



FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES PARA HISTAMINA EN EL NÚCLEO BASAL  
MAGNOCELULAR Y EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA FORMACIÓN  
DE LA MEMORIA AL SABOR

Lic. Liliana Purón Sierra

Entidad Académica, Instituto de Neurobiología  
Universidad Autónoma de México

Tesis que presenta la pasante Liliana Purón Sierra, como requisito para obtener el grado  
de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Director de Tesis: Dra. María Isabel Miranda Saucedo

Campus Jurquilla, Querétaro Agosto 2008



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.

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del jurado de examen de grado certificamos que la tesis elaborada por Liliana Purón Sierra, cuyo título es "Función de los receptores para histamina en el núcleo basal magnocelular y la corteza insular durante la formación de la memoria al sabor", se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de maestría en ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por el reglamento general de estudios de posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda \_\_\_\_\_

Secretario (tutor)

Dra. María Isabel Miranda Saucedo \_\_\_\_\_

Vocal

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez \_\_\_\_\_

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz \_\_\_\_\_

Suplente

Dra. Magdalena Giordano Noyola \_\_\_\_\_

Aprobado por el comité académico

---

Dra. María Teresa Morales Guzmán  
Coordinador del programa

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Isabel Miranda Saucedo por toda la confianza depositada en mi y por todo el respaldo profesional que me ha brindado, por todas las facilidades para la realización de esta tesis, pero sobre todo por su sincera amistad y por ser la mejor de las tutoras.

A la Dra. Magda Giordano, por todo el apoyo, consejos en la realización de este trabajo y por todas sus enseñanzas en el área de estadística.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme el apoyo económico durante la realización de esta maestría. CONACyT 46161M y 41754Q, CONACyT 54524, DGAPA ó PAPIIT IN201308. Becario No. 208245

A la M.C. Mireya Romero, por el apoyo brindado durante la realización de los experimentos. Por ayudarme a entender parte de la química orgánica. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio Elizabeth, Frank, Dafne, Nadia, Julián y Doña Cipri por los momentos compartidos.

A la Químico Leonor Casanova, por la paciencia y ayuda para realizar los trámites necesarios para cumplir con esta meta.

Al personal de la Biblioteca en especial a Pilar Galarza Barrio y Rafael Silva Cruz por su disponibilidad y amabilidad en todo momento, así como el buen servicio que brindan.

Al M.V.Z. Martín García Servín por facilitarnos los animales para la realización de esta tesis.

## **DEDICATORIAS:**

A mi esposo Ernesto, por su gran apoyo incondicional que siempre me da, por su amistad, consejos, por el gran amor que me tiene, mil gracias compañero de mi vida.

A Larissa y Lía, por los momentos que siempre me dan, sus sonrisas y peripecias que me hacen olvidar los momentos tensionantes, dedicaré más tiempo a ustedes.

A mi hermana Ana, mi única gran amiga, mi apoyo moral y espiritual, la que da sin condiciones eres una gran persona muchas gracias por todo.

A mis padres Raquel Sierra y J. Ascensión Purón, por el apoyo que me prestaron cuando Lía se desarrollaba y en los momentos difíciles.

A mi compañera y amiga Elizabeth, por todo el apoyo que me brindó en mis dudas, eres un gran apoyo intelectual, sin ti la maestría no hubiera sido lo mismo, muchas gracias por todo.

## RESUMEN

El condicionamiento de aversión al sabor (CAS) es uno de los modelos donde se ha demostrado que la liberación de acetilcolina (ACh) en la corteza insular (CI) es necesaria durante la formación de la memoria. Los niveles de ACh durante la adquisición y la evocación del CAS, provienen de la actividad del núcleo basal magnocelular (NBM). Sin embargo, la regulación de la actividad colinérgica en la CI, durante la formación de este tipo de memorias aún no se conoce. Existe evidencia de que la liberación ACh en la corteza durante la adquisición de ciertos condicionamientos podría estar siendo regulada mediante los receptores histaminérgicos. Los objetivos de estudio durante la maestría, determinaron la función y participación de los receptores para histamina  $H_1$  en el NBM y  $H_3$  en la CI, durante la adquisición y la evocación del CAS. Para ello se utilizaron ratas macho (Sprague-Dawley), las cuales fueron canuladas bilateralmente en ambas estructuras. En el NBM a un grupo se le administró solución salina y a otro un antagonista del receptor  $H_1$ , pirilamina (100  $\mu$ M), 20 minutos antes de la adquisición del CAS. Adicionalmente a otros grupos canulados en la CI se les administró solución salina y R- $\alpha$ -metilhistamina (RAMH 10 $\mu$ M), un agonista del receptor  $H_3$ , 20 minutos antes de la adquisición del CAS. Los resultados obtenidos mostraron que tanto la pirilamina en el NBM como el RAMH en CI, impidieron la adquisición y consolidación del CAS. Esto sugiere que los receptores para histamina  $H_1$  y  $H_3$  se encuentran involucrados en la formación de la memoria gustativa.

## ABSTRACT

One of the most useful models to study the substrates of learning and memory is the conditioned taste aversion (CTA). During the acquisition of CTA, a significant increase in acetylcholine (ACh) has been found in the insular cortex (IC), and this increase correlates directly with the recognition of the novelty of the taste and decreases as the taste becomes familiar. Some data suggest that histamine could regulate the cholinergic system during the acquisition of associative tasks; this action could be mediated through the activation of its receptors, which are located in cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis (NBM) and throughout the cortex. The objective of this work was to determine the function of the receptors  $H_1$  in the NBM and the receptors  $H_3$  in the IC during CTA acquisition and memory retrieval of CAS. Male rats (Sprague-Dawley) were cannulated bilaterally in the NBM and the IC. One group of animals received in the NBM a saline solution or pyrilamine, the antagonist of the receptor  $H_1$  (100  $\mu$ M), 20 minutes before the consumption of saccharine (0.1%). Another group of animals was administered in the IC with saline solution or  $H_3$ , R- $\alpha$ -methylhistamine (RAMH) the antagonist of the receptor  $H_3$  (10  $\mu$ M), 20 minutes before the presentation of saccharine. The results obtained showed that both the pyrilamine in the NBM as the RAMH in IC, inhibit the acquisition and consolidation of the CAS. This suggests that the receptors for histamine  $H_1$  and  $H_3$  located in the NBM and IC respectively, are involved in the formation of taste memory and could differentially regulate novel taste recognition.



<b>VII. RESULTADOS</b>	í ..	<b>39</b>
<b>A. Efectos de la pirilamina en el NBM</b>	í í í í í í í í í í í í ..	<b>39</b>
<b>a - Antes de la adquisición del CAS</b>	í í .....	<b>39</b>
<b>b - Antes de la prueba del CAS</b>	í í í í í í í í í í í í í .....	<b>40</b>
<b>B. Efectos del RAMH en CI</b>	í í í í í í í í í í í í í í í í ..	<b>42</b>
<b>a - Antes de la adquisición del CAS</b>	í í í í í í í í í í í í ..	<b>42</b>
<b>b - Antes de la prueba del CAS</b>	í í í í í í í í í í í í í í ..	<b>43</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	í í í í í í í í í í í í í í í í í í í .....	<b>44</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	í í í í .í í í í í í í í í í í í í í í ..	<b>48</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	í .	<b>49</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	í .....	<b>50</b>
<b>XI. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	í í í í í í í í í í í í í í í í í í .....	<b>62</b>
<b>XII. ABREVIATURAS</b>	í í í í í í í í í í í í í í í í í í .....	<b>63</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La supervivencia de un organismo depende de la habilidad para aprender, almacenar y recordar diferentes tipos de información adquirida a través de su experiencia. Esta información permite la adaptación de los organismos a cambios en las condiciones ambientales a los que pueden estar expuestos. Siendo capaces de modificar su conducta ante situaciones relevantes a las que estuvieron expuestos. El conocimiento aprendido es almacenado a manera de representaciones internas conformadas por cambios en el sistema nervioso, mismas que se encontrarán disponibles para ser utilizadas posteriormente, a esto se le conoce como memoria (Dudai, 1989).

Los mecanismos que subyacen al almacenamiento de la información son poco conocidos, por lo que actualmente representa uno de los objetivos fundamentales de la investigación en neurociencias. De aquí, el hecho de que existe un número creciente de estudios realizados con animales y humanos para tratar de caracterizar y clasificar los diferentes tipos de memoria.

Uno de los primeros estudios realizados en el siglo pasado, fueron aquellos hechos por Karl Lashley (1890-1958), quién trató de determinar en qué regiones cerebrales podrían almacenarse la memoria. Por medio de lesiones progresivas en la corteza cerebral de ratas, descubrió que lo necesario para un buen aprendizaje, era la cantidad de tejido cortical no lesionado más que su localización. Es decir que las áreas corticales son equiparables para el aprendizaje, ya que según sea el tamaño de la lesión se disminuye proporcionalmente el aprendizaje. Los resultados de Lashley otorgaron la primera evidencia de que la memoria de muchos tipos de aprendizaje no se encuentra localizada en una región particular del cerebro.

También los estudios realizados en 1900, por Müller y Pilzecker trataron de explicar los procesos por los cuales una memoria de corto plazo se convierte en memoria de largo plazo y experimentalmente se propusieron las leyes que gobiernan la formación y evocación de la memoria y crearon el concepto de "Konsolidierung" (consolidación). Concluyendo que, la fijación de la memoria requiere de tiempo (consolidación) para convertirse en memoria a largo plazo y que la memoria es vulnerable durante el período de consolidación.

Otros estudios importantes que han ayudado a explicar el aprendizaje y la memoria, fueron realizados por Iván P. Pavlov, quién al realizar estudios acerca de la fisiología digestiva y reflejos gástricos, observó por casualidad y por su agudo sentido de observación en perros hambrientos, que la sola presencia de la carne (consecutivamente denominado estímulo incondicionado (EI)) provocaba una respuesta refleja como la salivación (respuesta incondicionada (RI)). Posteriormente le presentó al perro la carne acompañada del sonido de una campana (estímulo neutro luego llamado estímulo condicionado (EC)) en repetidas ocasiones hasta que llegaba un momento en que la sola presentación del sonido de la campana (EC) en ausencia de la carne inducía la salivación del animal (respuesta condicionada (RC)). Estos estudios conductuales recibieron el nombre de condicionamiento clásico o condicionamiento Pavloviano (Bermúdez-Rattoni et al., 2001). Con esta demostración experimental se sentaron las bases para el estudio de las leyes del aprendizaje asociativo en el laboratorio, lo que a su vez facilitó el estudio de la memoria.

En la actualidad se sabe que existen diferentes tipos de memoria de acuerdo a la manera en que se aprende y que no se encuentran ubicados en alguna estructura del cerebro en particular (Sweatt, 2003). Los estudios en humanos con diferentes tareas sirvieron de base para realizar una clasificación de la memoria: memoria declarativa o explícita y memoria no declarativa o implícita, como se muestra en la Figura 1.

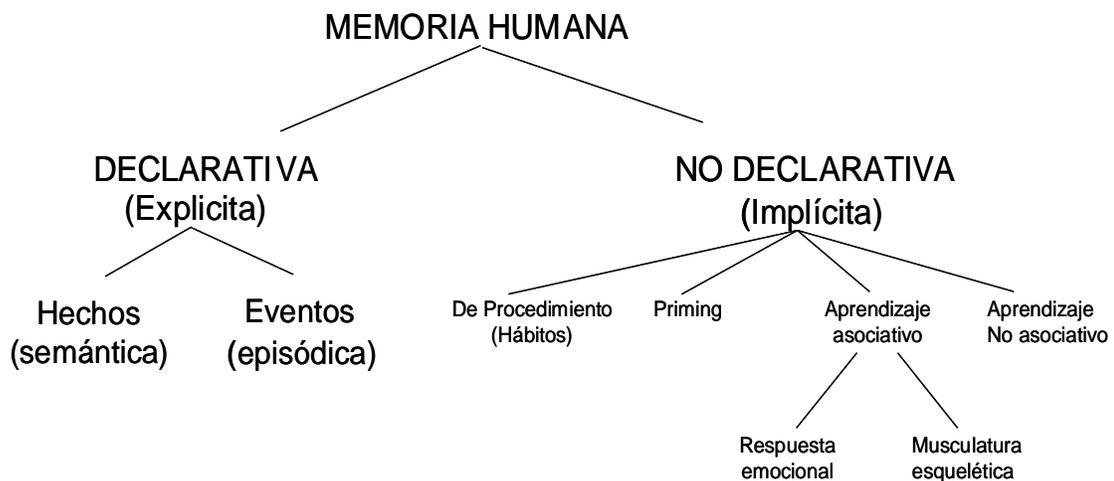


Figura 1. Clasificación de la memoria humana. Según Squire se encuentra dividida en dos clases: declarativa y no declarativa, pero también es conocida como memoria explícita e implícita según Tulving (modificado de Sweatt, 2003).

Una diferencia importante entre estos dos tipos de memoria radica en su método de medición. Para la memoria declarativa se utilizan pruebas de medición explícitas, que hacen referencia a aquellas que requieren de un recuerdo explícito de la información. La memoria declarativa se divide en memoria de hechos y de eventos, ambas se forman rápidamente a partir de acontecimientos o diversas situaciones. La memoria de hechos se forma a partir de los eventos mundiales que se registran a manera de conocimientos enciclopédicos, como la fecha de un descubrimiento importante, el nacimiento de Bach, el inicio de la primera guerra mundial etc. Por su parte la memoria de eventos se considera como una memoria autobiográfica que se forma a través de los eventos sociales que ocurren en la vida del sujeto. Por ejemplo el nacimiento de un hijo, la fecha en que se graduó, cuando compró su primer carro, etc (Bermúdez-Rattoni et al., 2001).

En general, en la memoria declarativa se adquiere información rápidamente y ésta permanece accesible al recuerdo o evocación consciente del sujeto. Además es flexible y disponible a múltiples sistemas de respuesta. Esta clase de memoria depende de factores como la atención, motivación y el nivel de entendimiento del sujeto; siendo actualmente un modelo casi exclusivo para el estudio de la memoria humana pues los animales no son capaces de relatar los factores que intervinieron para que recordaran esa información.

Para la memoria no declarativa se utilizan pruebas de medición de tipo implícitas, es decir aquellas en las que la experiencia altera la conducta inconscientemente sin proveer acceso a ningún contenido nemónico. Esta memoria se divide en cuatro subsistemas que son el de las habilidades y hábitos, el de *priming*, el de aprendizajes asociativos básicos, que se subdivide a su vez en las respuestas emocionales y musculares y el de aprendizajes no asociativos. Cada uno de estos sistemas se relaciona con sustratos neuronales independientes, siendo necesarias para la formación de las memorias varias estructuras y vías reflejas.

La memoria no declarativa no tiene acceso al recuerdo consciente, es poco flexible y provee de un acceso muy limitado a sistemas de respuesta que no estuvieron involucrados durante el aprendizaje original. En esta clase de memoria el sujeto es capaz de distinguir los efectos de la estimulación ambiental al cual fue expuesto previamente y una vez que se adquiere esta memoria se utiliza para procedimientos específicos y se puede almacenar como hábitos (Bermudez-Rattoni et al., 2001).

Esta memoria podría estar presente en los animales, en el momento en que aprenden a responder a los distintos estímulos ambientales que se les presenta, aunque ningún tipo de memoria humana puede considerarse equivalente a la que muestra un animal. Por ejemplo la memoria gustativa formada a partir del modelo del condicionamiento de aversión al sabor (CAS), podría considerarse una memoria implícita con componentes de tipo episódico. Ya que los animales son capaces de asociar dos estímulos (sabor novedoso-malestar) y evocar posteriormente una respuesta aversiva en una segunda presentación a este sabor (reconocimiento del sabor aversivo), debido a la asociación con el componente nocivo (Bures et al., 1998).

En este aprendizaje asociativo, el animal aprende a predecir y valorar un estímulo asociado a otro, lo que da pie a la sobrevivencia del animal en cualquier ambiente ya que es capaz de relacionar la causa y el efecto de los sucesos ambientales, favoreciendo la formación de una memoria, que se almacena junto con las representaciones internas para tenerlos disponibles en situaciones futuras (Sweatt, 2003).

Una característica de esta clasificación de la memoria humana (Sweatt, 2003), es que las memorias se pueden almacenar tanto a corto como a largo plazo. Esto depende, en la gran mayoría de los casos, del número de veces en que se presenta un estímulo y del intervalo entre éste y uno nuevo, así como de la experiencia del ambiente que adquiera el sujeto.

En las últimas décadas ha habido avances significativos que apuntalan varios componentes en la caracterización de los procesos fisiológicos de la memoria. Los descubrimientos obtenidos en animales y humanos señalan que existen estructuras cerebrales heterogéneas y que son el sustrato de diferentes formas de memoria, por ello

estas estructuras podrían considerarse como componentes básicos de sistemas de memoria (Dudai, 1989).

Una manera de estudiar la participación de las estructuras es mediante estudios de farmacología en la memoria. Esta técnica es relativamente un nuevo campo de estudio que ha logrado identificar una diversidad de mensajeros químicos como la acetilcolina (ACh), el glutamato y la noradrenalina, entre otros, que se encuentran presentes en las vías neurales de los sistemas de memoria y que son necesarios para que se consolide la información. Estos estudios han permitido un progreso en el entendimiento de la función de los sistemas de neurotransmisión implicados en la sinapsis e integración neuronal dentro de los amplios circuitos del cerebro anterior (Iversen, 1998). Los datos obtenidos de estos estudios fueron probados en modelos conductuales asociativos, para mostrar una relación entre la conducta y los sistemas de neurotransmisión, comprobando que la comunicación química en la sinapsis es vital para los procesos de almacenamiento de información que desencadenan finalmente las representaciones internas que conforman la memoria.

Actualmente el aprendizaje se considera como una consecuencia de determinado evento o experiencia, para que se logre la memoria se necesita de la adquisición/aprendizaje y de la consolidación/retención de esa información. Estas etapas o fases son temas de estudio que deben de tratarse como procesos independientes dentro del gran proceso de la formación de la memoria (Sweatt, 2003); el estudio independiente de estos procesos ha servido y sirve de base para tratar de comprender cuáles son los mecanismos que actúan durante el aprendizaje que genera una memoria permanente.

El descubrimiento de los mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo en el sistema nervioso central (SNC) durante el aprendizaje de una tarea, lograron establecer los circuitos que se activan durante la formación y expresión de la memoria. La información sobre estos mecanismos con la que se cuenta hasta ahora, se ha obtenido gracias a la experimentación con modelos conductuales durante la adquisición, la consolidación y la evocación de diferentes tipos de memorias (Sweatt, 2003).

En este sentido, algunos de los modelos más usados para el estudio de aprendizajes asociativos, son el condicionamiento al miedo y el CAS. Donde los animales aprenden a

distinguir y asociar un estímulo neutral condicionado con un estímulo aversivo incondicionado. Ambos son ejemplos del condicionamiento clásico pavloviano y describen la formación de memorias a largo plazo (Sweatt, 2003).

En el presente trabajo se presentará la información más relevante sobre los sistemas de neurotransmisión involucrados durante el CAS, así como de otros modelos asociativos que se han usado para el estudio de otros tipos de memoria.

