



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Ciencias

Participación de los receptores dopaminérgicos D1 en la Corteza Insular de rata en la formación de la memoria gustativa de aversión

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGA**

PRESENTA

**Erika Roxana Bautista Arredondo**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

---

**Jurado asignado:**

Presidente	Dr. Federico Bermúdez Rattoni.
Vocal	M en C. Beatriz Rodarte Murgía.
Secretaria	QFB. Kioko Rubí Guzmán Ramos.
1er. Suplente	Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez.
2°. Suplente	MVZ. Héctor Alfonso Malagón Rivero.

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, CIUDAD UNIVERSITARIA

---

---

## **AGRADECIMIENTOS.**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México, el cual se encuentra a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattóni y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 60478.

A la QFB. Kioko Rubí Guzmán Ramos por todo su apoyo, sus enseñanzas y por haber dirigido el presente trabajo.

A la M en C. Beatriz Rodarte Murguía, Al Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez y al MVZ. Héctor Alfonso Malagón, por sus enriquecedores comentarios a ésta tesis.

A Oreste Carvajal por toda su ayuda incondicional.

---

---

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar quiero darle todo mi agradecimiento a los meros meros: a Cesar Lenin Trejo de la Cruz, por todo el apoyo y amor que me da día a día , por creer ciegamente en mí y a mis hijos Khaly y Lenin por ser mi energía y la fuerza vital que le da sentido a mi vida. ¡¡¡GRACIAS!!! ,¡¡¡LOS AMO!!!

A mis papas por todo su cariño. Mami quiero agradecerte con todo mi ser por haberme dado tu fortaleza y a ti Papi por estar siempre conmigo incondicionalmente, por escucharme siempre y por tus sabios consejos.

A mi gran hermana, a la que admiro, quiero con todo mi corazón y de la que estoy más que orgullosa. A mis primos Ana, Rocio, Miguel, Eduardo por toda la vida compartida, por nuestras alegrías y tristezas (OHANA).

Éste trabajo es dedicado especialmente a la memoria de mi primo Alejandro a quien queremos y extrañamos.

A mis grandes amigos: los de ahora y los del pasado por su gran compañía, apoyo y cariño, recordándoles que por uds. muchos momentos difíciles se hicieron más fáciles y los buenos se hicieron aún más buenos y divertidos. Muy en especial a Dafne, Diana, Mayra, Fabiola, Marisol, Lizbeth y Arturo con quienes he vivido momentos inigualables.

---

---

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	iii
Resumen .....	iii
I. INTRODUCCIÓN	
1. Memoria .....	1
2. Aprendizaje gustativo: Condicionamiento de Aversión al sabor (CAS) .....	3
3. Vías neurales implicadas en el aprendizaje gustativo .....	4
4. Corteza insular .....	5
4.1 Sistema dopaminérgico involucrado en el CAS .....	6
4.2 Sistema glutamatérgico involucrado en el CAS .....	10
4.3 Interacción de los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico .....	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS .....	14
III. PARTE EXPERIMENTAL	
1. Animales .....	16
2. Implantación de cánulas guía .....	16
3. Protocolo conductual del Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS) .....	17
4. Microinyecciones intracorticales .....	18
5. Fármacos .....	18
6. Análisis de resultados .....	18
7. Histología .....	19

---

---

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
V. CONCLUSIONES .....	32
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	33

---

---

## ABREVIATURAS

AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
AP	Área postrema
CAMKII	Cinasa calcio/calmodulina II
CAS	Condicionamiento de aversión a los sabores
CI	Corteza insular
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CREB	The c-AMP responsive element binding protein (por sus siglas en inglés)
DARPP-32	Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of Mr 32 kDa (por sus siglas en inglés)
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
HVA	Ácido homovanílico
i.p.	Intraperitoneal
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LiCl	Cloruro de litio
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAO	Monoamino-oxidasa
MCP	Memoria a corto plazo
MLP	Memoria a largo plazo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPBd	Núcleo parabraquial dorsolateral
NTSc	Núcleo del tracto solitario caudal
NTSr	Núcleo del tracto solitario rostral
6-OHDA	6-hidroxídopamina
PKA	Protein cinasa dependiente de AMPc
PP1	Proteína fosfatasa 1
Rp-AMPC	Diasterómero inhibidor de PKA
SCH-23390	R-(+)-8-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-5-fenil-14-benzacepina-7-ol
SKF-38393	1-fenil-7,8-diol-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzacepina
SS	Solución salina
TH	Tirosina hidroxilasa
TTX	Tetradotoxina
VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo



## RESUMEN

Se ha evaluado la participación de la dopamina en procesos de aprendizaje y memoria y se ha comprobado que esta catecolamina es indispensable para la formación de la memoria de distintas tareas, entre las que se encuentra el condicionamiento de aversión a los sabores (CAS). Este condicionamiento consiste en la presentación de un sabor nuevo que es pareado con una inyección de cloruro de litio (LiCl) para producir malestar gástrico, lo que tendrá como consecuencia que el animal disminuya el consumo de dicho sabor al ser presentado nuevamente. Una estructura importante para la formación de dicha memoria es la corteza insular (CI), donde la participación del sistema dopaminérgico es poco conocida.

