45-51.
- Reilly S (1999) The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res Bull* 48:239-254.
- Robinson TE, Kolb B (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and

- prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17:8491-8497.
- . Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39:257-266.
- Routtenberg A, and Rekart JL (2005) Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *TRENDS Neurosciences* 28:15-19.
- Rosenblum K, Berman DE, 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. *J Neurosci* 17:5129-5135.
- Rosenblum K, Meire N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neurosci* 59:49-56.
- Sakai N, Yamamoto T (1999) Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion. *Neurosci Res* 35:53-61.
- Sargolini F, Roullet P, Oliverio A, Mele A (2003) Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice. *Behav Brain Res* 138:153-163.
- Sarter M, Bruno JP, Turchi J (1999) Basal forebrain afferent projections modulating cortical acetylcholine, attention, and implications for neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 877:368-382.
- Saul'skaya NB, Mikhailova MO (2003) The effects of motivational and emotional factors in glutamate release in the nucleus accumbens of the rat brain during food consumption. *Neurosci Behav Physiol* 33:151-156.
- Sederholm F, Johnson AE, Brodin U, Sodersten P (2002) Dopamine D(2) receptors and ingestive behavior: brainstem mediates inhibition of intraoral intake and accumbens mediates aversive taste behavior in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160:161-169.
- Setlow B (1997) The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res* 49:515-521.
- Squire LK, ER (2000) *Memory. From Mind to molecules.* New York.
- Stevenson CW, Gratton A (2003) Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 17:1287-1295.
- Stratford TR, Kelley AE (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17:4434-4440.
- Thompson RF (2005) In search of memory traces. *Annu Rev Psychol* 56:1-23.
- Usiello A, Sargolini F, Roullet P, Ammassari-Teule M, Passino E, Oliverio A, Mele A (1998) N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens are involved in detection of spatial novelty in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 137:175-183.
- Vales, K, Zach, P, Bielavska, E (2006) Metabotropic glutamate receptor antagonist but not

- NMDA antagonist affect conditioned taste aversion acquisition in the parabrachial nucleus of rats. *Ezp Brain Res* 169 1:50-57.
- Woolf NJ (1996) The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis. *Neurobiol Learn Mem* 66:258-266.
- Wolf ME (2002) Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv* 2:146-157.
- Wright CI, Groenewegen HJ (1996) Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 73:359-373.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* 65:123-137.
- Young AM, Joseph MH, Gray JA (1993) Latent inhibition of conditioned dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 54:5-9.
- Young AM, Ahier RG, Upton RL, Joseph MH, Gray JA (1998) Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat during associative learning of neutral stimuli. *Neuroscience* 83:1175-1183.
- Zach, P, Krivanek J, Vales, K (2006) Serotonin and dopamine in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion learning. *Behav Brain Res*
- Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85-105.
- Zahm DS, Heimer L (1993) Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol* 327:220-232.