## **II. ANTECEDENTES**

### **A. El modelo: condicionamiento de aversión al sabor**

El condicionamiento de aversión al sabor es un paradigma robusto y sencillo por medio del cual los animales adquieren aversión a un determinado sabor cuando éste es seguido por un malestar gástrico. Es un ejemplo notable del aprendizaje aplicado a la supervivencia de las especies que permite la asociación entre los estímulos relacionados con los alimentos y la retroalimentación visceral que sigue de su ingestión, la cual determinará en gran parte la futura conducta consumatoria. Este proceso permite a los animales asociar sabores arbitrarios con los efectos nutritivos o tóxicos después de que éstos han sido ingeridos, de modo que en el futuro puedan distinguirlos.

Actualmente, el CAS es utilizado de manera amplia para estudiar los procesos de formación de la memoria, ya que presenta varias ventajas sobre otros paradigmas, entre ellas están:

- El amplio y casi total conocimiento de las estructuras cerebrales involucradas en este tipo de aprendizaje.
- La posibilidad de reconocer apropiadamente las diferentes etapas de la formación de la memoria: adquisición, consolidación y evocación.
- También presenta una rápida adquisición (un solo ensayo/presentación) que permite la correlación entre los eventos moleculares y celulares del aprendizaje.

En este condicionamiento el intervalo inter-estímulos, que se da entre el sabor novedoso y el malestar gástrico puede ser de hasta 2 horas. La separación entre los dos estímulos permite conocer los mecanismos de adquisición de la información del sabor y aquellos mecanismos utilizados en la asociación de los estímulos. Lo que sugiere que mientras se da la asociación del sabor novedoso con el malestar gástrico se llevan a cabo eventos celulares y bioquímicos para la formación de una memoria a largo plazo (Bures et al., 1998).

## **B. Estructuras involucradas en el CAS**

Actualmente se encuentran bien descritas las estructuras y las rutas neurales encargadas de la conducción de la información adquirida durante el CAS.

El aprendizaje de un sabor comienza con la transmisión de la señal química captada por los receptores periféricos situados en las papilas gustativas. La activación de estos receptores conduce la información a través de los nervios craneales facial (VII) y glossofaríngeo (IX) llegando al tracto del núcleo solitario (NTS) del tallo cerebral (que es el primer relevo en el SNC), con proyección hacia el área postrema (Bures et al., 1998).

Por otra parte la información de la irritación gastrointestinal es conducida por el nervio vago (X), hacia el NTS que proyecta al núcleo parabraquial (PBN), el cual se activa tanto por la estimulación gustativa como por la visceral (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998). El núcleo talámico ventral posteromedial (VPM) recibe la información bilateral del PBN, como relevo sináptico de la ruta ascendente hacia el área gustativa de la Corteza Insular (CI) (Bures et al., 1998).

Asimismo, los axones del PBN inervan en su porción ventral al tálamo y viajan hacia el hipotálamo lateral, que envía terminales hacia la amígdala y al núcleo de la estría terminal (Bures et al., 1998) (Figura 2).

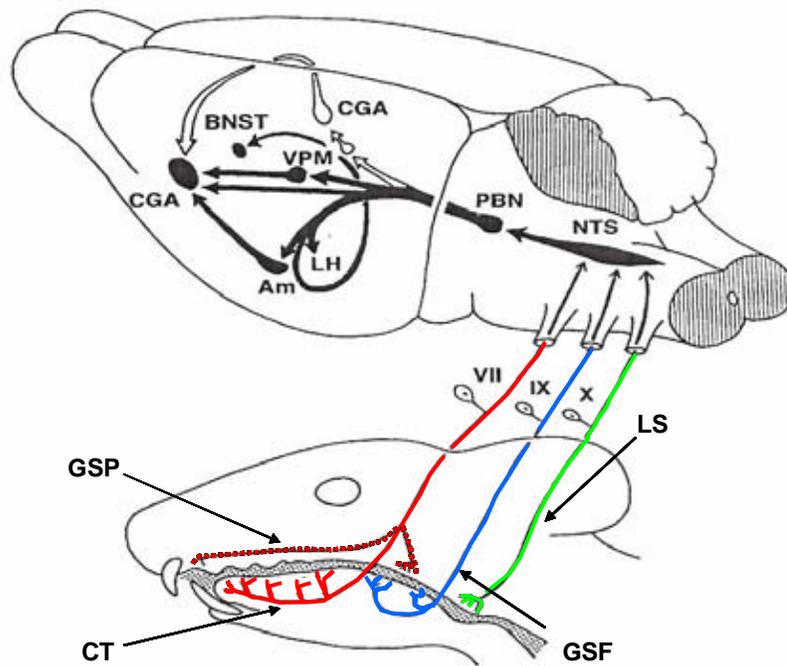


Figura 2. Rutas de proyección gustativa en la rata. El nervio VII (facial) inerva la cuerda del tímpano (CT) y la rama petrosa del nervio petroso (GSP); el nervio IX (glossofaríngeo); el nervio X (vago) inerva el tercio posterior de la lengua o laringe superior (LS); tracto del núcleo solitario (NTS); núcleo parabraquial PBN; núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM); área gustativa cortical insular (CGA); núcleo de lecho de la estría terminal (BNST); hipotálamo lateral (LH); amígdala (Am) proyecciones ipsilaterales en negro y contralaterales en blanco (modificado de Bures et al., 1998).

Dentro de la formación de la memoria gustativa existen varias estructuras que han sido relacionadas con esta función, entre éstas se encuentran: el lóbulo frontal, temporal, el tálamo (principalmente los núcleos anterior y dorsomedial), el cíngulo, los ganglios basales, el hipocampo, la amígdala, los cuerpos mamilares, los núcleos del *septum* y la corteza entorrinal. Además la CI ha mostrado una participación fundamental en cuanto a los procesos de aprendizaje relacionados con las reacciones viscerales por lo que también se le ha llamado corteza visceral (Bures et al., 1998).

## **a - Corteza Insular**

En la década de los 70 se estableció la función de la CI durante la formación del CAS, a partir de entonces numerosos experimentos han mostrado que lesiones de la CI realizadas antes o después de la adquisición del CAS impiden su aprendizaje y evocación. Es importante señalar que las lesiones de esta corteza, sólo obstruyen la representación mnemónica del gusto y sus consecuencias gastrointestinales, pero no producen deterioros en la sensibilidad/percepción gustativa o alteraciones en la información proveniente del tracto intestinal, lo que permite establecer que la CI es la región donde se lleva a cabo la integración de los estímulos involucrados en el CAS (Rosenblum et al., 1993). En algunos estudios se mostró que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas en la CI (pero no en las cortezas adyacentes), exclusivamente durante la ventana de tiempo de exposición al nuevo sabor para lograr un CAS, se bloquea la expresión de la memoria de este condicionamiento, durante el día de la prueba (Rosenblum et al., 1993).

## **b - Localización de la CI**

La CI en la rata se encuentra en el lóbulo temporal (áreas 13 y 14) y se ha relacionado con la adquisición y almacenaje de tareas aversivas, tal como la aversión a los sabores y la evitación inhibitoria. La CI comprende el área que va desde la corteza frontal lateral y la corteza perirrinal en dirección rostrocaudal y en la porción más ventral de la corteza somatosensorial a la corteza piriforme en la dirección dorsoventral. Las aferencias de la CI provienen principalmente del sistema límbico y son de gran relevancia para los procesos asociativos, de entre estas estructuras resaltan la amígdala, el núcleo dorso medial del tálamo y la corteza prefrontal. El papel que desempeña la amígdala es de singular importancia ya que se ha encontrado que contribuye con la información cognitiva relacionada con procesos emocionales y de motivación debido a las proyecciones de la CI con esta estructura (Ghaem et al., 1997).

Con respecto a las porciones anterior y posterior que conforman la CI, se sabe que éstas son áreas corticales del gusto y áreas sensoriales viscerales, respectivamente (Yamamoto et al., 1980b; Cechetto y Saper, 1987a, b; Ogawa et al., 1990). Se ha reportado que las neuronas en la CI posterior responden a estímulos gustativos,

viscerales y nociceptivos (Hanamori et al., 1997, 1998a, b). Sin embargo, las funciones y las conexiones neuronales en la CI todavía no están descritas en su totalidad. Algunos estudios electrofisiológicos han demostrado que la estimulación eléctrica de la CI tiene un efecto (principalmente inhibitorio) sobre la actividad neuronal en el núcleo talámico del gusto (Yamamoto et al., 1980a; Ogawa y Nomura, 1988).

En la organización de la CI se identifican tres capas: la granular, la disgranular y la agranular. La capa agranular se llama así por estar carente de células de gránulo. Está conectada con la corteza orbitofrontal intermedia y también recibe proyecciones del cíngulo y del lóbulo temporal intermedio. Esta capa se encuentra relacionada con reforzadores primarios del olor, tanto en seres humanos como en animales (Dade et al., 2002). También se relaciona con la quimiorrecepción avanzada, que modula la asociación de estados del comportamiento de ingesta y evitación de ambientes o alimentos nocivos.

La CI agranular rostral (CIAR), la corteza orbital ventrolateral, la corteza prefrontal intermedia y el núcleo accumbens pertenecen a los circuitos ventrales del cerebro anterior basal (CAB) (partes mesolímbicas/mesocorticales) que están implicados en el comportamiento ante el dolor, la cognición, la motivación y el estado de ánimo (Burkey et al., 1996, 1999; Suhara et al., 1992; Watanabe et al., 1997; Goldman y Rakic, 1998). En todas estas áreas, se ha visto que la dopamina y el ácido- -aminobutírico (GABA), desempeñan un papel modulador en la actividad neuronal espontánea y en la corteza frontal y esta evidencia apoya la idea de que esta inhibición es mediada por las neuronas GABAérgicas (Mora et al., 1976; Penit-Soria et al., 1987; Godbout et al., 1991; Pirot et al., 1992; Gorelova et al., 2002).

Los tipos neuronales de la CIAR, lo forman neuronas piramidales grandes en la capa V, que poseen receptores GABAérgicos (Margeta-Mitrovic et al., 1999), aunque es probable que sean neuronas de proyección, no hay información sobre cuál pudiera ser el blanco. Las áreas que reciben aferentes de la región rostral agranular incluyen los núcleos talámicos intermedios, el hipotálamo lateral, el área tegmental ventral, la corteza del cíngulo, la corteza prefrontal intermedia, el área parabraquial lateral, el núcleo *accumbens* y la amígdala (Leonard, 1969 ; Krettek y Price 1977a,b; Gerfen y Clavier, 1979).

La capa agranular anterior de la ínsula, proyecta principalmente en áreas anteriores del cíngulo, a la corteza del entorrinal, a la parte ventromedial del *striatum* ventral y a la corteza del periamigdalóide. De igual forma, recibe aferencias de la corteza entorrinal, del estriado ventral intermedio y también del área hipotalámica lateral y del núcleo mediodorsal del tálamo (Allen et al., 1991; Hurley et al., 1991; Petrovich et al., 1996).

La porción disgranular se relaciona con tareas que requieren control ejecutivo de la atención, incluyendo los que requieren manipulación de la información en la memoria de trabajo (Wager y Smith, 2003) respuestas inhibitorias y la atención (Bures et al., 1998). Asimismo, en la CI se reciben entradas de los sistemas sensoriales y de los receptores homeostáticos de osmolaridad hidroelectrolítica y baroreceptores. Esta red de entradas involucra al NTS, al PBN y VPM (Bures et al., 1998)

La parte central de la CI es también disgranular y se encuentra conectada sobre todo con áreas vecinas de esta corteza. En humanos se sabe que el banco superior de la ínsula posterior contiene la corteza sensorial primaria para el dolor (Craig, 2002, 2003; Craig et al., 2000).

Las aferencias de la capa granular posterior proyecta fibras eferentes a la corteza frontal, a la corteza temporopolar, al área somatosensorial secundaria, al estriado dorsolateral y al área retro-insular. En el cerebro humano, esta región recibe proyecciones aferentes de la corteza somatosensorial primaria, el área retro-insular, el surco temporal superior, el estriado dorsolateral, el núcleo lateral de la parte basolateral del cuerpo amigdalóide y la porción ventral del tálamo y la corteza del entorrinal (Berman et al., 2001).

Existe una conexión directa y recíproca entre la amígdala basolateral (BLA) y la CI (Dunn y Everitt, 1988; Shi y Cassell, 1998a; Sripanidkulchai et al., 1984); pues se sabe que la estimulación de la BLA afecta la respuesta de las neuronas de la CI (Yamamoto et al., 1984). Lo anterior sustenta que las interacciones de la BLA y la CI son importantes durante la formación de la memoria del CAS (Bures et al., 1998; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

En este sentido, se ha demostrado que la CI se encuentra involucrada en procesos de aprendizaje y reconocimiento de eventos o estímulos aversivos (Everitt y Robbins,

1997; Wenk, 1997), así como en la codificación y asociación de los aspectos relacionados con el sabor (Braun et al., 1981). También se sabe que la CI recibe importantes proyecciones del Núcleo Basal Magnocelular (NBM) (Mesulam et al., 1986) que son cruciales para la adquisición y consolidación del CAS (Miranda et al., 1999).

### **C. Neuroquímica y farmacología del CAS**

De acuerdo a la información anterior, el modelo de CAS ha sido un modelo asociativo, sencillo de utilizar que dio a conocer las distintas estructuras implicadas en el aprendizaje de esta tarea. Además ha servido de base para estudios bioquímicos sobre la participación de los sistemas de neurotransmisión implicados en la formación de la memoria gustativa.

Experimentalmente se han encontrado la participación de varios neurotransmisores como la noradrenalina que se libera desde la BLA, al momento de la novedad como en el reconocimiento de la experiencia aversiva. El bloqueo de la BLA con tetradotoxina, (TTX, bloqueador selectivo de los canales de sodio dependientes de voltaje que actúa cerca de 4 horas (Zhuravin y Bures, 1999), (Miranda et al., 2004) o de un agonista  $\alpha$ -adrenérgico como el propranolol (Miranda et al., 2003), después del estímulo gustativo o antes de la presentación del estímulo visceral, interrumpe la formación del CAS, indicando que la noradrenalina en la BLA es indispensable para procesar los estímulos viscerales (Ferreira et al., 2005).

Adicionalmente, se ha descrito un incremento de glutamato en la BLA y en la CI durante la entrada de un estímulo visceral (Miranda y Bermúdez-Rattoni, 1999; Miranda et al., 2002), lo que sugiere que la actividad glutamatérgica en la CI podría estar mediada por estructuras como la BLA.

También se conoce que se requiere de la actividad completa del NBM (Miranda y Bermúdez-Rattoni, 1999), para procesar la información procedente de los estímulos en la CI. Experimentos de bloqueo temporal del NBM por medio de TTX, durante la adquisición y evocación del CAS, encontraron que existe un decremento en la

liberación de ACh en la CI, lo que tuvo como consecuencia la incapacidad de adquirir el CAS (Figura 3).

De la misma manera, otros estudios comprobaron que es necesaria la actividad del NBM durante la adquisición del CAS, pues la destrucción de éste núcleo causado por neurotoxicidad irreversible impidió la adquisición del CAS; es decir, los animales entrenados en este paradigma no fueron capaces de asociar el sabor novedoso con el malestar gástrico, sugiriendo que esto ocurrió debido que la liberación de ACh cortical estaba ausente después de la lesión (López-García et al., 1993).

En conjunto, estos datos sugieren que la adquisición del CAS, es dependiente de la integridad funcional del NBM, que regula la actividad de colinérgica que proyecta hacia la CI (Miranda et al., 1999), asimismo que la participación del neurotransmisor ACh es fundamental durante las etapas tempranas de formación de memorias gustativas (Miranda et al., 2003).

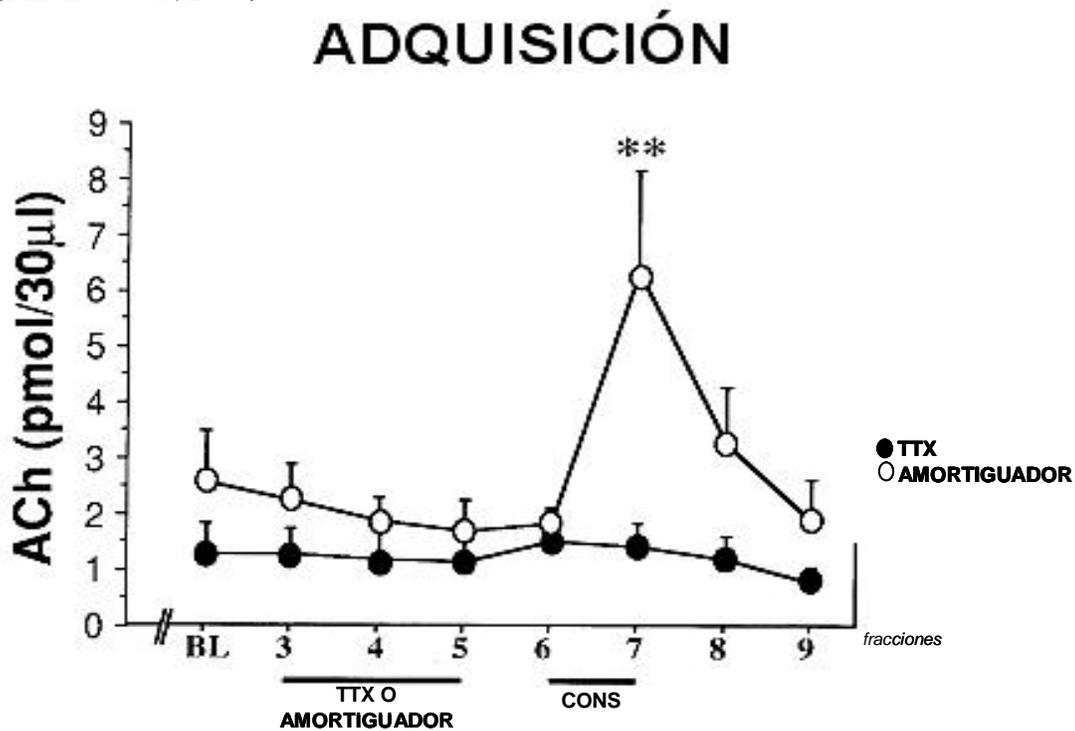


Figura 3. Niveles de ACh liberados y registrados en la CI durante el bloqueo con TTX, durante la adquisición del CAS. Las ordenadas indican los niveles de ACh en pmol/30µl. En las abscisas se muestra el número de fracciones colectadas, así como la temporalidad del experimento. **BL**, la media de las dos primeras muestras; **TTX o amortiguador**, indican el tiempo de la perfusión del fármaco; **CONS**, indica la fracción en el que fue presentado el estímulo novedoso. Los círculos vacíos muestran los animales controles infundidos con el amortiguador en el NBM. Los círculos llenos muestran los animales experimentales infundidos con TTX en el NBM (modificado de Miranda et al., 1999).

Con respecto a la evaluación en los cambios de la liberación de ACh cortical durante la presentación de un estímulo novedoso y un estímulo familiar en el modelo de respuesta apetitiva (Miranda et al., 2000), no se conoce cuál es el mecanismo que modula la liberación de este neurotransmisor durante la novedad y la familiaridad (Figura 4). Estos experimentos sugieren que existe la participación de sistemas de neurotransmisión que pudieran estar regulando la liberación de ACh.