Se sabe que en la CI, hay un aumento de dopamina al presentar un estímulo gustativo novedoso y que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos tipo D1 afectan la consolidación del CAS (Berman et al., 2000, Guzmán & Bermúdez 2007). Por ello uno de los objetivos de este trabajo, fue probar si era posible modular la consolidación mediante la activación de los receptores D1. Para lo que se administró en corteza insular el agonista SKF-38393 antes de la adquisición. Los resultados obtenidos muestran que con la administración de este agonista no se consolida el CAS.

Otras evidencias han mostrado que el fortalecimiento de diferentes tareas de aversión se da a través de la potenciación de los receptores NMDA por los D1 vía proteína cinasa A (Bernabeu *et al.*, 1997, Izquierdo *et al.*, 1998, Barros *et al.*, 2003). Por lo que se estudió si la actividad de esta cinasa participaba en la formación de la memoria del CAS. Con la administración de Rp-AMPC (un inhibidor de PKA) en corteza insular antes y después del condicionamiento, se comprobó que dicha cinasa desempeña un papel importante en la consolidación del CAS.

Con los experimentos realizados se confirma que la participación de los receptores D1 y su adecuada regulación, así como la activación de PKA son requeridas para la formación de la memoria del CAS.

## I. INTRODUCCIÓN.

### 1. Memoria.

El aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos conocimiento sobre el mundo, mientras que la memoria es el proceso por el cual dicho conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado (Kandel *et al.*, 2001).

El estudio de la memoria estuvo restringido a la filosofía hasta finales del siglo XIX. En 1885 el trabajo de Hermann Ebbinghaus, que fue el primero en analizar sistemáticamente la memoria, permitió clasificar ésta de acuerdo a su duración; determinó que existen memorias que duran minutos y otras que persisten días o semanas. George Müller y Alfons Pilzecker acuñaron el término “consolidación”, el cual se refiere a la estabilización de la memoria. Posteriormente William James hizo una distinción cualitativa entre Memoria de Corto Plazo (MCP) que se refiere a aquellas memorias que duran minutos u horas y que no dependen de síntesis de proteínas y llamó Memoria de Largo Plazo (MLP) a aquellas memorias que duran meses o años y que son dependientes de síntesis de proteínas (Bermúdez *et al.*, 2001, Milner *et al.*, 1998).

Uno de los casos más trascendentales para el estudio de la memoria fue el caso H.M. (anónimo) estudiado por Brenda Milner en 1953. Un varón de 27 años de edad fue sometido a una cirugía en la cual se le extirpó el lóbulo temporal como tratamiento para ataques epilépticos severos. La consecuencia de dicha cirugía fue la incapacidad de H.M. para almacenar nuevas memorias, sin embargo recordaba todos los eventos previos a la extracción quirúrgica. Se creyó que la incapacidad de H.M. para formar nuevas memorias era absoluta, así que Brenda Milner para investigar esto sometió a H.M. a varias tareas conductuales, en una de ellas H.M tenía que repintar el contorno de una estrella viéndolo a través de un espejo; H.M. aprendió a ejecutar la tarea como un individuo normal, mejorando con cada sesión de práctica a lo largo de los días. Sin embargo, lo más sobresaliente era que antes de cada nueva sesión de entrenamiento había que explicarle en qué consistía la prueba, pues él afirmaba que nunca antes la había realizado (Milner *et al.*, 1998, Bermudez *et al.*, 2001, Kandel *et al.*, 2001). Ésto demostró que los sitios neuronales donde reside la memoria son varios y que existe más de un sistema de memoria.

A un sistema de memoria se le llama “No declarativa o Implícita” que se adquiere con la repetición de una tarea y posee las características de una acción refleja, su uso es automático y su formación y evocación no requieren participación consciente. El otro sistema de memoria se conoce como “Memoria declarativa o Explícita” en el cual la adquisición y evocación requieren de la participación consciente (Milner *et al.*, 1998, Bermudez *et al.*, 2001).

Dentro de la memoria implícita se encuentra el condicionamiento clásico, que fue descrito por el fisiólogo ruso Iván Pavlov (1927). En el cual los animales aprenden a asociar dos estímulos, uno neutral denominado **estímulo condicionado (EC)** y un estímulo que es innato, no aprendido llamado **estímulo incondicional (EI)** que se denominó así dado que ocurren de manera incondicional. Después de parear varias veces el EC al EI, la sola presentación del EC puede provocar una respuesta condicionada (**RC**). Por ejemplo, si alguien aplaude cerca de un perro, éste puede responder de varias maneras, pero no es probable que la salivación sea una de ellas, pero si alguien aplaude (EC) y de inmediato coloca trozos de pan (EI) en el hocico del perro y este procedimiento es repetido en varias ocasiones, el perro salivará (RC) cuando alguien aplauda (Chance 1999).

Para el estudio de la memoria y sus diferentes etapas se emplea el Condicionamiento de Aversión a los Sabores (CAS), que es considerado un modelo de condicionamiento clásico.

## 2. Aprendizaje gustativo: Condicionamiento de Aversión al Sabor.

Para sobrevivir los animales necesitan aprender cuando un alimento es seguro. En los 50s John García comenzó a estudiar los efectos que los rayos  $\gamma$  tenían sobre los animales. Dicho investigador encontró que los animales que eran irradiados después de comer o tomar agua con un sabor específico, varios días después rechazaban cualquier alimento o agua que tuviera el mismo sabor. A este procedimiento se le llamó condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) (Bermudez-Rattoni *et al.*, 2001; García *et al.*, 1985; Bures *et al.*, 1998).

En el protocolo de este trabajo la presentación del sabor nuevo es asociado con la inducción de malestar gástrico por medio de la administración intraperitoneal de cloruro de litio, de tal manera que al presentar de nuevo dicho sabor el animal tiende a disminuir su consumo (ver Fig. 1). Este modelo tiene varias ventajas metodológicas: 1) puede establecerse un CAS fuerte al parear una sola vez el sabor con el malestar, 2) es posible formar el CAS aún cuando hayan pasado varias horas entre la exposición al sabor y la llegada del malestar, 3) permite estudiar las diferentes etapas de la memoria, 4) se conocen las vías neuronales implicadas en el CAS (Yamamoto *et al.*, 1998).

La figura 1 esquematiza la fase de adquisición (asociación entre el sabor y el malestar gástrico) y la prueba (posterior presentación del mismo sabor en donde se evalúa si el animal recuerda que le hizo daño).

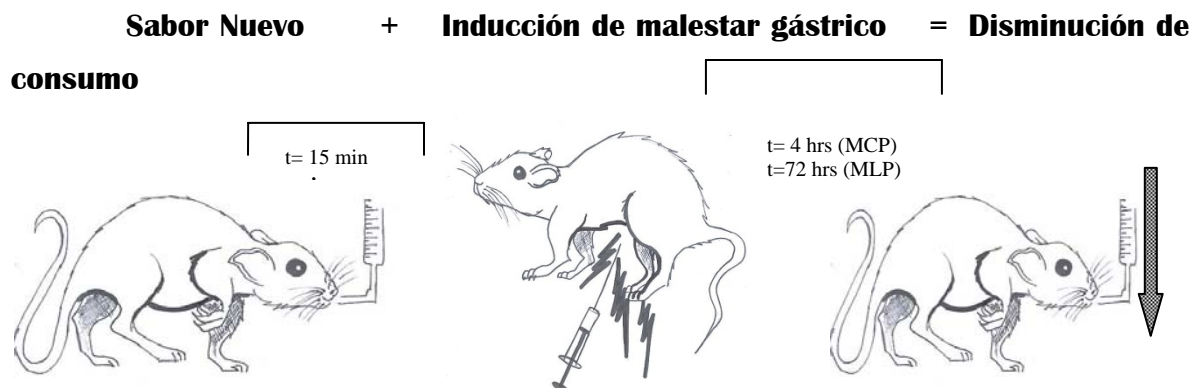


Fig 1. Procedimiento del condicionamiento aversivo a los sabores. Se presenta un sabor novedoso seguido de la inducción de malestar gástrico, en la siguiente presentación el animal disminuye su consumo como reflejo del aprendizaje de la tarea (representado por la flecha).

### 3. Vías neurales implicadas en el aprendizaje gustativo.

**Codificación del estímulo gustativo:** Comienza cuando el sabor hace contacto con la cavidad oral, mediante los nervios craneales facial (VII) y glossofaríngeo (IX) con contribución del nervio vago (X) que inervan la lengua y la cara, posteriormente la información es llevada al núcleo del tracto solitario rostral (NTSr). Desde aquí la información llega al núcleo parabraquial dorsolateral (NPBd), el cuál tiene proyecciones hacia el hipotálamo lateral, amígdala central y basolateral, a la estría terminal y hacia el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM). Desde el VPM, la información gustativa finalmente llega a la corteza gustativa en la corteza insular (CI, Fig.2) (Bermudez-Rattoni, 2004; Welzl, 2001).