Los experimentos de Morón y colaboradores (2002), trataron de establecer una relación directa con la modulación de los niveles de ACh cortical, como es el caso de GABA. Por medio de la administración en el NBM de agonistas y antagonistas GABAérgicos, como la bicuculina y el muscimol, minutos antes de la adquisición del CAS, se intentó comprobar la participación de éste neurotransmisor por ser el neurotransmisor inhibitorio por excelencia en el SNC, durante la adquisición del CAS. Sin embargo ninguno de estos fármacos afectó la memoria de aversión al sabor, ya que en el día de la prueba los animales tratados con los fármacos GABAérgicos mostraron conductas similares a los animales control.

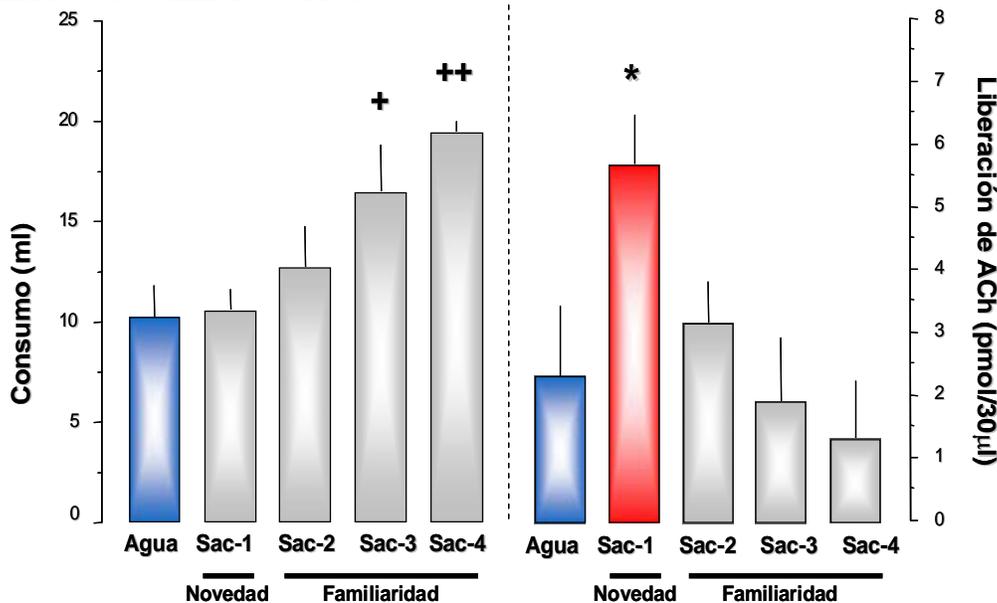


Figura 4. Liberación de ACh en la CI durante la presentación de un sabor novedoso (sacarina 0.1%) y cuando el sabor se vuelve familiar. Las barras del lado izquierdo muestran los consumos de los animales en mililitros y las barras del lado derecho muestran la liberación de ACh durante la presentación de la sacarina 0.1%. Los animales se entrenaron con el modelo de respuesta apetitiva, éstos fueron privados de agua durante 24hrs para establecer una basal de agua, posteriormente se les presentó una probeta graduada con (sacarina 0.1%) durante 15 min., cada 24 hrs durante 4 días se les presentó la probeta con sacarina 0.1%. Del lado derecho podemos ver la liberación de ACh durante el consumo de los animales en los diferentes días del entrenamiento. +  $p < 0.05$  con respecto a los consumos de agua, Sac-1 y Sac-2, ++  $p < 0.005$  con respecto a todos los demás días de consumo. \* $P < 0.05$  con respecto a la liberación de ACh de todos los demás días. (modificado de Miranda et al., 2000).

En este sentido, el sistema colinérgico ha sido implicado en diversos procesos cognitivos y se sabe que otros neurotransmisores podrían interactuar con éste, como la dopamina, GABA, noradrenalina, glutamato e histamina (Decker, 1987; Passani et al., 1998, Bacciottini et al., 2001).

De acuerdo a los resultados de la memoria gustativa, se sabe que existe un aumento y decremento de ACh con respecto a la clase de estímulo (novedoso o familiar, respectivamente), sin embargo, los mecanismos de regulación no son bien conocidos, pudiendo intervenir varios neurotransmisores que han sido implicados en otras tareas asociativas, como es el caso de la histamina. De tal forma, en este trabajo de maestría, se realizó un estudio detallado de la participación de los receptores para el neurotransmisor histamina en el NBM y en la CI, durante la formación de la memoria de aversión al sabor.

#### **D. Localización y función del sistema colinérgico**

El sistema colinérgico se encuentra distribuido principalmente en dos núcleos: uno localizado en el cerebro anterior basal y otro ubicado en los núcleos pontinos en el tallo cerebral. La región conocida como CAB es una zona heterogénea de la región ventral del telencéfalo (en cerebro de mamíferos), que contiene un gran número de células productoras de ACh. Estas células proyectan monosinápticamente, en gran parte a la región límbica del telencéfalo y a la neocorteza (Mesulam, 1995) (Figura 5).

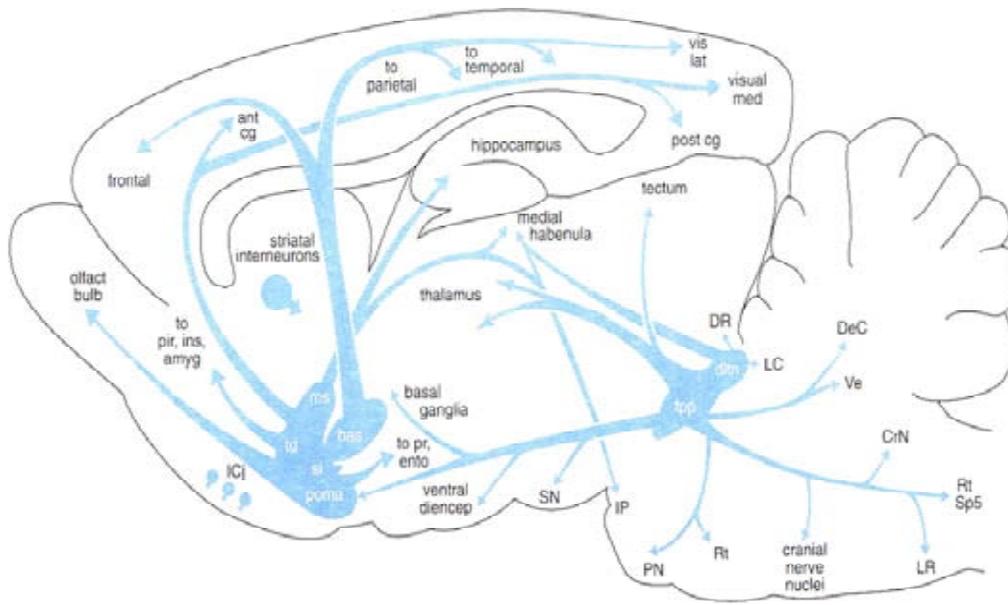


Figura 5. Principales sistemas colinérgicos en un plano sagital en el cerebro de mamíferos. Las neuronas colinérgicas centrales muestran dos tipos de organización fundamental: A. Circuito de células locales, formadas por las interneuronas del estriado, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y el complejo de islotes de calleja **Iej** y B. Neuronas de proyección aquellas que conectan a dos o más regiones diferentes. Estas neuronas colinérgicas se interconectan con estructuras centrales y se han descrito dos complejos principales: 1. el complejo colinérgico del cerebro anterior compuesto por neuronas positivas a la colina acetiltransferasa (ChAT) en el núcleo septal medial, **ms**; el núcleo de la banda diagonal, **td**; sustancia inominata, **si**; campo preóptico magnocelular, **poma**; el núcleo basal, **bas**; así como proyecciones a todo el telencéfalo no estriado y 2. el complejo colinérgico pontomesencefalotegmental compuesto por células inmunoreactivas a AChET en el núcleo tegmental pedunculopontino, **tpp**; y laterodorsal, **dltn**; proyectando ascendentemente al tálamo y a otros sitios diencefálicos y descendentemente a la formación reticular pontina y medular y núcleo profundo cerebral y vestibular. Otras abreviaturas: amígdala, **amyg**; diencefalo, **diencep**; núcleo raphe dorsal **DR**; bulbo olfatorio, **olfact**; sustancia negra, **SN**; cortezas: anterior cingulada, **ant cg**; entorinal, **ento**; frontal, **frontal**; insular, **ins**; piriforme, **pir**; parietal, **par**; temporal, **temporal**; visual lateral, **vis lat**; visual media, **visual med** (modificado de Wolf, 1991).

Anatómicamente, el CAB comprende una serie de estructuras de la región ventral del cerebro, adyacentes a los núcleos preóptico, supraóptico y rostral infundibular del hipotálamo. Desde que se descubrió el sistema de neuronas magnocelulares productoras de ACh, las cuales proveen de innervación colinérgica al sistema límbico y la corteza, el término del CAB se ha convertido en un sinónimo del sistema colinérgico magnocelular, que incluye la región del *septum*, la banda diagonal, núcleo preóptico, sustancia innominata y el NBM.

Las características básicas de las proyecciones colinérgicas basal-corticales son consistentes en diferentes especies, pues a pesar de que existen algunas diferencias específicas entre mamíferos el NBM forma claramente un núcleo compacto de neuronas

colinérgicas (Mesulam et al., 1983) las cuales proyectan hacia la amígdala y regiones corticales.

El sistema colinérgico del CAB parece regular importantes funciones del sistema límbico y de la corteza, como la regulación de los diferentes estados fisiológicos, incluyendo los sistemas de regulación del sueño-vigilia, así como ciertos procesos sensoriales y de atención en la neocorteza, además de su participación en procesos cognitivos mencionados anteriormente (Buzsaki y Gage, 1989; Szymusiak y McGinty, 1990; Semba, 1991). Sin embargo, los mecanismos que controlan la actividad del cerebro basal son todavía desconocidos.

Las neuronas colinérgicas del CAB son fuente de activación en la corteza. Estas neuronas ejercen una modulación específica en la excitabilidad cortical en respuesta a diferentes tipos de estímulos. Antecedentes directos de nuestro laboratorio evaluaron la funcionalidad del NBM durante la adquisición y evocación del CAS y sugieren que los procesos de la adquisición del CAS son dependientes de la actividad colinérgica en el NBM donde la ACh juega un papel fundamental en la CI (Miranda et al., 1999).

### **E. Acetilcolina y otros neurotransmisores**

Las inervaciones colinérgicas del NBM hacia la corteza, corren en paralelo con inervaciones GABAérgicas, estas neuronas se encuentran distribuidas conjuntamente con las neuronas colinérgicas a lo largo del CAB. En la rata, las neuronas GABAérgicas presentan una relación 2 a 1 con respecto a las neuronas colinérgicas, la mayoría de las neuronas GABAérgicas son pequeñas y probablemente del tipo interneuronas. Se encontraron muy pocas neuronas medianas o grandes multipolares, similares a las colinérgicas, cuya morfología puede estar relacionada con neuronas de proyección (Gritti, 1994).

Al igual que las neuronas colinérgicas, las GABAérgicas proyectan ampliamente a las cortezas de asociación de los lóbulos frontal, parietal y temporal. Estas investigaciones sugieren que las proyecciones colinérgicas y GABAérgicas del cerebro medio basal hacia la corteza determinan una función importante en los procesos de aprendizaje y

plasticidad (Dykes, 1997), donde se encuentra implicado una inhibición GABAérgica y una liberación de ACh, así como el control del estado sueño-vigilia (Szymusiak, 1995).

La interacción que puede existir entre las neuronas colinérgicas y las GABAérgicas ha propuesto la teoría de que ambos sistemas de neurotransmisión pueden estar jugando un papel relevante en la producción de un estado cortical que permite que ocurra la plasticidad neuronal. Esta información sugiere que existen mecanismos que involucran una reducción simultánea de la inhibición y un incremento en la liberación de ACh que permite la entrada de señales sensoriales para inducir cambios a largo plazo (Dykes, 1997).

De manera semejante se ha encontrado, que la acción GABA en el NBM y en otras áreas cerebrales, reduce la actividad electrofisiológica de las neuronas basales (Dutar, 1989; Lamour, 1984) y que los axones de las neuronas GABAérgicas del CAB proyectan a la corteza preferente a las interneuronas corticales GABAérgicas (Dykes, 1997).

También se tiene evidencia de que otro neurotransmisor como la histamina, esta relacionado en tareas de aprendizaje y la memoria, regulando la liberación de ACh en la corteza y en la amígdala, a través de las acciones de sus receptores; ya que se ha encontrado que la histamina posee inervaciones moderadas que comparte con el sistema colinérgico, que están localizadas en la corteza, amígdala, estriado y sustancia negra, incluyendo a varias áreas como el *septum*, el complejo de la banda diagonal, y el área preóptica del hipotálamo (Siegel et al., 2006). Algunas investigaciones encontraron que al lesionar los centros histaminérgicos en el hipotálamo disminuye el aprendizaje y la retención de tareas en animales de laboratorio (citado en Siegel et al., 2006).

Otros experimentos han encontrado que la actividad de este neurotransmisor se lleva a través de la actividad de sus receptores, como el receptor H<sub>3</sub> para histamina, el cuál reduce la liberación de ACh, dopamina, noradrenalina, serotonina y ciertos péptidos en diversas áreas cerebrales, además del receptor H<sub>1</sub> que se ha implicado en la actividad del sistema colinérgico cortical.

Sin embargo se desconoce la correlación entre el sistema colinérgico/histaminérgico, las evidencias hasta ahora obtenidas sugieren la necesidad de realizar más estudios para lograr un entendimiento claro de la acción neurotransmisora de la histamina en tareas cognitivas.

## F. Localización y función del sistema histaminérgico

La histamina se sintetiza en los núcleos tuberomamilares del hipotálamo, a partir del aminoácido L-histidina en las rutas metabólicas que se llevan a cabo por cuatro enzimas: la histidina descarboxilasa (HDC), que utiliza como sustrato la L-histidina, removiendo el grupo carboxilo para generar la histamina. Una vez sintetizada la histamina, este neurotransmisor posee dos rutas de degradación, llevadas a cabo por dos enzimas. Una que trabaja a nivel periférico, la diamina oxidasa (DAO), que oxida la histamina para obtener ácido acético imidazol y otra en SNC, la histamina metiltransferasa (HMT) que convierte a la histamina en tele-metilhistamina, sustrato para la monoaminooxidasa (MAO) que sintetiza el ácido acético tele-metilimidazol (Figura 6).

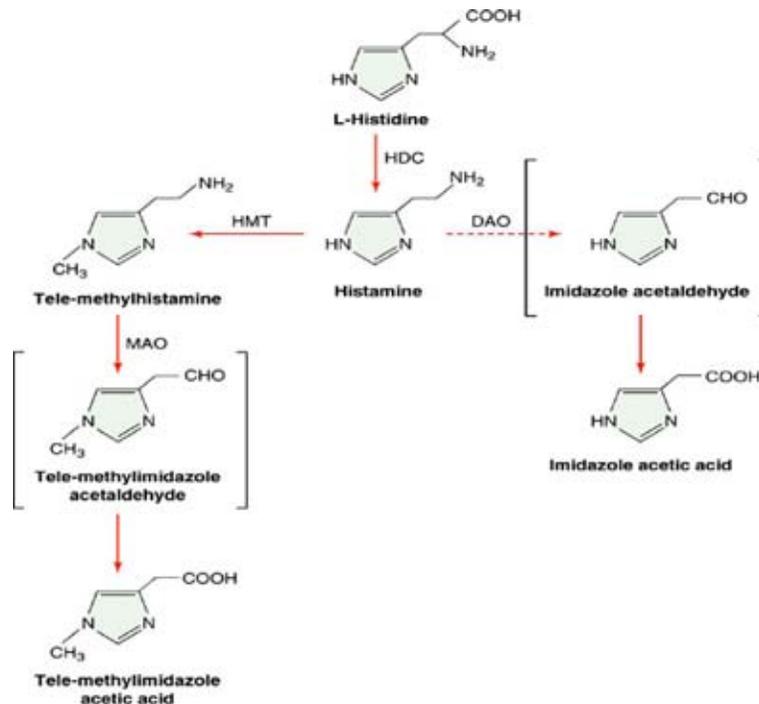


Figura 6. Síntesis y metabolismo de la histamina. Las líneas continuas indican las rutas para la formación y el catabolismo de la histamina en el cerebro. Las líneas interrumpidas muestran las rutas adicionales que pueden ocurrir fuera del sistema nervioso. HDC, histidina descarboxilasa; HMT, histamina metiltransferasa; DAO, diamina oxidasa; MAO, monoamina oxidasa (Siegel et. al, 2006).

La histamina es uno de los neurotransmisores que al parecer tiene una interacción relevante con la actividad colinérgica y que ésta actividad es necesaria durante los procesos de aprendizaje. Recientemente se han encontrado evidencias de que la histamina puede modular la liberación cortical de ACh (Bacciottini et al., 2001; Blandina et al., 2006). De ahí el interés por estudiar con mayor detalle cuáles son los posibles mecanismos por los cuáles actúa la histamina durante los procesos cognitivos.

Desde que la histamina se descubrió por Sir Henry Dale y colaboradores, a principios del siglo XX, se ha encontrado que esta sustancia que normalmente estaba relacionada con secreciones gástricas y la respuesta del sistema inmune, tiene un papel clave en el SNC (citado en Siegel et al., 2006). La histamina en el SNC se sintetiza principalmente en los núcleos tuberomamilares con proyecciones esencialmente hacia el tálamo, corteza, cerebro medio y al plexo coroideo (Figura 7) (Siegel et al., 2006).