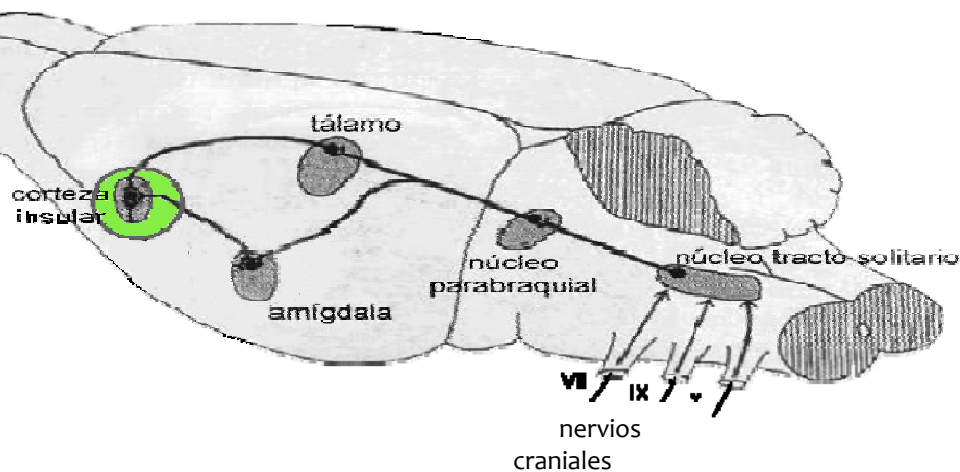


Fig 2. Esquema simplificado de las vías neurológicas implicadas en la codificación de la memoria gustativa. Tomado de Yamamoto et al., 1998.

**Codificación del estímulo visceral (malestar gástrico):** El núcleo del tracto solitario caudal (NTSc) recibe proyecciones del nervio vago que es sensible a irritación gástrica y del área postrema (AP) que es sensible a toxinas presentes en la sangre. Las proyecciones del NTSc llegan al núcleo parabraquial externo lateral, la amígdala central y el núcleo hipotálamico paraventricular. El NPBd tiene proyecciones hacia la parte ventral posterolateral del tálamo, que junto con la amígdala central presenta eferencias hacia la CI (Bermudez-Rattoni, 2004; Bures *et al.*, 1998).

#### 4. *Corteza Insular (CI).*

En la rata la región de la CI ocupa una posición marginal en la superficie lateral del hemisferio cerebral, entre el surco rinal y la arteria cerebromedial. Por sus características histológicas esta estructura se encuentra dividida en: granular, disgranular y agranular y se ha propuesto que la integración cortical de la información gustativa ocurre en la corteza insular agranular (Sewards & Sewards, 2001; Aleksandrov & Fedorova, 2003).

La CI es una de las estructuras más estudiadas en la memoria de aversión debido a que las conexiones anatómicas sugieren que esta región del cerebro desempeña un papel importante en la integración y almacenamiento de la información visceral y gustativa (Bures *et al.*, 1998).

Las áreas que envían aferencias a la CI incluyen al núcleo talámico medial, hipotálamo lateral, corteza cingulada, corteza prefrontal medial, área lateral parabraquial y núcleo acumbens (Ohara *et al.*, 2003). En particular la CI ha sido relacionada con el sistema dopaminérgico mesocortical y recibe proyecciones del área ventral tegmental (Coffen *et al.*, 2007).

La CI es esencial para la adquisición y retención del CAS. Dunn y Everit reportaron que el ácido iboténico produce lesiones excitotóxicas en la CI que impiden el aprendizaje del CAS (Dunn & Everit, 1988). Otros estudios muestran que las lesiones en CI atenúan la adquisición y evocación del CAS (Bures *et al.*, 1998). También se ha visto que la inyección intracortical de tetrodoxina (TTX) en la CI induce la inactivación temporal de los canales de sodio, que administradas antes de presentar un sabor nuevo impiden la formación del CAS (Jiménez & Tapia, 2004; Bermudez-Ratonni, 2007).

#### 4.1 Sistema dopaminérgico involucrado en el CAS.

La dopamina es un neurotransmisor que pertenece al grupo de las catecolaminas, su síntesis tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas a partir del aminoácido tirosina. La primera enzima en la biosíntesis de la dopamina es la tirosina hidroxilasa que convierte la tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) la cual es el paso limitante en su síntesis. En su segunda etapa la L-DOPA produce dopamina y CO<sub>2</sub> (Kandel *et al.*, 2001).

Los transportadores constituyen el principal mecanismo para finalizar la transmisión sináptica. La dopamina recapturada es convertida por la enzima monoamino-oxidasa (MAO), presente en el interior de la terminal nerviosa en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Bahena *et al.*, 2000).

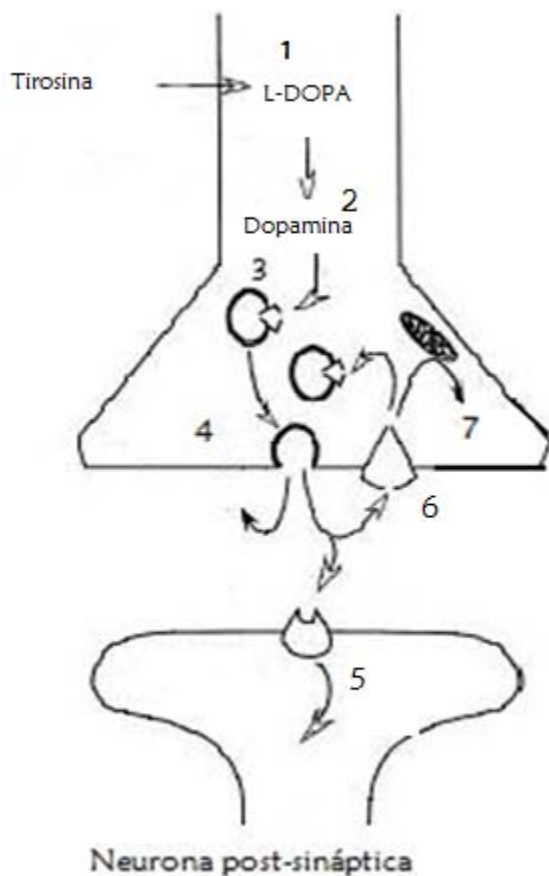


Fig. 3. En el esquema se muestra la síntesis de dopamina en la terminal presináptica. La tirosina es convertida por la tirosina hidroxilasa (TH) en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (1), la L-DOPA a través de la descarboxilasa produce dopamina (2), la cual es empaquetada en vesículas sinápticas (3) y transportada hacia la membrana pre-sináptica, la vesícula se fusiona con la membrana celular pre-sináptica y la dopamina es liberada hacia el espacio extracelular (4). La dopamina liberada llega a los receptores post-sinápticos (5), la dopamina excedente es recapturada a través de transportadores que se encuentran en la neurona pre-sináptica (6) y degradada por las enzimas monoamino-oxidasa (MAO) y catecol O-metiltransferasa COMT(7). Tomado de <http://encolombia.com/medicina>

Todos los receptores dopaminérgicos poseen siete dominios transmembranales, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno, y están acoplados a sistemas de transducción intracelulares mediante proteínas G. Con base a sus características moleculares se han descrito cinco subtipos de receptores para dopamina, que se han agrupados en dos familias: la  $D_1$  en donde se encuentran los receptores  $D_1$  y  $D_5$ , así como la familia  $D_2$  a donde pertenecen los receptores  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$ . Los receptores de la familia  $D_1$  estimulan a la enzima adenilato ciclasa para producir adenosina monofosfato cíclico ( $AMP_c$ ); en tanto que la activación de los receptores pertenecientes a la familia  $D_2$  inhibe su formación. Se ha reportado también que en la corteza cerebral frontal, la activación del receptor  $D_1$  induce la producción de otros segundos mensajeros, como el 1,4,5-inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y el diacilglicerol (DAG), por estimulación de la fosfolipasa C (Fig. 4) (Bahena *et al.*, 2000).