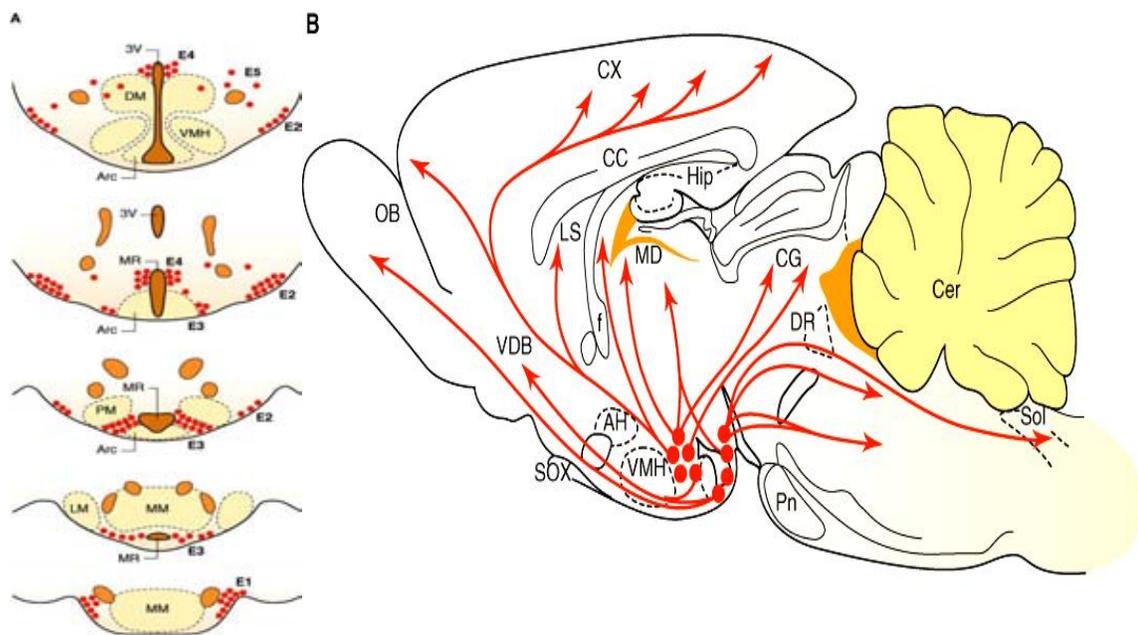


Figura 7. El sistema histaminérgico del cerebro de la rata. (A) Cortes frontales a través del hipotálamo posterior mostrando la localización de las neuronas histaminérgicas. *Arc*, núcleo arcuato; *DM*, núcleo dorsomedial; *LM*, núcleo mamilar lateral; *MM*, núcleo medial mamilar; *MR*, mamilar recesivo; *PM*, núcleo premamilar; *3V*, tercer ventrículo; *VMH*, núcleo ventral hipotalámico (B) Una vista sagital mostrando las proyecciones de las fibras ascendentes y descendentes. *AH*, hipotálamo anterior; *CC*, cuerpo calloso; *Cer*, cerebelo; *CG*, sustancia gris; *CX*, corteza cerebral; *DR*, rafé dorsal; *f*, fornix; *Hip*, hipocampo; *LS*, septum lateral; *MD*, tálamo mediodorsal; *OB*, bulbo olfatorio; *Pn*, núcleo pontino; *Sol*, tracto del núcleo solitario; *SOX*, decusación supraóptica; *VDB*, Banda diagonal vertical; *VMH*, núcleo ventromedial hipotalámico. (Siegel et al., 2006).

Probablemente sean estos los sitios de acción entre el sistema colinérgico y el sistema histaminérgico. La evidencia ha comprobado que el sistema histaminérgico modula las rutas colinérgicas del NBM, como el complejo *septum* medial-banda diagonal, amígdala, hipocampo y corteza cerebral (Inagaki et al.,1988; Panula et al.,1984; Takeda et al.,1984; Wada et al., 1991). El momento preciso de las acciones del sistema histaminérgico se debe en parte a la activación de los diferentes subtipos de receptores, a la limitación de la arquitectura cerebral que separa los grupos de transmisores en estructuras particulares del cerebro y a la naturaleza de las pruebas cognitivas usadas para determinar si la histamina inhibe o facilita la acción de otros neurotransmisores (Blandina et al., 1996b).

#### **a - Receptores para histamina en el SNC**

Los receptores para histamina son H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y recientemente descubierto H<sub>4</sub>. Todos están localizados en diversas áreas del cerebro, además del Sistema Nervioso Periférico (SNP) y se encuentran acoplados a proteínas G (Figura 9).

El receptor H<sub>1</sub> se encuentra acoplado generalmente a la proteína G<sub>q</sub>, que al unirse a su ligando induce una respuesta celular, en la cual se estimula al fosfatidilinositol (PI) para la activación de la fosfolipasa C (PLC) con la subsiguiente generación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (Figura 9). Estos segundos mensajeros elevan el nivel de Ca<sup>2+</sup> intracelular y activan a la proteína cinasa C (PKC). La activación de estos receptores también pueden estimular el metabolismo del glucógeno, modular la síntesis de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y guanosin monofosfato cíclico (GMPc), así como la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), con la subsiguiente liberación de ácido araquidónico y sus metabolitos.

Muchas de estas acciones se han encontrado en cerebros de vertebrados donde la activación de estos receptores puede provocar la excitación neuronal de varias áreas como la corteza cerebral, hipotálamo y tálamo, debido a la activación de ciertos canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje por vías indirectas e inducir el cambio de la conductancia de iones mediado por la cascada de IP<sub>3</sub> y Ca<sup>2+</sup> (Siegel et al., 2006).

Los receptores  $H_2$  se encuentran acoplados a las proteínas  $G_s$  y  $G_q$  que, al ser activadas inducen a su vez la activación del adenilato ciclasa (AC), el cual provoca un incremento del AMPc que da como resultado la activación de la proteína cinasa A (PKA). Los resultados de algunos experimentos indican que este receptor también utiliza mecanismos de transducción adicional como la activación de la PLC e incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, de la misma manera que el aumento en las concentraciones de  $IP_3$ , metilación de fosfolípidos y decremento del ácido araquidónico (Arrang et al., 1987; Leurs et al., 1995 y Hill et al., 1990, en Siegel 2006).

Se ha encontrado que este receptor produce excitación en corteza cerebral de mamíferos e hipocampo, debido a la activación de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, que inducen la excitación neuronal. También puede facilitar la despolarización por incremento en la conductancia de cationes.

En cuanto al receptor  $H_3$ , la unión a su ligando puede provocar dos respuestas: una donde la activación de este receptor funciona como un regulador negativo del AC por medio de la proteína  $G_{i/o}$  y otra donde puede disminuir la síntesis de histamina mediante la inhibición de la enzima HDC (Figura 8). Esta enzima se encarga de remover el carbono de la L-histidina para convertirla en histamina, de manera que si se inhibe la acción de la enzima no habrá producción de histamina, esto está controlado por la vía AMPc ó AC ó PKA. Recientemente se ha reportado que este receptor funciona como activador de la ruta de las MAP-cinasas (MAPK) y que también modula la liberación de ácido araquidónico y el intercambio de  $Na^+ / H^+$ , así como la inhibición de las conductancias de  $Ca^{2+}$ . Por tanto este receptor puede ser de particular relevancia para la función del cerebro, principalmente en áreas como el estriado, núcleo *accumbens*, corteza cerebral y sustancia negra.

El receptor  $H_4$  recientemente encontrado y clonado para conocer su funcionalidad, se ubica fundamentalmente en el hipocampo, donde al igual que el receptor  $H_3$ , el receptor  $H_4$  se acopla a la proteína  $G_{i/o}$ , y regula a la baja la actividad de la AC, este receptor actúa de manera promiscua acoplándose a varias proteínas G como la  $G_{15}$  y la  $G_{16}$ , quienes generalmente se encargan de la movilización de calcio intracelular. También se le ha encontrado implicado en la ruta de activación de las MAPK (Siegel et al., 2006).

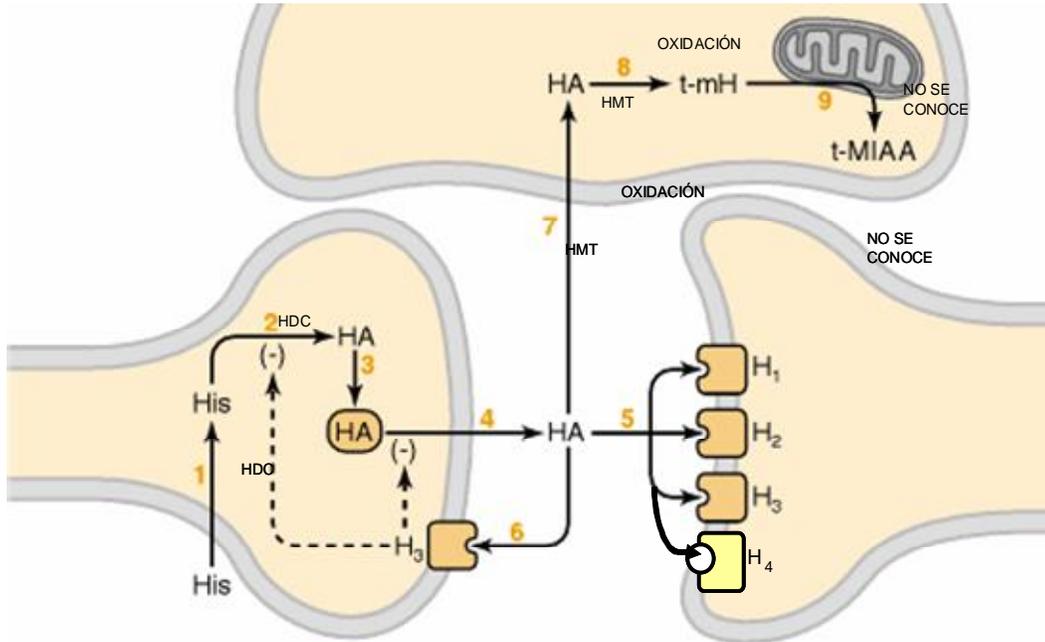


Figura 8. Dinámica del ciclo de vida de la histamina. Síntesis, liberación y metabolitos de la histamina: 1 L-histidina(his) transporte en las terminales nerviosas; 2 síntesis de histamina (HA) mediante la histidina descarboxilasa; 3 Formación de histamina y vesiculación; 4 Liberación de histamina y exocitosis; 5 Activación de receptores en la postsinapsis; 6 Retroalimentación negativa de la histamina mediada por los receptores H<sub>3</sub>; 7 transporte de histamina por medio de astrocitos aunque el mecanismo no es conocido, pero se cree que estos recapturan la histamina en las terminales nerviosas; 8 metabolismo de la histamina por medio de la N-metiltransferasa HMT; 9 oxidación por medio de la monoamina oxidasa t-MH. La localización de los pasos 7-9 aún ha sido bien determinada (modificado del Siegel et al., 2006).

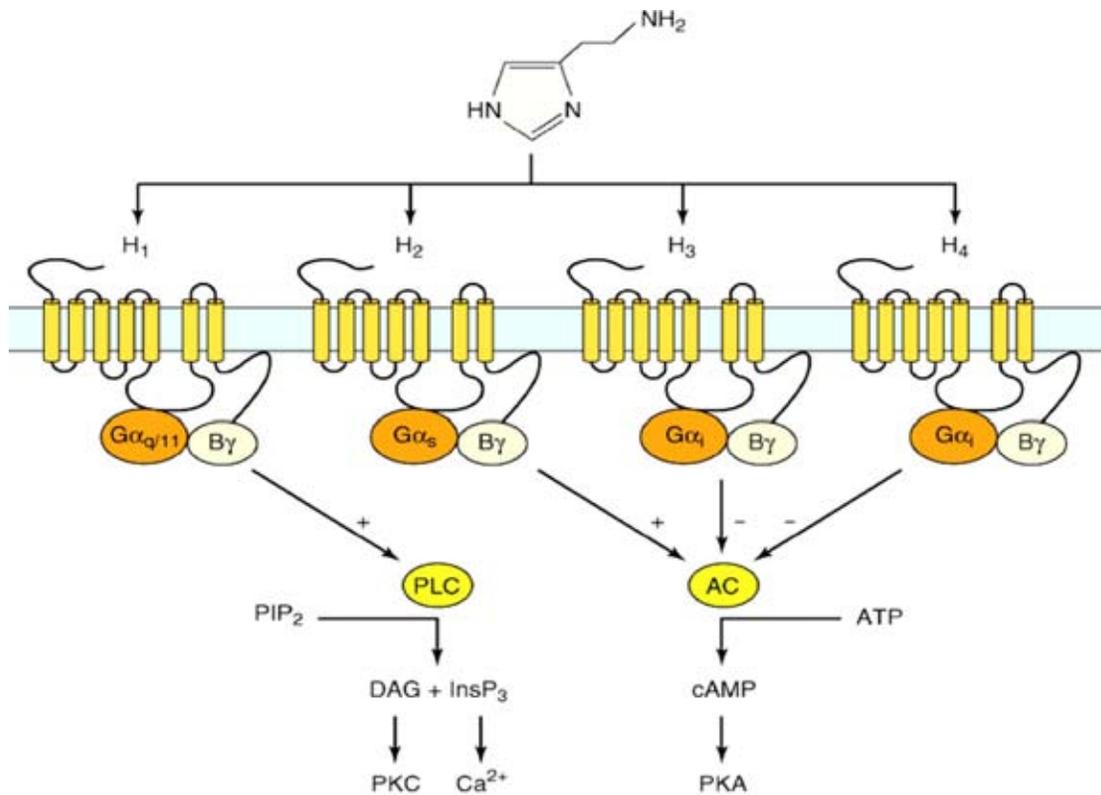


Figura 9. Las distintas rutas de los receptores histaminérgicos. La histamina puede estar acoplada a una variedad de proteínas G y activar las rutas de segundos mensajeros. El receptor H<sub>1</sub> receptor activa al fosfatidilinositol vía proteína G $\alpha_{q/11}$ . Otros receptores son excitatorios como el receptor H<sub>2</sub> o inhibitorios (H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>) que regulan la actividad del adenilato ciclasa por medio de la actividad de las proteínas G vía G $\alpha_s$  y G $\alpha_i$ . Las rutas adicionales han sido descritas. Abreviaciones: *PIP2*, fosfatidilinositol, 1,4,5-bifosfato IP<sub>3</sub>; *PLC*, fosfolipasa C; *ADC*, adenilato ciclasa; *ATP* adenosin trifosfato; *AMPc* cíclico; *PKC*, proteína cinasa C; *PKA*, proteína cinasa (Siegel et.al., 2006).

## **G. Interacciones entre el sistema colinérgico e histaminérgico.**

Se conoce que las neuronas colinérgicas del CAB se encuentran localizadas fundamentalmente en el NBM e inervan en gran parte a la neocorteza y a la amígdala, además del complejo del *septum* medial-banda diagonal que proyecta al hipocampo (Mesulam et al., 1983; Wolf et al., 1984; Nicoll, 1985). Se sabe que estos cuerpos neuronales se encuentran dañados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Davies y Maloney, 1976; Coyle et al., 1983; Kul et al., 1999). Las alteraciones neuronales ocasionadas por la pérdida y daño de estas neuronas, no se encuentran asociados exclusivamente con el sistema colinérgico, pues conjuntamente se descubrió en estudios en humanos, que estos sujetos carecen de mecanismos de regulación tanto para la ACh como para la histamina. De tal forma, se prestó atención a los tratamientos farmacológicos con la *tacrina* (droga que alivia temporalmente la pérdida de memoria) por inhibir a la acetilcolinesterasa (enzima encargada de degradar a la ACh intersináptica en acetato más colina), pues esta droga también inhibió a la histamina metiltransferasa, enzima responsable de metabolizar a la histamina en el cerebro (Morriset, et al., 1996).

Estos resultados incrementaron el interés por encontrar la relación de las funciones de la histamina, sobre la liberación de ACh desde el NBM o áreas adyacentes hacia la corteza. Estudios neurofarmacológicos *in vivo* han demostrado que la administración intraventricular de agonistas del receptor H<sub>1</sub>, mejora la ejecución de tareas de asociación como el reconocimiento del objeto, donde se les expuso por un determinado tiempo a un par de objetos geométricos similares, los cuales fueron explorados y reconocidos como iguales. Tiempo después los animales son probados, en este día un objeto es cambiado por otro y entonces el animal pasa más tiempo reconociendo el objeto nuevo (Blandina et al., 2004). También se encontró que la administración oral de pirilamina y prometazina antagonistas de H<sub>1</sub>, impiden la adquisición de un aprendizaje de contextos aversivos (Bacciottini et al., 2001).

Otros experimentos farmacológicos demostraron que existe una participación de los receptores H<sub>3</sub> durante el aprendizaje de tareas asociativa. En estos experimentos los animales fueron entrenados con el modelo del reconocimiento al objeto. Al realizar la manipulación farmacológica se les administró un agonista del receptor H<sub>3</sub>, RAMH i.p.,

minutos antes de la prueba; el animal disminuyó el tiempo de exploración del objeto novedoso en comparación de los tiempos de los animales control (Blandina et al., 1996a). Este fármaco promovió deficiencias en el aprendizaje de otras tareas como la evitación inhibitoria, pues al aplicar RAMH i.p., 30 min antes del entrenamiento los animales no presentaron la conducta de la evitación del lado oscuro en comparación de los grupos control (Blandina et al., 1996a).

Al mismo tiempo Blandina y colaboradores (1996b), encontraron que existe una participación selectiva de los receptores H<sub>3</sub> en la corteza parietal. Se administró un agonista para el receptores H<sub>1</sub> y otro para el receptor H<sub>2</sub>, sin obtener modificaciones significativas en la liberación de acetilcolina en la corteza parietal; sin embargo, al administrar el agonista del receptor H<sub>3</sub>, RAMH, a dos concentraciones se observó un efecto en la disminución de ACh, pero no así con los agonistas de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> (Figura 10).

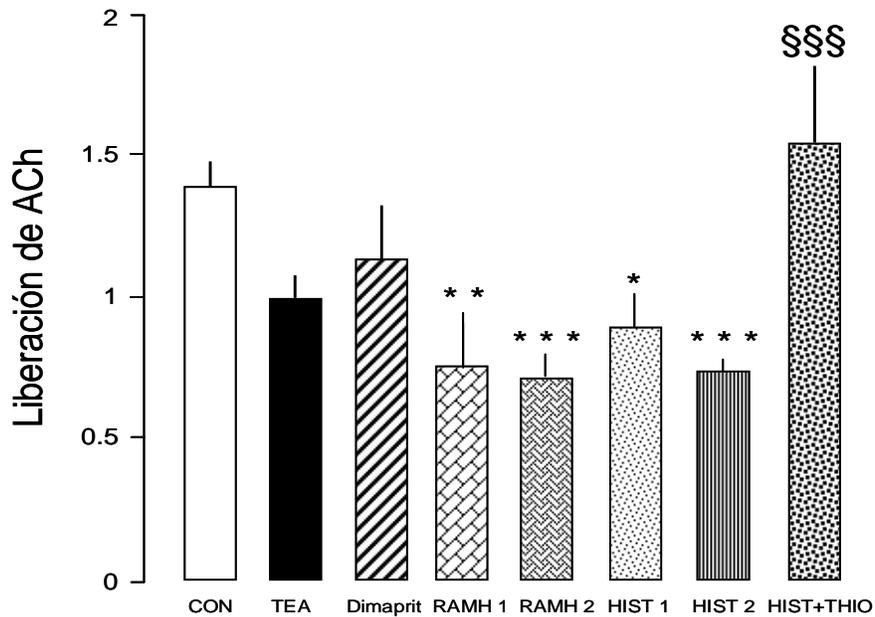


Figura 10. Agonistas y antagonistas histaminérgicos administrados en la corteza parietal. Mediante la técnica de microdiálisis se comprobó que existe una gran participación de los receptores H<sub>3</sub> en la corteza insular. Se provocó una estimulación con 100mM K<sup>+</sup>, en ratas en libre movimiento. Los animales fueron estimulados 2 veces a través de la membrana de diálisis por 50 min y 140 min. Después de un periodo de estabilización se administraron al medio agonistas y antagonistas de los receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> 10 min. antes de las estimulaciones por alto K<sup>+</sup>. Las barras muestran los valores de las medias de n experimentos. Los valores significativos de los tratamientos fueron determinados por un ANDEVA y una prueba post hoc de Bonferroni \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, §§§ p<0.0001, con respecto a todos los demás fármaco y controles. Animales control □, TEA(2-thiazoliethylamina)agonista de H<sub>1</sub> ■, dimaprit agonista de H<sub>2</sub> ▨, RAMH 1μM agonista H<sub>3</sub> ▩, RAMH 10μM agonista de H<sub>3</sub> ▪, Histamina 10μM ▫, Histamina 100μM ▬, Histamina 100μM + thioperamida 0.3μM antagonista de H<sub>3</sub> ▮.(modificado de Blandina et al., 1996b).