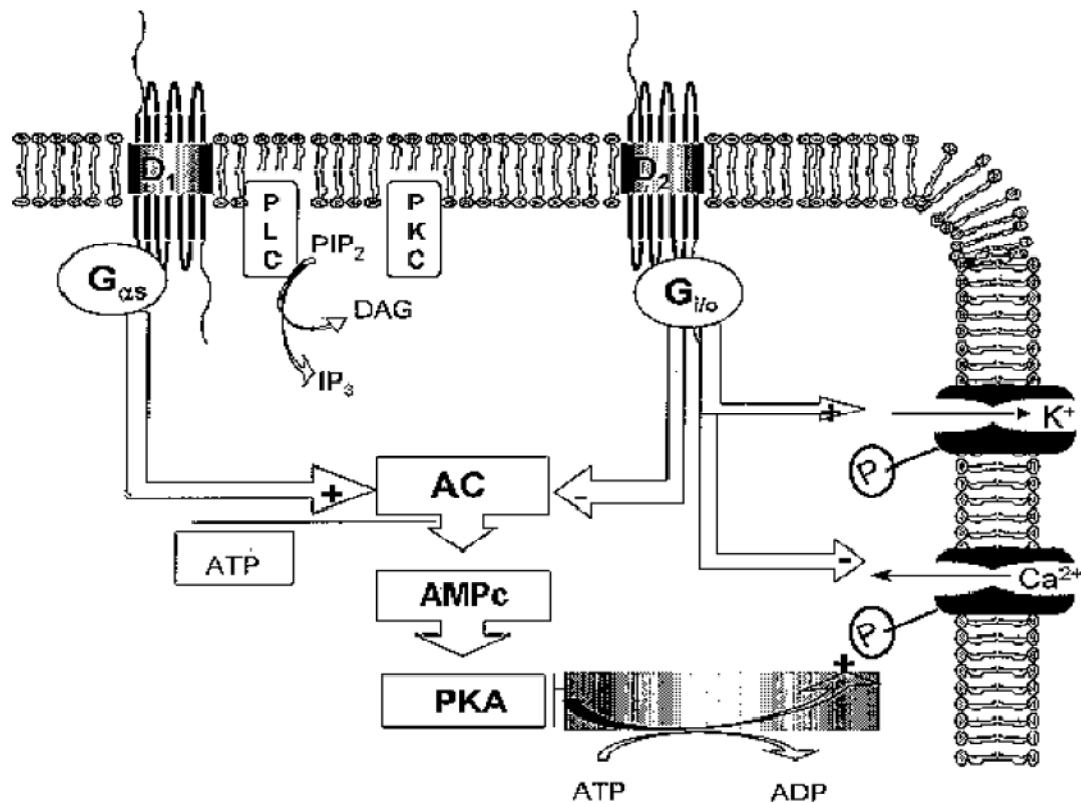


Fig 4. Mecanismos de transducción de señales acoplados a las familias  $D_1$  y  $D_5$ . Los receptores dopaminérgicos se encuentran acoplados a proteínas G, la familia de receptores  $D_1$  estimulan a la enzima adenilato ciclasa lo cual conlleva a la producción de adenosina monofosfato cíclico ( $AMP_c$ ) la que a su vez



activa a PKA, mientras que la familia de receptores D2 inhiben esta señalización. Otros segundos mensajeros activados son: DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, 1,4,5-inositol trifosfato. Tomado de Bahena *et al.* 2000

Existen cuatro vías dopaminérgicas: 1) la vía nigroestriatal que va de la sustancia nigra al estriado y es importante para el control del movimiento, se ve afectada en la enfermedad del Parkinson y en otros trastornos del movimiento, 2) la vía mesolímbica que va del área ventral tegmental al sistema límbico y es importante en procesos afectivos, emocionales y motivacionales, su mal funcionamiento está relacionado con la adicción a las drogas, 3) la vía tuberoinfundibular se origina en el hipotálamo, se proyecta hacia la hipófisis y se ha visto involucrada en la secreción hormonal y 4) la vía mesocortical que va del área ventral tegmental hacia la corteza y está involucrada en procesos cognitivos y de memoria. De la vía mesocortical llega la dopamina a la CI (Kandel *et al.*, 2001).

Lesiones en la CI con 6-OHDA (6-hidroxidopamina) una neurotoxina que destruye las terminales catecolaminérgicas provoca que los niveles de las mismas disminuyan en esta estructura. Los niveles de dopamina encontrados en animales lesionados revelan una disminución del 88.8 % de dopamina comparados con animales control, esta disminución tiene un papel importante en la adquisición del CAS (Fernández-Ruíz *et al.*, 1993).

También se han descrito cambios extracelulares de la dopamina en la CI por medio de la técnica de microdiálisis, la cual permitió demostrar que al presentar un estímulo gustativo nuevo incrementa la liberación de esta catecolamina (Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2007).

Mediante la administración de un antagonista de los receptores D1, el SCH-23390 (R-(+)-8-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-5-fenil-14-benzazepina-7-ol) en la CI antes de la adquisición se afecta la MLP pero no la MCP del CAS (Berman *et al.*, 2000; Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2007), demostrando así que los receptores D1 están involucrados en la codificación del estímulo gustativo y en la consolidación del CAS.

Estudios realizados en otro tipo de condicionamiento de aversión, muestran que la actividad de los receptores D1 en la corteza prefrontal es importante en la tarea del condicionamiento al miedo<sup>1</sup>, ya que al bloquearlos con SCH-23390 15 minutos antes del condicionamiento no se afecta la adquisición pero si se impide la formación de la MLP, lo cual señala que la actividad de los receptores D1 son importantes para la consolidación de dicho condicionamiento pero no para su adquisición (Runyan & Dash., 2004).

También se ha evaluado la participación de los receptores D1 a través de microinyecciones de SKF-38393 (agonista de los receptores D1; 1-fenil-7,8-diol-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepina). Se ha encontrado que microinyecciones en el hipocampo y en la corteza entorrinal de SKF-38393 a varias dosis: 0.3, 1.5 y 7.5 µg/µL administradas antes de la presentación del estímulo, mejoran la MLP de la tarea de prevención pasiva<sup>2</sup> (Bernabeu *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2003).

---

<sup>1</sup> El entrenamiento de esta tarea consiste en presentar un tono que es asociado con un choque eléctrico en las patas del animal, la memoria se mide como porcentaje de inmovilidad al presentar el tono.

<sup>2</sup> En esta tarea se mide la latencia del animal en bajar de un escalón a una rejilla electrificada.

#### 4.2 Sistema glutamatérgico involucrado en el CAS

Entre los neurotransmisores que forman parte del grupo de los aminoácidos se encuentra el glutamato, el cual es una sustancia excitatoria. El mayor precursor del glutamato en las terminaciones nerviosas es la glutamina, la cual es metabolizada a glutamato por la enzima glutaminasa. Luego de su empaquetamiento y liberación, el glutamato es retirado de la hendidura sináptica por los transportadores de glutamato de alta afinidad presentes tanto en células gliales como en las terminaciones presinápticas. Las células gliales contienen la enzima glutamina sintetasa, que convierte al glutamato en glutamina, la cual es entonces transportada fuera de las células gliales y hacia el interior de las terminaciones (ver fig. 5) (Purves *et al.*, 2003).

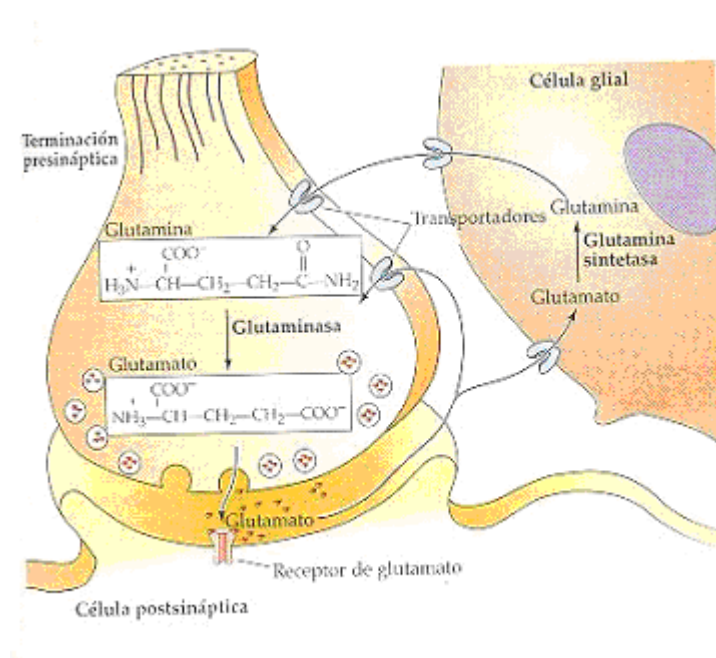


Fig. 5. Síntesis y reciclado del glutamato entre neuronas y glia. La acción del glutamato liberado en la hendidura sináptica es terminada por la captación en las neuronas y las células gliales circundantes mediante transportadores específicos. En el interior de la terminación nerviosa, la glutamina liberada por las células gliales es convertida nuevamente en glutamato.

Tomado de Purves *et al.* 2003

Existen dos clases de receptores del glutamato: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son canales catiónicos que al activarse causan despolarización neural generando un potencial postsináptico. Estos receptores son clasificados de acuerdo a la sensibilidad a análogos no fisiológicos del glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), y Kainato (KA) (ver fig. 6).