Del mismo modo se obtuvo evidencia que muestra que el neurotransmisor histamina, modula la liberación de ACh en la BLA por medio de sus receptores H<sub>3</sub> en tareas de asociación como el condicionamiento al miedo (Figura 11- A) (Blandina et al., 2004).

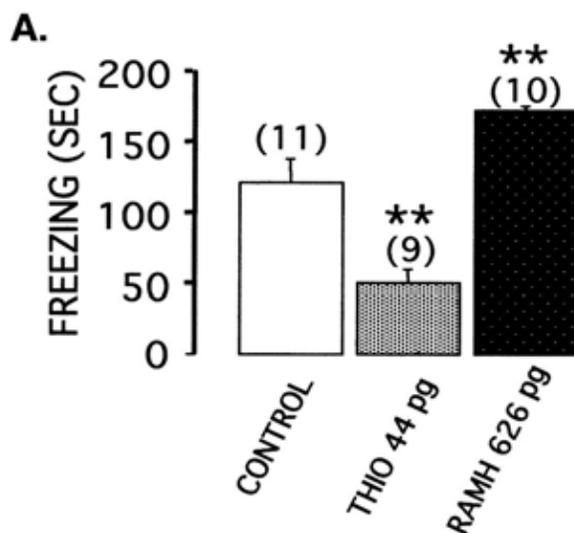


Figura 11 (A). Infusiones bilaterales del antagonista del receptor H<sub>3</sub> thioperamida (THIO) y del agonista del receptor H<sub>3</sub> R- -metilhistamina (RAMH) en la BLA, después del entrenamiento de la tarea del condicionamiento al miedo. Las ratas fueron infundidas en dos ocasiones: 1-2 minutos antes de la prueba e inmediatamente después del entrenamiento, bajo condiciones generales de anestesia (Ketamina, 100mg/kg). Cada fármaco fue preparado y diluido en salina estéril para permitir una infusión constante de un volumen de 0.5 l/lado en cada rata. Los animales controles fueron infundidos con salina estéril. 72 horas después al entrenamiento, los animales fueron probados durante 3 minutos en la caja y se registró el tiempo de inmovilización de la rata. Las barras representan el valor de la media  $\pm$  SEM de (n) experimentos. \*\*P<0.01 vs control (ANDEVA y la prueba de Neuman-Keuls (Modificado de Passani et al., 2001; Cangioni et al., 2002 en Blandina).

Estos estudios midieron el efecto de la administración de estos agonistas y antagonistas del receptor H<sub>3</sub>, en la liberación de ACh durante la tarea de aprendizaje (Figura 11-B).

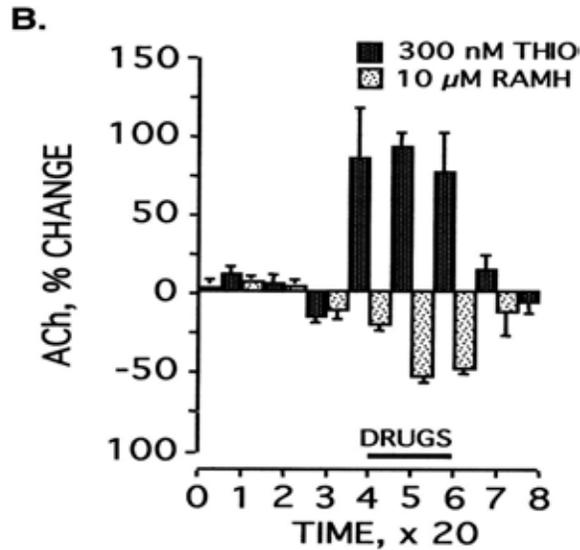


Figura 11 (B). Porcentaje de la liberación de ACh en ratas en libre movimiento. Infusión del antagonista tioperamida y el agonista RAMH del receptor  $H_3$  en la BLA. La ACh se colectó en fracciones cada 20 minutos, 2 horas después de la infusión de los fármacos y su detección fue expresada en porcentaje del valor de la media, que fue de  $0.12 \pm 0.02$  pmol/20 min, en los experimentos con RAMH (n=5) y de  $0.26 \pm 0.05$  pmol/20 min para tioperamida (n=4). Las barras oscuras indican el periodo de la aplicación de tioperamida (300nM) y las barras con puntos muestran el periodo de aplicación del RAMH (10 M) administrados bilateralmente en la BLA (Modificado de Passani et al., 2001; Cangiolli et al., 2002).

Otros estudios *in vitro* (Arrang et al., 1987), reportaron que podría existir una interacción de histamina-acetilcolina en hipocampo debida a las acciones de RAMH un agonista del receptor  $H_3$ .

Clapham y Kilpatrick en 1992, mostraron que la activación de los receptores  $H_3$  inhiben la liberación de acetilcolina tritiada en rebanadas de corteza entorrinal de rata. De manera similar se encontró que la administración de tioperamida, un antagonista de  $H_3$  incrementa la liberación de ACh en el hipocampo de ratas anestesiadas (Mochizuki et al., 1994).

De tal manera que los efectos cognitivos debido a agentes histaminérgicos, no siempre ocurren en conjunto con la actividad colinérgica (Bacciottini et al., 2001). Pues al

realizar otras investigaciones *in vitro* utilizando antagonistas histaminérgicos de H<sub>3</sub> como clobenpropit, tioperamida y el ciproxifano (Blandina et al., 2004), para determinar qué tipo de sustancias se liberan en espacio extracelular, encontraron algunas enzimas como glutamato descarboxilasa (Takeda et al., 1984), adenosina deaminasa (Semba et al., 1985), así como GABA (Ericsson, 1991), sustancia P (Köhler et al., 1986) entre otras.

Posteriormente se realizaron otros experimentos, por medio de la técnica de microdiálisis, para demostrar que un agonista del receptor H<sub>3</sub>, immpip, incrementa la liberación de GABA en la corteza y que la bicuculina, un antagonista GABAérgico, revierte la inhibición de ACh inducida por immpip (Giorgetti et al., 1997). A estas observaciones se puede agregar que las neuronas GABAérgicas en el NBM (Grittin et al., 1997), las cuales proyectan primeramente a la corteza sobre interneuronas GABA (Freund y Meskenaite, 1992), podrían incrementar la inhibición del tono GABAérgico sobre la liberación de ACh (Giorgetti et al., 2000).

Todas las evidencias anteriores conducen a pensar que las interneuronas GABAérgicas en CI podrían controlar la actividad colinérgica cortical. También sugieren que la modulación histaminérgica sobre el tono colinérgico cortical podría tener dos formas de procesar la información, una inhibitoria, relacionada con las acciones de los receptores histaminérgicos en CI y otra excitatoria, como resultado de la actividad de los receptores sobre los cuerpos celulares colinérgicos del NBM y los receptores histaminérgicos respectivamente; ya que se encontró que la activación del receptor H<sub>1</sub> en neuronas histaminérgicas del NBM puede facilitar la liberación cortical de ACh (Figura 12) (Bacciottini et al., 2001).

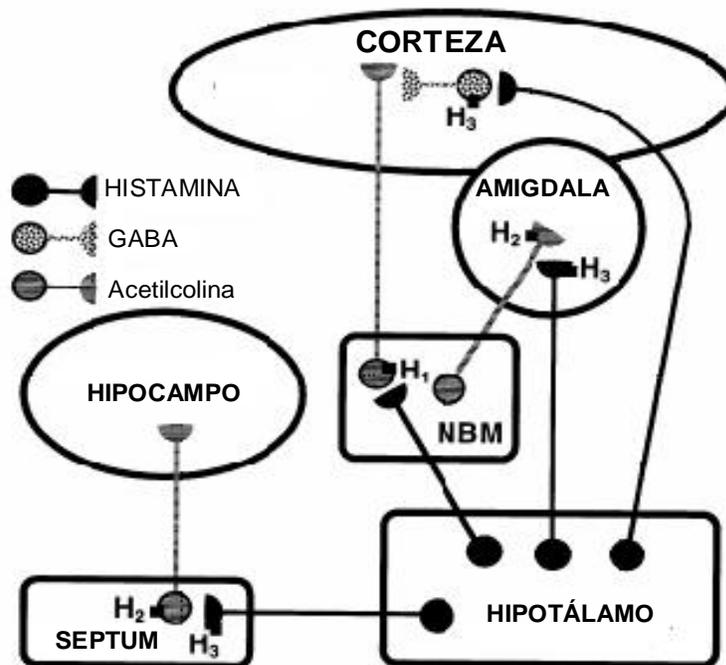


Figura 12. Sitios donde podrían llevarse a cabo las interacciones entre los sistema histaminérgicos y colinérgicos. Hay tres sistemas de especial interés, NBM- sistema cortical, NBM- sistema amigdaloides y *septum* medial de la banda diagonal (MSA-DB)- sistema hipocampal. Los fármacos que actúan con los receptores  $H_1$  pueden afectar el tono colinérgico por la interacción de las aferencias del NBM con la periferia, no se sabe si es directa o indirectamente. El receptor  $H_2$  también puede afectar el tono colinérgico en la amígdala, pues puede modular el tono colinérgico hipocampal por interacción con MSA-DB. Los receptores  $H_3$  al unirse a su ligando, pueden actuar como autoreceptor en el *septum* y en la amígdala, modulando indirectamente el tono colinérgico en amígdala e hipocampo. Estos receptores también pueden afectar la actividad cortical en la región postsináptica, posiblemente por su localización en neuronas GABAérgicas (modificado de Bacciottini et al., 2001).

La información obtenida de estos estudios podría dar pie a nuevas investigaciones para encontrar aplicaciones terapéuticas para tratamientos en desórdenes cognitivos, así como para estudiar los mecanismos que subyacen en el proceso de aprendizaje y evocación en modelos animales (Passani et al., 2000).

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente se ha demostrado que el neurotransmisor ACh, se encuentra relacionado con la adquisición de tareas de asociación y que éste es necesario para la formación de memorias a largo plazo. Se ha señalado que existen varias estructuras que participan en el establecimiento de la memoria gustativa, como son la CI, el NBM, la amígdala entre otras (Miranda et al., 1999, 2002, 2003), donde la integridad funcional del NBM es crucial para varios aprendizajes debido a la acción de sus neuronas colinérgicas, las cuales proyectan a toda la corteza (Mesulam et al., 1986), ya que al lesionar este núcleo de diversas maneras, los animales no fueron capaces de adquirir una tarea asociativa como el CAS.

Con respecto a la memoria gustativa, se ha descrito que durante la presentación de un sabor novedoso durante la adquisición del CAS, se produce una liberación significativa de ACh en la CI y que estos niveles disminuyen durante la presentación de un sabor familiar. El mecanismo por el cual existe esta regulación colinérgica aún no es conocido.

Algunos estudios trataron de relacionar al sistema GABAérgico en esta regulación, debido a que es el sistema inhibitorio más conocido. La propuesta de Morón y colaboradores, supone que GABA podría estar relacionado con la disminución de ACh durante el reconocimiento de un estímulo familiar. Sin embargo no obtuvo resultados al menos en las dosis utilizadas, cuando trató de impedir la formación de la memoria gustativa, mediante la administración de agonistas GABAérgicos, minutos antes de la adquisición del CAS.

Por otro lado Giorgetti y su grupo, describieron que existe una liberación significativa de GABA en la corteza parietal al momento de administrar un agonista del receptor H<sub>3</sub> para histamina. Debido a estos datos de regulación histaminérgica, se analizaron en otras series de experimentos, diversas clases de tareas que han sido relacionadas con la regulación de ACh durante la adquisición, tales como la evitación inhibitoria, reconocimiento al objeto, paso-abajo, laberinto acuático entre otras.

Asimismo, se ha encontrado que existe una participación de la histamina durante el aprendizaje y la memoria y que éste neurotransmisor lleva a cabo su acción a través de la activación de sus receptores localizados en áreas heterogéneas del cerebro como el NBM, amígdala, hipocampo, corteza parietal y corteza entorrinal. Los mecanismos descritos por Bacciottini y colaboradores (2001), proponen que la activación del receptor  $H_1$  en NBM y el receptor  $H_3$ , son fundamentales para la adquisición de tareas asociativas. En este sentido, la información de un estímulo gustativo novedoso durante la formación del CAS, que se sabe depende de las proyecciones del NBM y de la liberación de ACh en la CI, podría estar siendo regulado por la histamina. De tal forma, las evidencias sugieren que los cuerpos colinérgicos y/o GABAérgicos en el NBM y la CI pueden ser regulados mediante la activación de los receptores para histamina, durante el reconocimiento de un sabor novedoso o un sabor familiar.

Sin embargo, no existe ningún antecedente sobre la función del sistema histaminérgico durante la formación de la memoria del sabor, por lo que pretendemos caracterizar farmacológicamente, a través del uso de agonistas y antagonistas histaminérgicos, su posible función en la CI y el NBM durante el CAS.

## **IV. HIPÓTESIS**

### **A. General:**

La actividad histaminérgica en el núcleo basal magnocelular y en la corteza insular es necesaria durante la formación de la memoria al sabor.

### **B. Específica:**

1) La infusión de pirilamina, antagonista del receptor H<sub>1</sub>, en el NBM impide la adquisición y/o consolidación del condicionamiento de aversión al sabor.

## **V. OBJETIVOS**

### **A. General:**

Evaluar la función de los receptores histaminérgicos por tratamientos farmacológicos en el NBM y la corteza insular durante la formación de la memoria de aversión al sabor.

### **B. Particulares:**

1) Estudiar los efectos de la infusión bilateral del antagonista del receptor H<sub>1</sub> (pirilamina) en el núcleo basal magnocelular inmediatamente antes de la adquisición del CAS.

2) Determinar los efectos de la infusión bilateral del agonista del receptor a histamina H<sub>3</sub> (R- $\alpha$ -metilhistamina) en la corteza insular inmediatamente antes la adquisición del CAS.

2) La infusión de la R- $\alpha$ -metilhistamina, agonista del receptor a histamina H<sub>3</sub>, en la corteza insular impide la adquisición y/o consolidación del condicionamiento de aversión al sabor.

## **VI. MÉTODOS**

### **A. Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 250 a 300 g de peso, que fueron habituados a permanecer individualmente en cajas de acrílico una semana antes de la cirugía, con alimento y agua *ad libitum*, en el cuarto del *vivario* del laboratorio con ciclo invertido luz/oscuridad de 12 horas. El protocolo y las maniobras que se utilizaron en el estudio, fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (UNAM). De igual manera los procedimientos estuvieron acordes con las normas internacionales establecidas para el manejo y uso de animales de experimentación (Comité de ética y cuidado animal del INB-UNAM).

### **B. Cirugía**

Los animales fueron intervenidos quirúrgicamente, en donde cada uno fue anestesiado con una solución de ketamina (70mg/kg) y xilacina (6mg/kg), de los cuales se aplicó 1ml/kg de peso intraperitonealmente (i.p.). Una vez que el animal estuvo anestesiado se rasuró y se le limpió la cabeza, posteriormente con ayuda de un estereotáxico se sujetó la cabeza del animal para hacer una incisión con bisturí, se removió el periostio, se expuso el cráneo y se limpió el área, para realizar dos trépanos, a través de los cuales se introdujeron bilateralmente guías cánulas de 12 mm en el NBM [anteroposterior (AP) = -1.5 mm, lateral (L) =  $\pm$  2.5 mm, ventral (V)= -4.9 mm desde Bregma] y en la CI [AP = +1.2 mm, L= + 5.5 mm desde bregma; V = -3.0 desde la dura], según el atlas Paxinos y Watson, 2004. Las cánulas fueron fijadas en el lugar con la ayuda de dos tornillos y cemento de acrílico dental (Figura 13).

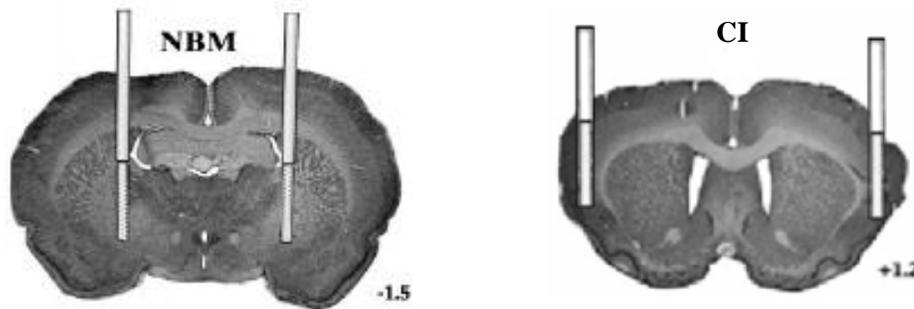


Figura 13. Ubicación de las cánulas con profundidad de 12mm, en el NBM y en la CI en cortes coronales. La parte terminal de la cánula muestra los inyectores que bajan 3mm tanto en el NBM, como en la CI.

### **C. Manipulación de los animales**

Dos días después de la cirugía los animales fueron manipulados alrededor de 2 minutos por animal. Al mismo tiempo se revisó que los estiletes se encontraran dentro de la cánula y se movieron circularmente con el propósito de evitar la obstrucción de la misma. Tres días antes de la infusión se removieron totalmente para verificar la funcionalidad de la cánula.

### **D. Entrenamiento del condicionamiento de aversión al sabor**

Una semana posterior a la cirugía, los animales fueron privados de agua durante 24 hrs y a partir del día siguiente fueron habituados a tomar agua en probetas graduadas que eran ofrecidas durante 20 min. en un periodo de tiempo entre las 12:30 p.m. y 1:00 p.m. por 7 días. Los consumos fueron registrados en mililitros todos los días, para establecer un consumo basal de agua. Al octavo día los animales fueron infundidos con el fármaco 20 min. antes de la adquisición del CAS.

La adquisición consistió en la presentación de un sabor novedoso, en este caso sacarina al 0.1%, la cual se disolvió en agua y se les presentó de manera similar en una probeta graduada durante 20 min., posteriormente se registró el consumo como en la línea base. Transcurridos 30 min., se les inyectó i.p. cloruro de litio (LiCl) (0.3 M, 33 mg/Kg) para inducir el malestar gástrico. Al siguiente día, los animales bebieron agua en una probeta graduada y se registró el consumo; 24 horas después se realizó la prueba del

CAS, donde se les dio por segunda ocasión la solución de sacarina al 0.1% a los animales, de acuerdo a los registros de los consumos se verificó la aversión a este sabor dulce (Figura 14).

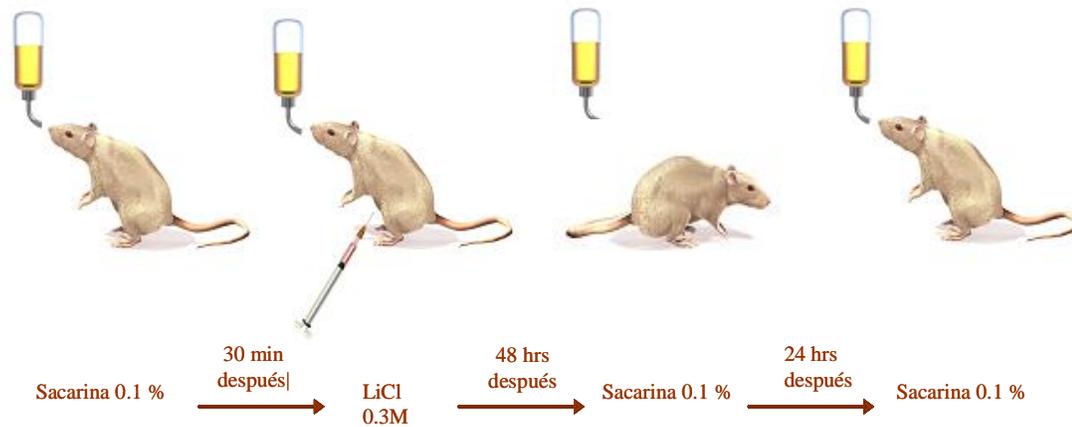


Figura 14. Procedimiento del condicionamiento de aversión al sabor. Se muestran los tiempos de la presentación de los estímulos al animal.

Un día posterior a la prueba los animales realizaron la extinción que consiste en una tercera presentación de la sacarina 0.1% sin administración de LiCl, de tal manera que se evaluó la disminución en la aversión al sabor.

Los animales consumieron una mayor cantidad de sacarina 0.1% debido a dos razones: Los animales se encontraban privados de líquidos y sedientos por lo que fueron obligados a beber la solución a manera de una extinción forzada. También se debió a que los animales tuvieron un re-aprendizaje en donde quizás se reorganizó la asociación aversiva hacia la sacarina, generando una nueva representación de este sabor. En esta ocasión la sacarina no fue asociada con efectos de malestar gástrico como ocurrió en la primera ingesta de este sabor ya que no hubo una asociación con el LiCl. De esta manera los animales incrementaron sus consumos de sacarina extinguiendo la respuesta aversiva hacia este sabor.

## E. Infusiones

Para las infusiones las ratas fueron divididas en cuatro grupos (ver figura 15), todos los grupos fueron infundidos 20 min. antes de la presentación del sabor novedoso (sacarina al 0.1 %). También se realizó en otro grupo de animales, la infusión 20 min. antes de la prueba del CAS (segunda presentación de sacarina al 0.1%).

- 1) Grupo control que recibió solución salina isotónica (0.9%) y grupo tratado con pirilamina antagonista del receptor  $H_1$  (100mM) en el NBM, a una velocidad de 0.5 $\mu$ l durante 1 min., 20 min. antes de la adquisición del CAS.
- 2) Grupo control tratado salina 0.9% y con pirilamina (100mM), en el NBM, 20 min. antes de la prueba del CAS, a una velocidad de 0.5 $\mu$ l durante 1 min.
- 3) Grupo control al cuál se le infundió solución salina isotónica al 0.9% y grupo que recibió al agonista del receptor  $H_3$ , RAMH (10 M) en la CI a una velocidad de 0.5 l durante 1 min, 20 min. antes de la adquisición del CAS.
- 4) Grupo control al cuál se le infundió solución salina isotónica al 0.9% y un grupo al que se le administró RAMH (10 M) en la CI a una velocidad de 0.5 l durante 1 min, 20 min antes de la prueba del CAS.

Grupo control NBM	Grupo Pirilamina NBM	Grupo control CI	Grupo RAMH CI
0.5 l/1min/lado (salina al 0.9%)	0.5 l/1min/lado (100 mM )	0.5 l/1min/lado (salina al 0.9% )	0.5 l/1min/lado (10 M )

Figura 15. Cantidad microinyectada de los fármacos en cada uno de los grupos.

## F. Histología

El día posterior a la prueba de extinción del CAS, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital (113 mg/kg) y perfundidas intracardialmente con una solución salina isotónica. Al término de este procedimiento se extrajeron los cerebros y se colocaron en viales en una solución de formaldehído al 10% para

conservarlos. Luego de 7 días se cambiaron a una solución de sacarosa al 60% por 6 días. Posteriormente fueron cortados en secciones coronales de 50  $\mu$ m usando un microtomo marca Leica. Los cortes obtenidos fueron montados en un porta objetos para teñirlos con la técnica de Nissl. De esta manera se verificó la posición de las cánulas y el inyector en la CI o en el NBM. Ver Figura 16A, 16B y 17.

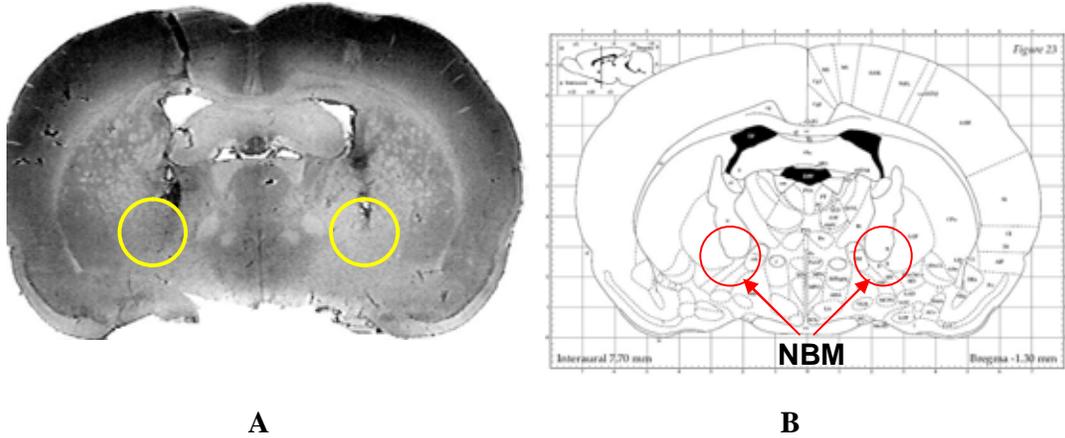


Figura 16 **A**. Colocación de cánulas en el NBM. Corte coronal de 50  $\mu$ m de cerebro de rata, en círculos amarillos se muestra la ubicación de los inyectores. **B** Los círculos rojos muestran la ubicación del NBM en el atlas Paxinos. AP ó 1.30mm con respecto a bregma (Modificado de Paxinos y Watson, 2004).

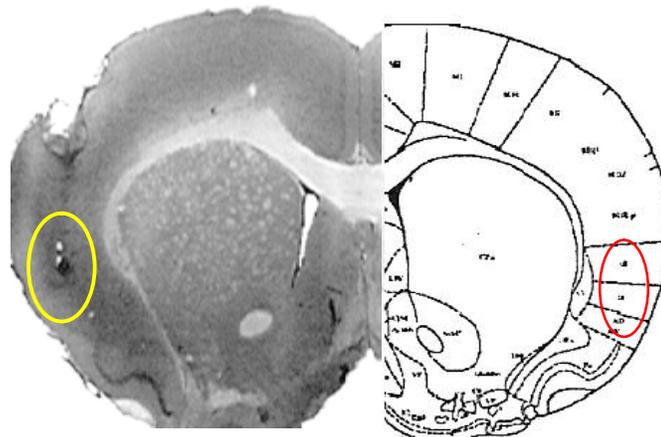


Figura 17. Colocación de las cánulas en la CI. Corte coronal de 50  $\mu$ m de cerebro de rata, del lado izquierdo se muestra la ubicación de los inyectores encerrado en un ovalo amarillo. Del lado derecho se puede observar un esquema del atlas Paxinos con la localización de la CI a un nivel AP de 0.70mm con respecto a bregma (Modificado de Paxinos y Watson, 2004).

## **G. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Stat View. Se realizó un análisis de la varianza (ANDEVA) para medidas repetidas, debido los distintos días de consumos en diferentes condiciones a lo largo del experimento. Se determinaron los efectos entre grupos (diferencias entre grupos), efectos de sesión (días de consumos en ambos grupos control y experimental) e interacción entre grupos referidos a la media de los consumos de las sesiones.

## VII. RESULTADOS

### A. Efectos de pirilamina en el NBM.

#### a – Análisis para pirilamina administrada antes de la adquisición del CAS.

Los resultados obtenidos de los grupos canulados en el NBM, mostraron un efecto significativo en los consumos de sacarina el día de la prueba. Debido al efecto del fármaco pirilamina durante la adquisición del sabor novedoso.

El ANDEVA mostró un efecto significativo de las interacciones entre los grupos y la sesión de adquisición ( $F_{2,72} = 5.88, p < 0.05$ ), así como un efecto principal de la sesión ( $F_{2,72} = 38.61, p < 0.05$ ). El grupo control mostró un menor consumo en la sesión de prueba comparado con el grupo tratado con pirilamina ( $F_{1,36} = 16.86, p < 0.05$ )<sup>1</sup>. Ambos grupos disminuyeron su consumo en la sesión de prueba con respecto a la sesión de adquisición ( $F_{1,36} = 49.47$  y  $4.73, p < 0.05$  para grupo control y para el grupo tratado con pirilamina respectivamente)<sup>2</sup>. No hubo diferencias en la sesión de extinción entre el grupo control y el grupo tratado con pirilamina ( $F_{1,36} = 0.18, p > 0.05$ )<sup>3</sup>, solo hubo una tendencia (Figura 18).

---

<sup>1</sup> Estas representan comparaciones pre-planeadas.

<sup>2</sup> Estas representan comparaciones pre-planeadas.

<sup>3</sup> Estas representan comparaciones pre-planeadas.

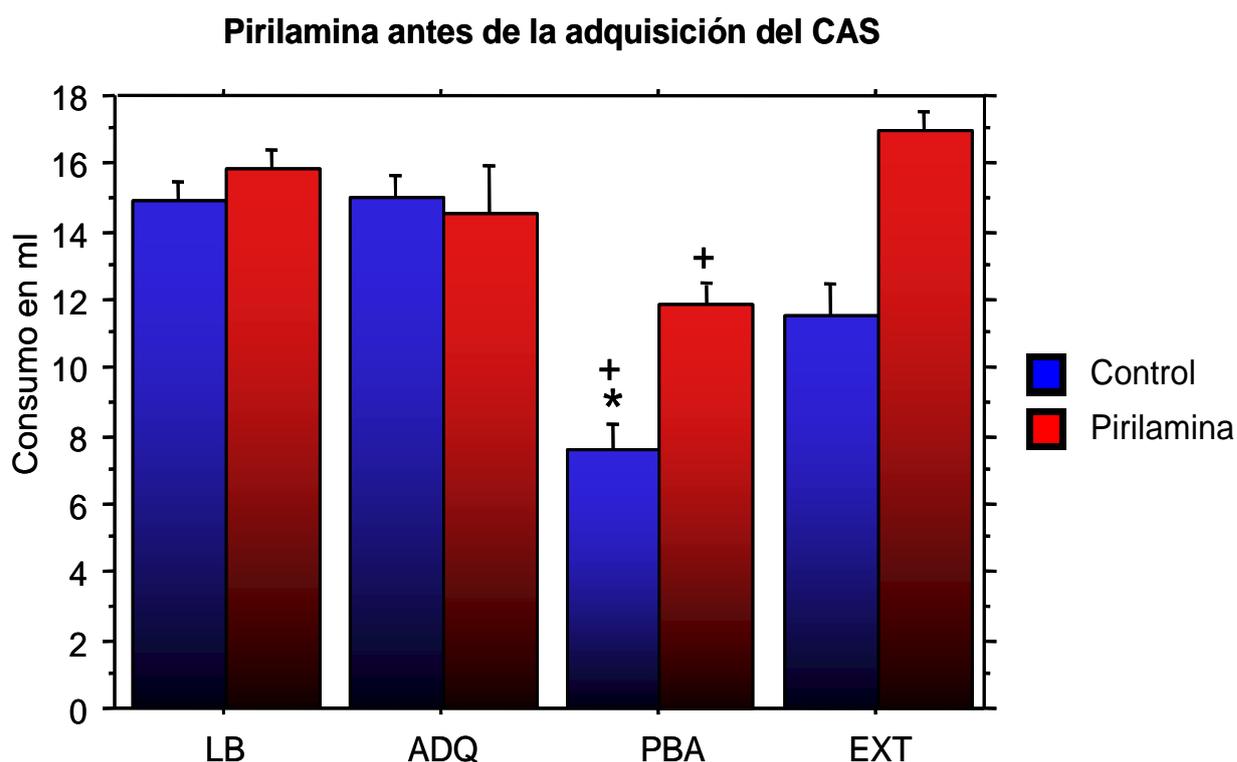


Figura 18. Administración de pirilamina 20 min. antes de la adquisición del CAS. En el eje de las ordenadas se muestran los consumos de los animales medido en ml. En las abscisas se muestran los diferentes días en el que se presentaron las probetas graduadas. Las barras azules muestran la media  $\pm$  DE de los consumos de los grupos control. Las barras rojas muestran los grupos tratados con pirilamina durante las distintas exposiciones de la sacarina. Se realizó un ANDEVA para medidas repetidas \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente con respecto al grupo tratado con pirilamina. + significativamente diferente en comparación con la sesión previa. LB, Línea Base; ADQ, adquisición; PBA, prueba; EXT, extinción.

### **b – Análisis para pirilamina aplicada antes de la prueba del CAS.**

Los resultados obtenidos de los grupos infundidos en el NBM con pirilamina 20 min antes de la prueba o segunda presentación de sacarina al 0.1% no mostraron efectos significativos entre grupos (Figura 19).

El ANDEVA mostró un efecto significativo solamente de sesión ( $F_{3, 66} = 38.61$ ,  $p < 0.05$ ), tanto el grupo control como el grupo tratado con pirilamina disminuyeron su

consumo en la sesión de prueba ( $F_{1, 22} = 130.86, 100.89, p < 0.05$  para grupo control y pirilamina respectivamente) <sup>4</sup>.

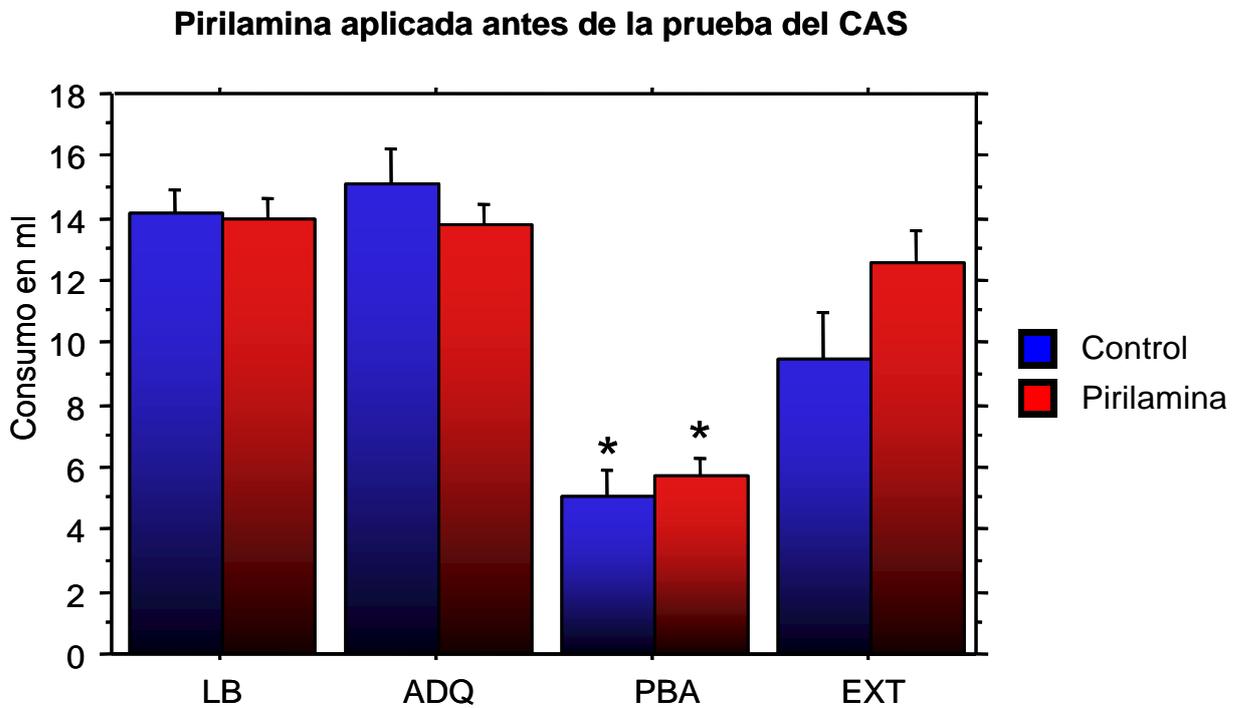


Figura 19. Administración de pirilamina 20 min. antes de la prueba del CAS. En el eje de las ordenadas muestra los consumos de los animales medido en ml., mientras que el eje de las abscisas, muestra los diferentes días en el que se presentaron las probetas graduadas. Las barras azules muestran la media  $\pm$  DE de los consumos de los grupos control. Las barras rojas muestran la media  $\pm$  DE de los consumos de los grupos tratados con pirilamina. Los resultados del ANDEVA para medidas repetidas, \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente de la sesión previa. LB, Línea Base; ADQ, adquisición; PBA, prueba; EXT, extinción.

<sup>4</sup> Estas representan comparaciones pre-planeadas

## B. Efectos de RAMH en la CI.

### a – Análisis para RAMH aplicado antes de la adquisición del CAS.

Los resultados de estos experimentos mostraron los efectos de la infusión del RAMH en CI antes de la adquisición del sabor novedoso (sacarina 0.1%).

El ANDEVA para medidas repetidas mostró un efecto significativo de la interacción ( $F_{2,50} = 25.04$ ,  $p < 0.05$ ), de sesión ( $F_{2,50} = 36.66$ ,  $p < 0.05$ ) y de grupo ( $F_{1,25} = 7.05$ ,  $p < 0.05$ ). El grupo RAMH mantuvo el mismo nivel de consumo en las tres sesiones analizadas LB, ADQ y PBA, mientras que el grupo control disminuyó su consumo significativamente en la sesión de prueba en comparación con la sesión de adquisición ( $F_{1,25} = 115.56$ ,  $p < 0.05$ ). El grupo RAMH y el grupo control mostraron diferencias significativas en su consumo en el día de la prueba ( $F_{1,25} = 52.06$ ,  $p < 0.05$ ).

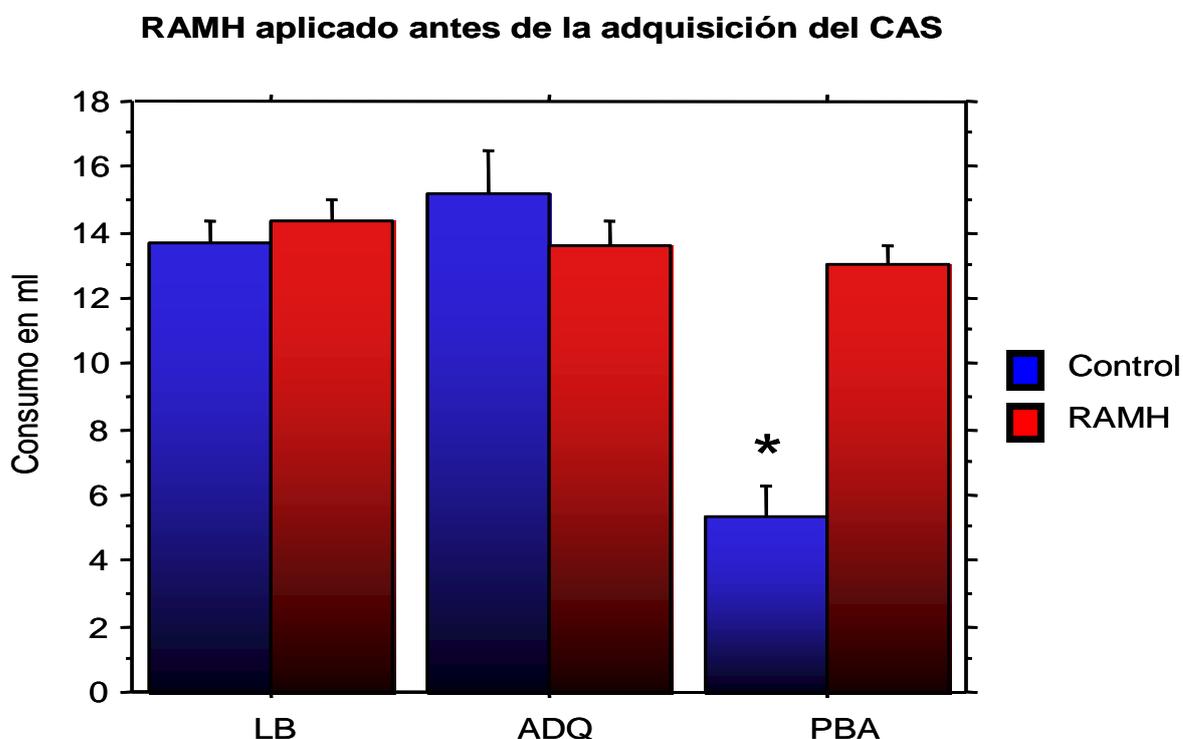


Figura 20. Administración de RAMH 20 min. antes de la adquisición del CAS. En las ordenadas se muestra la media  $\pm$  DE de los consumos medido en ml., en tanto que en las abscisas se muestran los

diversos días en que se presentaron las probetas. Las barras azules muestran los consumos de los grupos control. Las barras rojas expresan los datos obtenidos de los grupos tratados con RAMH, durante las distintas exposiciones de la sacarina. El ANDEVA para medidas repetidas mostró un efecto de grupo \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente con respecto a la sesión previa y al grupo RAMH. LB, Línea Base; ADQ, adquisición; PBA, prueba.

### b – Análisis para RAMH aplicado antes de la prueba del CAS

De manera semejante a los grupos tratados con pirlamina en el NBM, se trabajaron grupos adicionales en la CI, para averiguar los efectos de RAMH sobre la evocación del CAS (segunda presentación de sacarina 0.1%) (Figura 21).

El ANDEVA mostró un efecto significativo solamente de sesión ( $F_{3,42} = 66.49$ ,  $p < 0.05$ ), con ambos grupos, mismos que disminuyeron su consumo el día de la prueba ( $F_{1,14} = 108.21$ ,  $110.58$ ,  $p < 0.05$  para grupo control y experimental respectivamente).

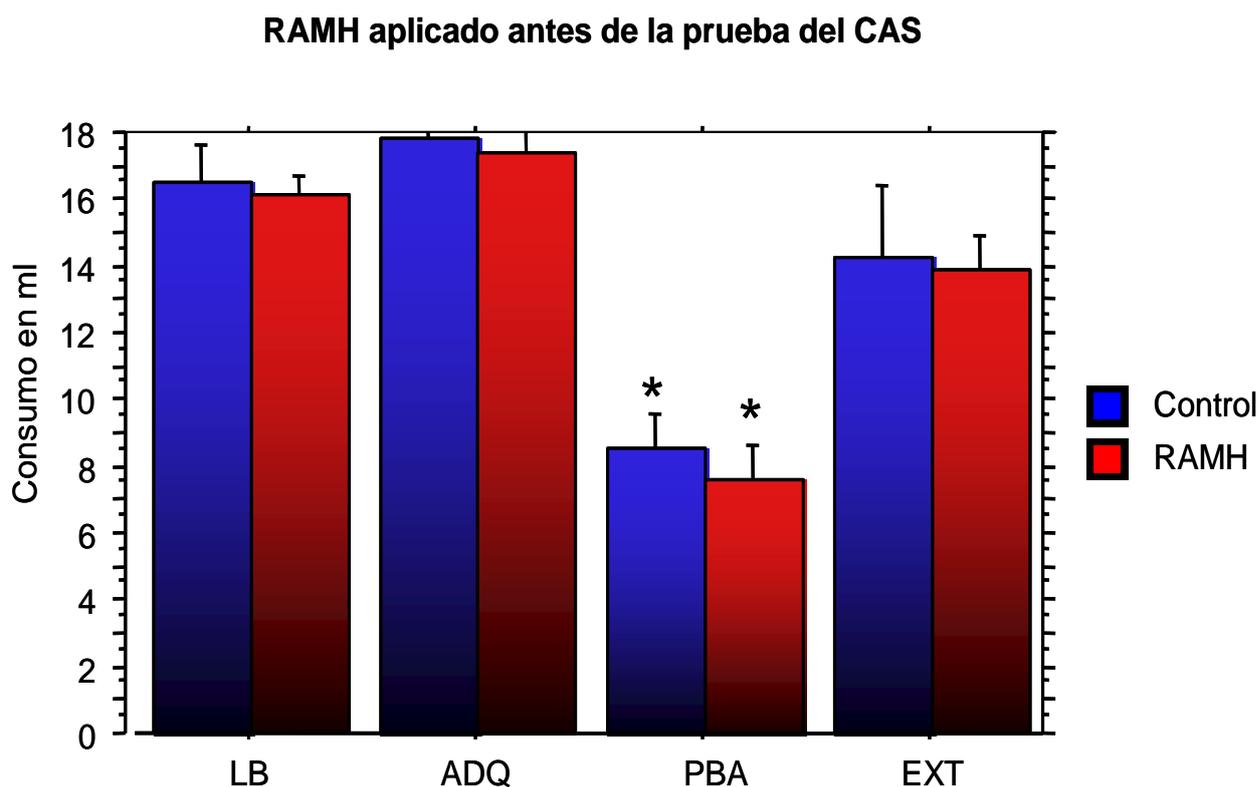


Figura 21. Administración de RAMH 20 min. antes de la prueba del CAS. Las ordenadas muestran los consumos de los animales en ml., mientras las abscisas, muestran los diferentes días en el que se presentaron las probetas. Las barras azules muestran la media  $\pm$  DE de los consumos de los grupos control. Las barras rojas indican los valores de la media  $\pm$  DE de los grupos tratados con RAMH. El ANDEVA para medidas repetidas, mostró un efecto de grupo, \*  $p < 0.05$  a lo largo de las sesiones, significativamente diferente de la sesión de prueba.

## VIII. DISCUSIÓN

El presente trabajo mostró que la manipulación farmacológica de los receptores histaminérgicos  $H_1$  en el NBM y  $H_3$  en la CI durante la adquisición del CAS, impidió la adquisición y/o consolidación de la memoria aversiva del sabor.

Los grupos que fueron tratados con pirlamina en el NBM antes de la adquisición del CAS, no mostraron aversión a la sacarina el día de la prueba en comparación con los grupos control que fueron infundidos con solución salina y mostraron una aversión el día de la prueba cuantificada por la disminución del consumo de sacarina (ver Figura 18).

Estos resultados concuerdan con las evidencias previas en otros tipos de aprendizajes, donde se ha descrito una participación de los receptores para histamina. Por ejemplo, Kamei (1990) demostró que la administración oral de pirlamina, antagonista del receptor  $H_1$ , retardó la adquisición e impidió la retención de la memoria para pruebas como la evitación activa. De manera similar Bacciottini y colaboradores (2001), demostraron que la administración oral de pirlamina y prometazina, ambos antagonistas del receptor  $H_1$ , impiden la adquisición de un aprendizaje de evitación inhibitoria. Si bien estos estudios revelan una intervención de los receptores  $H_1$  en tareas de asociación, es claro que la administración sistémica no aclara la participación de estructuras particulares del SNC y es necesaria la realización de otros estudios farmacológicos más localizados en áreas del cerebro que demuestren efectos semejantes a los estudios sistémicos.

En este sentido, los estudios de De Almeida y su grupo (1988,1994), mostraron que al aplicar un antagonista del receptor  $H_1$  prometazina, intracerebroventricular después del entrenamiento, disminuyen la retención de pruebas de memoria de contexto como la evitación inhibitoria y otras como el laberinto acuático (Tasaka et al., 1994).

Estos resultados muestran, con evidencias farmacológicas y conductuales, que los receptores  $H_1$  desempeñan un papel importante durante la adquisición de tareas de aprendizaje y memoria en modelos asociativos. Sin embargo, no arrojan alguna

explicación sobre cuáles son los mecanismos intracelulares que se encuentra presente durante la activación de estos receptores.

Los estudios de Bacciottini y colaboradores (2001), mostraron que los efectos atribuidos a los fármacos se llevan a través de un sistema efector presente en los procesos de aprendizaje.

Este sistema se encuentra formado por los receptores  $H_1$ , que probablemente se encuentran en los somas de las neuronas colinérgicas del NBM, de tal manera que al ser activados facilitan el tono colinérgico en la corteza (Bacciottini et al., 2001). La localización exacta de los receptores aún no se conoce, pero existen otros estudios que apoyan esta teoría, ya que al realizar una estimulación farmacológica de los receptores  $H_1$  en el NBM, se libera una gran cantidad de ACh en la corteza (Cecchi et al., 2001; Khateb et al., 1995).

Estos estudios indican que durante el aprendizaje de tareas asociativas es indispensable el sistema colinérgico del NBM, para que los procesos de asociación lleven a cabo en la corteza. De manera semejante en la memoria gustativa se ha encontrado que el NBM es el núcleo encargado de regular la actividad colinérgica en la CI y que si este núcleo se bloquea temporalmente los sujetos no son capaces de reconocer la novedad de un determinado sabor (Miranda et al., 1999). También se ha descrito que el incremento de ACh en la CI es fundamental para la formación de la memoria gustativa.

De tal manera que la teoría propuesta por Bacciottini et al., 2001, puede explicar lo que sucedió durante la formación del CAS, al manipular los receptores  $H_1$  del NBM, con un antagonista selectivo. Al inactivar los receptores para histamina localizados en las neuronas colinérgicas del NBM, probablemente se impidió el incremento necesario de ACh en la CI, para que los animales asociaran la sacarina con el malestar gástrico, en el día de la adquisición del CAS. Por lo tanto al realizar la prueba de memoria los animales bebieron como si hubiera sido la primera vez que consumían ese sabor.

Con respecto a los experimentos realizados con la pirilamina administrada antes de la prueba del CAS. Se mostró que este fármaco no afectó la evocación de la memoria gustativa, de tal manera que la pirilamina no provoca alteraciones en la respuesta sensorial o motivacional durante el consumo de sacarina y en segundo lugar, no

participa en los procesos necesarios durante la evocación de una memoria aversiva (ver Figuras 19).

Adicionalmente, los consumos de los animales control y de los tratados con pirilamina el día de la extinción, demostraron que este fármaco no tiene efectos a largo plazo que pudieran afectar los procesos de re-aprendizaje de sabores. El día de la extinción todos los animales incrementaron los consumos de la sacarina de manera similar, debido a la exposición consecutiva a este sabor sin efectos aversivos (malestar gástrico) (ver Figuras 18 y 19). (Bermúdez-Rattoni et al., 2001).

Los resultados de los experimentos de las infusiones realizadas en CI, demostraron que la presencia de receptores histaminérgicos  $H_3$  son fundamentales para el aprendizaje del CAS. Esto concuerda con las investigaciones previas, realizadas con agonistas y antagonistas del receptor  $H_3$ , tanto i.p como en varias cortezas. Por ejemplo, la aplicación de RAMH i.p. antes de la tarea de reconocimiento de objeto y la evitación inhibitoria, impidió el aprendizaje (Blandina et al., 1996a). Esto resultados conductuales, promovieron a realizar investigaciones con estudios farmacológicos para describir los mecanismos de acción de este receptor.

En este sentido, Blandina y su grupo (1996b), encontró que la administración de un agonista para el receptor  $H_3$ , RAMH, redujo la liberación de ACh en la corteza parietal. Además otros experimentos, encontraron que al administrar imnepip, un agonista del receptor  $H_3$ , se incrementó la liberación de GABA en la corteza parietal en ratas en libre movimiento y que la bicuculina, un antagonista GABAérgico, revirtió la inhibición colinérgica provocada por el imnepip (Giorgetti et al., 1997). Esto indica que existe una acción facilitadora de los receptores  $H_3$  sobre la acción/liberación de GABA, por lo que estos receptores  $H_3$  probablemente se encuentren en una interneurona GABAérgica que al ser activada inhibe la liberación de ACh cortical durante los procesos cognitivos (Blandina et al., 1996a).

Los resultados en esta tesis mostraron que los receptores  $H_3$ , participan durante la adquisición del CAS, pues al aplicar RAMH, 20 min. antes de la primera presentación de la sacarina el día de la adquisición del CAS, se impide la formación de la memoria de aversión. Como se puede ver en el día de la prueba, donde los sujetos aumentaron sus

consumos de sacarina, ya que no hubo ninguna asociación aversiva hacia la sacarina (ver Figura 20).

De acuerdo a las evidencias previas de otros laboratorios (Blandina et al., 1996a, b y Giorgetti et al., 1997), las cuales sugieren que la activación del receptor  $H_3$ , por el agonista RAMH, es capaz de incrementar los niveles de GABA en la corteza frontoparietal, se puede sugerir que los efectos observados en los presentes experimentos, también podría estar sucediendo un incremento de GABA a nivel de la corteza insular y que podría explicar que a su vez inhibió la liberación de ACh en la CI y por tanto los animales no asociaron la sacarina como algo aversivo, de manera semejante a los grupos tratados con pirilamina. Sin embargo, esto deberá de comprobarse con otros experimentos que evalúen los niveles de ACh y GABA directamente en la CI.

En la presente tesis, también se mostró que el fármaco RAMH administrado antes de la prueba del CAS, no alteró la percepción del sabor, ni la evocación de la memoria gustativa ya que en el día de la prueba, tanto los grupos control como los grupos tratados con el agonista RAMH, mostraron una respuesta aversiva a la sacarina y por lo tanto consumos bajos. Mostrando así, que estos receptores sólo se encuentran participando durante la adquisición y/o consolidación del CAS, ya que una vez que se ha formado la memoria no tiene efecto la activación de estos receptores (ver Figura 21).

Además durante la tercera presentación de sacarina para la extinción, se encontró que este fármaco tampoco posee efectos a largo plazo y no se alteraron procesos de reaprendizaje, puesto que ambos grupos de animales incrementaron sus consumos de la sacarina, debido a la exposición consecutiva a este sabor sin consecuencia aversiva (ver Figura 21).

Desafortunadamente, aún faltan muchos estudios que clarifiquen de qué manera el receptor  $H_3$  (inhibitorio) al ser activado, se encarga de incrementar los niveles de GABA. Esto invita a realizar estudios más detallados sobre la localización y el tipo celular en el que se encuentran los receptores  $H_3$  en la CI. Además de cuantificar la actividad y liberación de ACh y GABA en CI, cuando existe la aplicación de un agonista de  $H_3$ , durante la adquisición del CAS.

Nuestro entendimiento de los posibles mecanismos del sistema histaminérgico en el aprendizaje y la memoria del CAS, requieren de estudios más detallados de estos receptores.

Aún es necesario conocer la localización específica de estos receptores  $H_1$  en las neuronas colinérgicas y  $H_3$  en la CI, y si la activación de éstos modulan de manera directa la liberación de ACh en la CI. Pero de acuerdo a los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación queda claro que los receptores  $H_1$  en el NBM y  $H_3$  en CI se encuentren implicados en los procesos de adquisición del CAS y que pudieran formar parte de la regulación necesaria del sistema colinérgico, que se requieren en la adquisición de muchas tareas asociativas.

## **IX. CONCLUSIONES**

1.- La administración del antagonista del receptor  $H_1$ , pirilamina en el NBM, 20 min. antes de la adquisición del CAS, impidió la asociación de la sacarina 0.1% con el malestar inducido por LiCl.

2.- El fármaco pirilamina durante el día de la prueba no afectó la percepción de la sacarina, ni la evocación de la memoria gustativa.

3.- La administración del agonista del receptor  $H_3$  RAMH en CI, minutos antes de la adquisición del CAS, impidió la asociación del sabor novedoso (sacarina) como algo aversivo.

4.- La administración del fármaco RAMH en la CI, no afectó la percepción del sabor (sacarina) ni la evocación de una memoria gustativa durante el día de prueba.

En conclusión, los datos obtenidos en esta tesis nos permiten demostrar que el sistema histaminérgico es necesario durante las etapas de adquisición y/o consolidación del CAS. Asimismo admiten pensar que la liberación de ACh durante el reconocimiento de la novedad del sabor es imprescindible para la formación de la memoria al sabor, por lo que se requiere de una actividad integra de los receptores para histamina en la CI y el NBM.

## **X. PERSPECTIVAS**

1.-Realizar estudios farmacológicos mediante la técnica de microdiálisis con el animal en libre movimiento; así como cuantificar y observar los efectos de la administración de la pirilamina en el NBM, sobre los niveles de ACh en la CI, durante el reconocimiento del sabor novedoso.

2.- Estudiar mediante farmacología y microdiálisis, la influencia del agonista del receptor H<sub>3</sub>, sobre los niveles de GABA y ACh en la CI, durante el reconocimiento del sabor novedoso.

3.-Estudiar mediante técnicas de inmunohistoquímica la localización de los receptores histaminérgicos H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> en el tipo neuronal en el NBM y la CI.

## **XI. REFERENCIAS**

Allen G, Saper C, Hurley K y Cechetto D. 1991. Organization of visceral and limbic Connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 311, 1–16.

Arrang J, Drutel G y Schwartz J. 1995. Characterization of histamine H<sub>3</sub> receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. *Br J Pharmacol.* 114, 1518-1522.

Bacciottini L, Passanni M, Manaioni, P, Blandina P. 2001. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. *Behav Brain Res.* 124, 183-194.

Berman D y Dudai Y. 2001. Memory Extinction, Learning Anew, and Learning the New: Dissociations in the Molecular Machinery of Learning in Cortex. *Science.* 291, 2417-2419.

Bermúdez-Rattoni F y McGaugh JL. 1991. Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* 549,165– 170.

Bermúdez-Rattoni F y Yamamoto T. 1998. Neuroanatomy of CTA: Lesions studies. In: *Conditioned taste aversion. Memory of special kind.* New York: Oxford Medical publication.

Bermúdez-Rattoni F y Prado Alcalá RA. 2001. *Memoria: Dónde reside y cómo se forma.* México: Trillas.

Blandina P, Giorgetti M, Bartolini L, Cecchi M, Timmerman H, Giovannini MG, Leurs R, Pepeu G, Giovanni M. 1996a. Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H<sub>3</sub> receptor activation in rats. *Br J Pharmacol.* 119, 1656-1664.

Blandina P, Giorgetti M, Cecchi M, Leurs R, Timmerman H, Giovanni MG. 1996b. Histamine H<sub>3</sub> receptor inhibition of K<sup>+</sup> evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm. Res.* 45, 54-55.

Blandina P, Marcel E, Gabriele C, Mannaioni P y Passani M. 2004. Acetylcholine, histamine and cognition: two sides of the same coin. *Learn Mem* 11, 1-8.

Braun J, Kiefer S y Ouellet J. 1981. Research note psychic ageusia in rats lacking gustatory neocortex. *Exp Neurol.* 72, 711-716.

Bures J, Bermúdez-Rattoni F y Yamamoto T. 1998. *Conditioned Taste Aversion: Memory of a special kind.* New York: Oxford University Press.

Burkey A, Carstens E, Wenniger J, Tang J y Jasmin L. 1996. An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *J Neurosci.* 16, 6612–6623.

Burkey A, Carstens E y Jasmin L. 1999. Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. *J Neurosci.* 19, 4169–4179.

Buzsaki G y Gage FH. 1989. *The cholinergic nucleus basalis: a key structure in neocortical arousal.* EXS. 159-171. Boston: Birkhauser Verlag.

Cangioli, Baldi E, Mannaioni P, Bucherelli C, Blandina P y Passani M. 2002. Activation of histaminergic H<sub>3</sub> receptors in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. *Eur J Neurosci.* 16, 521-528.

Ceppetto DF y Saper CB. 1987. Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *J Comp. Neurol.* 262, 27–45.

Cecchi M, Giorgetti M, Bacciottini L, Giovannini M y Blandina P. 1998. Increase of acetylcholine release from rat cortex of freely moving rats by administration of histamine into nucleus basalis magnocellularis. *Inflam Res.* 47, 32-33.

Cecchi M, Passani M, Bacciottini L, Mannaioni P y Blandina P. 2001. Cortical acetylcholine release elicited by stimulation of histamine H1 receptors in the nucleus basalis magnocellularis. A dual probe microdialysis study in the freely moving rat. *Eur J Neurosci.* 15, 66-76.

Clampham J y Kilpatrick GJ. 1992. Histamine H3 receptor modulate the release of acetylcholine from slices of rat enthorinal cortex ; eviedence for the possible existence of H<sub>3</sub> receptor subtypes. *Br J Pharmacol.* 107, 919-923.

Coyle J, Donald L, DeLong M. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 219,1184-1186.

Craig AD, Chen K, Bandy D y Reiman EM. 2000. Thermosensory activation of insular cortex. *Nat Neurosci.* 3, 184-190.

Craig AD. 2002. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci.* 3, 655-666.

Craig AD. 2003. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol.* 13: 500-505.

Dade LA, Zatorre RJ y Jones –Gotman M. 2002. Olfactory learning: Convergent findings from lesion and brain imaging studies in humans. *Brain.* 125, 86-10.

Davies P, Maloney A. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2, 1403-1405

De Almeida M, Izquierdo I. 1988. Intracerebroventricular histamine, but not 48/80, cause posttraining memory facilitation in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 291, 202-207

De Almeida M, Izquierdo I. 1994. Memory facilitation by histamine. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 17, 208-214.

Decker MW. 1987. The effects of aging and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res.* 12, 423-428

Dudai Y. 1989. *The neurobiology of memory.* Oxford University Press.

Dunn LT y Everitt BJ. 1988. Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav Neurosci.* 102, 3–23.

Dutar O, Rascol O y Lamour Y. 1989. Rhythmical bursting activity and GABAergic mechanisms in the medial septum of normal and pertussis toxin-pretreated rats. *Exp Brain Res.* 77, 374-380

Dykes R, Metharate R y Tremblay N. 1990. Transient and prolonged effects of acetylcholine on responsiveness of cat somatosensory cortical neurons. *J Neurophysiol.* 63, 223

Dykes RW, 1997. Mechanisms controlling neural plasticity in somatosensory cortex. *Can J Physiol Pharmacol.* 75, 535-545.

Ericsson H. 1991. GABA-like immunoreactivity in the tuberomammillary nucleus in the rat brain: Delineation of subgroups with antibody against L-histidina descarboxilasa as marker. *J. Comp Neurol.* 305, 462-469.

Everitt BL y Robbins TW. 1997. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol.* 48, 649-684.

Ferreira G, Miranda MI, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ y Bermúdez-Rattoni F. 2005. Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci.* 22, 2596–2604.

Freund TF, Meskenaite V. 1992.  $\gamma$ -aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl Aca Sci. USA.* 89, 783-42.

Gerfen CR y Clavier RM. 1979. Neural inputs to the prefrontal agranular insular cortex in the rat: Horseradish peroxidase study. *Brain Res Bull.* 4, 347–353

Ghaem O, Mellet E, Crivello F, Tzourio N, Mazoyer B, Berthoz A y Denis M. 1997. Mental navigation along memorized routes activates the hippocampus, precuneus and insula. *Neuroreport.* 8, 739-744.

Giorgetti M, Bacciottini L, Bianchi L, Giovannini M G, Cecchi M. 1997. Blandina P. GABAergic mechanism in histamine H<sub>3</sub> receptor inhibition of K<sup>+</sup>-evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm Res.* 46, 3-4.

Giorgetti M, Bacciottini L, Giovannini MG, Colivichi MA, Goldfarb J, Blandina P. 2000 Local GABAergic modulation of acetylcholine release from the cortex of freely moving rats. *Eur J Neurosci.* 12, 1941-1948.

Giovannini MG, Bartolini L, Bacciottini L, Greco L, Blandina P. 1999. Effects of histamine H<sub>3</sub> receptor agonists and antagonists on cognitive performance and scopolamine-induced amnesia. *Behav Brain Res.* 104, 146-155.

Godbout R, Mantz J, Pirot S, Glowinski J y Thierry AM. 1991. Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic neurons on their target cells: Electrophysiological and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 258, 728–738.

Goldman-Rakic PS. 1998. The cortical dopamine system: Role in memory and cognition. *Adv Pharmacol.* 42, 707–711.

Gorelova N, Seamans JK y Yang CR. 2002. Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol.* 88, 3150–3166.

Gratton A, Hoffer BJ and Freedman R. 1987. Electrophysiological effects of phencyclidine in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropharmacology.* 26, 1275–1283.

Gritti I, Mainville L y Jones BE. 1994. Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol.* 295, 251-268.

Gritti I, Mainville L, Mancina M y Jones BE. 1997, GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J Comp Neurol.* 383,163-177.

Hanamori T, Kunitake T, Kato K y Kannan H. 1997. Convergence of oropharyngolaryngeal, baroreceptor and chemoreceptor afferents onto insular cortex neurons in rats. *Chem Senses.* 22, 339–406.

Hanamori T, Kunitake T, Kato K y Kannan H. 1998a. Neurons in the posterior insular cortex are responsive to gustatory stimulation of the pharyngolarynx, baroreceptor and chemoreceptor stimulation, and tail pinch in rats. *Brain Res.* 785, 97–106.

Hanamori T, Kunitake T, Kato K y Kannan H. 1998b. Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J Neurophysiol.* 79, 2535–2545.

Hurley KM, Herbert H, Moga MM y Saper CB. 1991. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 308, 249–276.

Iversen SD. 1998. The pharmacology of memory. *Acad Sci III.* 321: 209-215.

Inagaki N, Yamatodani A, Ando-Yamamoto M, Tohyama M, Watanabe T, Wada H. 1988. Organization of histaminergic fibers in the rat brain. *J Comp Neurol.* 273, 283-300.

Khateb A, Fort P, Pegna A, Jones BE, Muhlethaler M. 1995. Cholinergic nucleus basalis neurons are excited by histamine in vitro. *Neuroscience.* 69, 495-506.

Krettek JE y Price JL. 1977a. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 171, 157–191.

Krettek JE y Price JL. 1977b. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 172, 687–722.

Köhler C, Ericson H, Watanabe T, Polak J, Palay SL, Palay V y Chari-Palay V. 1986. Galanin immunoreactivity in hypothalamic histamine neurons. Further evidence for multiple chemical messengers in the tuberomammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurosci.* 250, 58-64.

Kuhl DE, Loeppel RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. 1999. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimers disease. *Neurology.* 52, 691-699.

Lamour Y, Dutar P y Jobert A. 1984. Septohippocampal and other medial septal-diagonal neurons: Electrophysiological and pharmacological properties. *Brain Res.* 309, 222-239.

Lashley K.S. 1950. In search of the engram. *Symp Soc Ex Biol.* 4, 454-482.

Leonard CM. 1969. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res.* 12, 321–343.

López-García, J.C., Fernández-Ruiz., Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F y Tapia 1993. Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 45, 147-152.

Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY y Basbaum AI. 1999. Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405, 299–321.

Mesulam M, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AL. 1983 Central cholinergic pathways in the rat : an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. 10, 1185-2201

Mesulam M, Volicic L, Marquis JK, Mufson EJ y Green RC. 1986. Systematic regional differences in the cholinergic innervation of the primate cerebral cortex : Distribution of enzyme activities and some behavioral implications. *Ann Neurol*. 19, 144-151.

Mesulam M. 1995. The cholinergic contribution to neuromodulation in the cerebral cortex. *Neuroscience*. 7, 297-307.

Miranda MI y 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 USA*. 96, 6478-6482.

Miranda MI, Ramírez-Lugo y Bermúdez-Rattoni F. 2000. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res*. 882, 235-330.

Miranda MI, Ferreira G, Ramírez L y Bermúdez-Rattoni F. 2002. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 6478-6482.

Miranda MI, Ferreira G, Ramírez-Lugo L y Bermúdez-Rattoni F. 2003. Role of cholinergic system on the construction of memories, taste memory encoding. *Neurobiol Learn Mem*. 80, 211-222.

Miranda MI y McGaugh JL. 2004. Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: Involvement of the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem*. 11, 312-317.

Mora F, Sweeney KF, Rolls ET y Sanguinetti AM. 1976. Spontaneous firing rate of neurones in the prefrontal cortex of the rat: Evidence for a dopaminergic inhibition. *Brain Res*. 116, 516-522.

Moron I, Ramírez-Lugo L, Ballesteros MA, Gutierrez R, Miranda MI, Gallo M y Bermúdez-Rattoni. 2002. Differential effects of bicuculine and muscimol microinjection into the nucleus basalis magnocellularis in taste and place aversive memory formation. *Behav Brain Res.* 134, 425-341.

Morriset S, traiffort E, Schwartz, J-C. 1996 Inhibition of histamine versus acetylcholine metabolism as a mechanism of tacrine activity. *Eur J Pharmacol.* 315, 1-2.

Müller GE y Pilzecker A. 1900. *Z. Psychology Ergänzungsband.*

Nicoll RA, 1985 The septo-hippocampal projection: a model cholinergic phatway. *Trends Neurosci.* 8 533-536.

Ogawa H y Nomura T. 1988. Receptive field properties of thalamocortical taste relay neurons in the parvicellular part of the posteromedial ventral nucleus in rats. *Exp Brain Res.* 73, 364–370.

Ogawa H, Ito S, Murayama N y Hasegawa K. 1990. Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neurosci Res.* 9, 196–201.

Panula P, Yang HY, Costa E. 1984. Histamine-containing neurons in rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81, 2572-2576.

Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MN. 1991. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience.* 43,457-72.

Passani M y Blandina P. 1998. Cognitive implications for H<sub>3</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors modulation of cortical cholinergic function: a parallel story. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 20, 725-733.

Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF y Blandina P. 2000. Central histaminergic system and cognitive processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 24, 107-114.

Pasani MB, Cangioli I, Bladi E, Bucherelli C, Mannaioni PF y Blandina P. 2001. Histamine H<sub>3</sub> receptor- mediated impairment of contextual fear conditioning and in vivo inhibition of cholinergic transmissi3n in the rat basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1522-1532.

Passani M y Blandina P. 2003. The neuronal histaminergic system in cognition. *Curr. Medical Chemical* (in press)

Paxinos G yWatson C. 2004. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4a. edici3n. New York: Academic Press.

Penit-Soria J, Audinat E y Crepel F. 1987. Excitation of rat prefrontal cortical neurons by dopamine: An in vitro electrophysiological study. *Brain Res.* 425, 263–274.

Petrovich GD, Risold PY y Swanson LW. 1996. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: APHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 374, 387–420.

Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J y Thierry AM. 1992. Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: Evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience.* 49, 857–865.

Rosenblum K, Meiri N y Dudai, Y. 1993. Taste memory: The role of protein synthesis in gustory cortex. *Behav Neurol Biol.* 59, 49-56.

Semba K, 1991. The cholinergic basal forebrain: a critical role in cortical arousal. In T.C. Napier PW, Kalivas and Hanin (Eds). *The basal forebrain: anatomy to function*. New York.

Semba K, Daddona PE, Watanabe T, Wu JY y Nagy JJ. 1985. Coexistence of adenosine deaminase, histidine decarboxylase, and glutamate descarboxylase in hypothalamic neurons of the rat. *J Neurosci.* 5, 3393-3420.

Shi CJ y Cassell MD. 1998a. Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. *J Comp Neurol.* 399, 469–491.

Shi CJ y Cassell MD. 1998b. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol.* 399, 440–468.

Siegel y Alberts. 2006 Brady Price, Seventh Edition. *Basic Neurochemistry.* Academic Press.

Suhara T, Nakayama K, Inoue O, Fukuda H, Shimizu M, Mori A y Tateno Y. 1992. D1 dopamine receptor binding in mood disorders measured by positron emission tomography. *Psychopharmacol.* 106, 14–18.

Sripanidkulchai K, Sripanidkulchai B y Wyss JM. 1984. The cortical projection of the basolateral amygdaloid nucleus in the rat: a retrograde fluorescent dye study. *J Comp Neurol.* 229, 419–431.

Sweatt JD. 2003. *Mechanism of Memory.* Houston. New York: Elsevier Academic Press.

Szymusiak R y McGinty 1990. State-dependent neurophysiology of the basal forebrain: relationship to sleep, arousal and thermoregulatory function. In Mancia and Marini (Eds) *The diencephalon and sleep.* New York: Raven Press.

Szymusiak R, 1995. Magnocellular Nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation. *Sleep.* 18, 478-500.

Tasaka K. 1994. The role of histamine on learning and memory. In: Tasaka K, editor. *New advances in histamine Research* Tokyo: Springer, 27-68.

Takeda N, Inagaki S, Taguchi Y, Tohyama M, Watanabe T, Wada H. 1984. Origins of histamine-containing fibers in cerebral cortex of rats studied by immunohistochemistry with histidine decarboxylase as a marker and transaction. *Brain Res.* 323, 55-63.

Wada H. 1984. Immunocytochemical evidence for the coexistence of histidine decarboxylase and glutamate decarboxylase like immunoreactivities in nerve cell of the posterior magnocellular nucleus of hypothalamus of rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81, 7467-7650.

Wada H, Inagaki N, Yamatodani A, Watanabe T. 1991. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Ther Neurosci*. 14, 415-8.

Wager TD y Smith EE. 2003. Neuroimaging studies of working memory: a meta analysis. *Cognitive Affect. Behav Neurosci*. 3, 255-274.

Watanabe M, Kodama T y Hikosaka K. 1997. Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J Neurophysiol*. 78, 2795–2798.

Wolf NJ, Eckenstein F y Butcher L. 1984. Cholinergic system in the rat brain: I Projections to the limbic telencephalon. *Brain Res. Bull*. 1, 751-754.

Wolf NJ. 1991. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol*. 37, 475-524.

Yamamoto T, Matsuo R y Kawamura Y. 1980a. Corticofugal effects on the activity of thalamic taste cells. *Brain Res*. 193, 258–262.

Yamamoto T, Matsuo R y Kawamura Y. 1980b. Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J Neurophysiol*. 44, 440–455.

Zhuravin IA, y Bures J. 1991. Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by papillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Exp Brain Res*, 83, 687-690.

## **XII. INDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Clasificación de la memoria	2
Figura 2.	Esquemas de las rutas de proyección en la rata	8
Figura 3.	Grafica de la liberación de ACh durante el bloqueo con TTX, durante la adquisición del CAS.	13
Figura 4.	Liberación de ACh dependiente del sabor novedoso	14
Figura 5.	Esquema de los principales sistemas colinérgicos en el cerebro de mamíferos	16
Figura 6.	Síntesis y metabolismo de la histamina	19
Figura 7.	Sistema histaminérgico del cerebro de la rata	20
Figura 8.	Dinámicas de la histamina	23
Figura 9.	Las distintas rutas de los receptores histaminérgicos	24
Figura 10.	Influencia de agonistas y antagonistas histaminérgicos durante la liberación de ACh.	26
Figura 11 A.	Registro de la liberación de ACh con el agonista/antagonista de H <sub>3</sub>	27
Figura 11 B.	Registro de la liberación de ACh con el agonista/antagonista de H <sub>3</sub>	28
Figura 12.	Esquema de las interacciones entre el sistema histaminérgico y colinérgico	30
Figura 13.	Cortes coronales del cerebro de rata, ubicación de cánulas en NBM y CI	34
Figura 14.	Procedimiento del condicionamiento de aversión al sabor	35
Figura 15.	Tabla que muestra la organización de la infusión de los fármacos	37
Figura 16.	Corte coronal que muestra la ubicación de cánulas en el NBM	37
Figura 17.	Corte coronal que muestra la ubicación de cánulas en la CI	38
Figura 18.	Gráfica de los valores obtenidos del experimento de pirilamina antes de la adquisición del CAS	40
Figura 19.	Gráfica de los valores obtenidos del experimento pirilamina antes de Prueba	41
Figura 20.	Gráfica de los valores obtenidos del experimento RAMH antes de la adquisición	42
Figura 21.	Gráfica de los valores obtenidos del experimento RAMH antes de prueba	43

### **XIII. ABREVIATURAS**

**AC**, adenilato ciclasa

**ACh**, acetilcolina

**ADQ**, adquisición

**AMPc**, adenosin monofosfato cíclico

**ANDEVA**, análisis de la varianza

**AP**, anteroposterior

**ATP**, adenosin trifosfato

**BLA**, amígdala basolateral

**CAB**, cerebro anterior basal

**CAS**, condicionamiento de aversión al sabor

**ChAT**, acetilcolinesterasa

**CI**, corteza insular

**CIAR**, corteza isular agranular rostral

**DAG**, diacilglicerol

**DAO**, diamina oxidasa

**EC**, estímulo condicionado

**EI**, estímulo incondicionado

**EXT**, extinción

**GABA**, ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GMPc**, guanosin monofosfato cíclico

**HDC**, histidina descarboxilasa

**HMT**, histamina metiltransferasa

**i.p.**, intraperitoneal

**IP<sub>3</sub>**, inositol 1, 4,5-trifosfato

**L**, lateral

**LB**, línea base

**MAO**, monoaminoxidasa

**MAPK**, mapcinasa

**min**, minutos

**NIH**, instituto nacional de salud

**NTS**, núcleo del tracto solitario  
**PBA**, prueba  
**PBN**, núcleo parabraquial  
**PI**, fosfatidilinositol  
**PKC**, proteína cinasa C  
**PKA**, proteína cinasa A  
**PLA**, fofolipasa A<sub>2</sub>  
**PLC**, fofolipasa C  
**RAMH**, R- $\alpha$ -metilhistamina  
**RC**, respuesta condicionada  
**RI**, respuesta incondicionada  
**TTX**, tetradoxina  
**UNAM**, universidad autónoma de México  
**V**, ventral  
**VPM**, tálamo ventral posteromedial