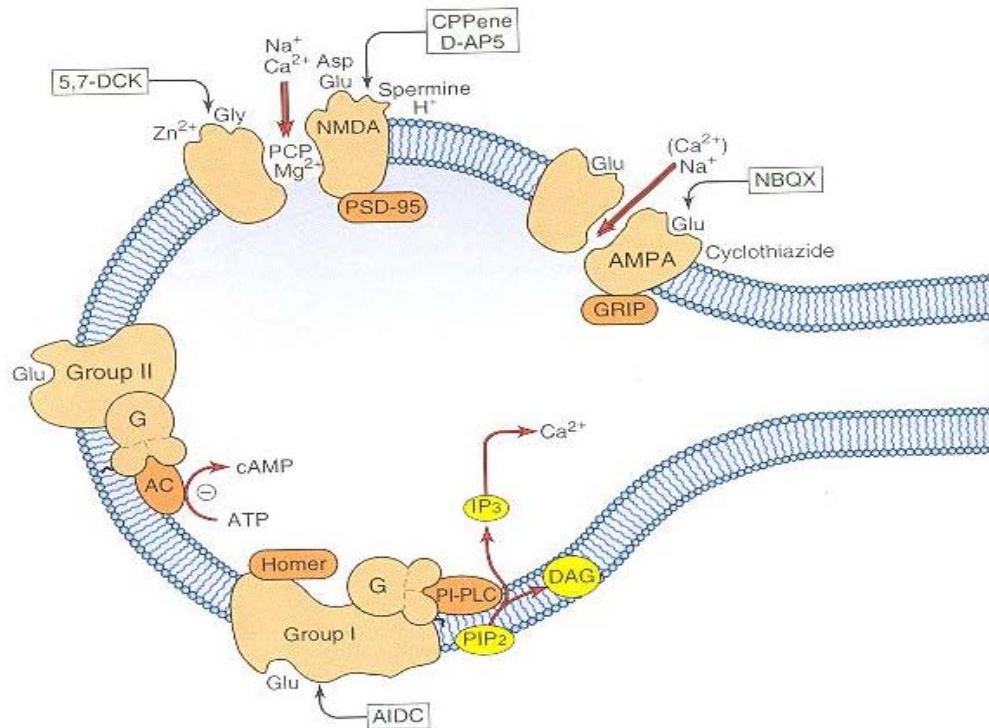


Fig. 6. Esquema que muestra 4 tipos de receptores de glutamato. Dos receptores iónicos mostrados son los AMPA y los NMDA (solo se muestran dos receptores iónicos debido a que el AMPA y KA son muy similares), así como los receptores metabotrópicos del grupo I y del grupo II. Los antagonistas competitivos son mostrados en las cajas. Ambas clases de receptores metabotrópicos están acoplados a enzimas intracelulares vía proteínas G, fosfolipasa C (PLC) en el caso del grupo I y el grupo II inhibe a adenilato ciclasa (AC). Tomado de Siegel et al. 2000.

Se ha propuesto que el glutamato participa en la codificación de la información del malestar gástrico en el CAS, estudios realizados con la técnica de microdiálisis han mostrado un aumento en la liberación de glutamato en la CI durante la administración de LiCl (Miranda *et al.*, 2002; Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2007).

Numerosos trabajos han involucrado la activación de los receptores NMDA en procesos que influyen en la estabilización de la MLP (Gutierrez et al., 1999; Ferreira *et al.*, 2002; Berman *et al.*, 2002). Microinyecciones en la CI con ácido fosfovalérico (APV, antagonista del receptor NMDA), administradas antes de presentar el estímulo novedoso o antes de la inyección intraperitoneal del LiCl, impiden la formación de la MLP del CAS pero no afectan la MCP (Rosenblum *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2001).

#### 4.3 Interacción de los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico.

La administración simultánea de agonistas de los receptores tipo D1 (SKF-38393) y de los receptores NMDA aumenta significativamente esta potenciación (Cepeda *et al.*, 1993; Smith-Roe & Kelley, 2000; Tseng & O'Donnell, 2004). En el núcleo acumbens y la corteza prefrontal la administración de antagonistas de los receptores D1 y NMDA impiden la adquisición de un aprendizaje instrumental (Baldwin *et al.*, 2002).

Los receptores D1 aumentan la producción de AMPc que a su vez activa a PKA que fosforila a los receptores NMDA en la subunidad NR1, de manera que pueden ser regulados por la dopamina a través de esta vía (Gretchen *et al.*, 1998). Adicional a esto, la administración de Rp-AMPC, un diastereoisómero de AMPc que bloquea a PKA inhibe la formación de la memoria de diferentes tareas en varias estructuras (ver fig.7) (Barros *et al.*, 2003; Caster & Williams, 2007; Cepeda *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1998).

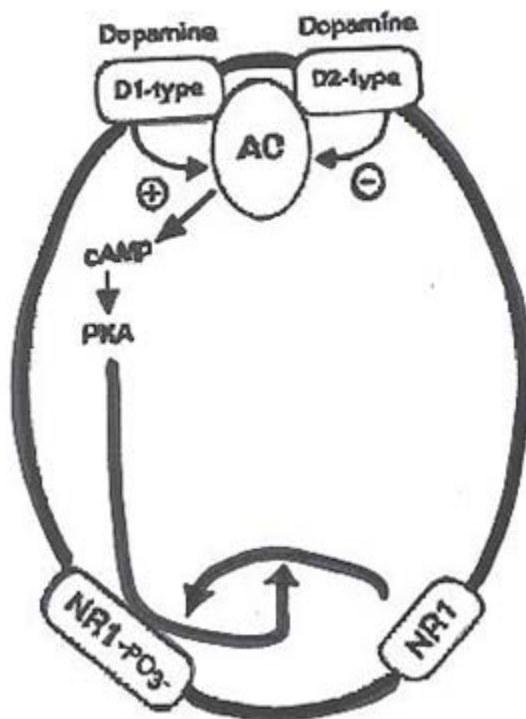


Fig.7. Se muestra el mecanismo propuesto de la regulación por DA a través de la fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA de glutamato. En este modelo la DA, por la activación de sus receptores D1 aumenta la actividad de la adenilato ciclasa que induce la formación de cAMP y la activación de PKA. La activación de los receptores tipo D2 de DA inhiben la formación de cAMP con lo que decrece la fosforilación de NR1.

D1-type: receptor tipo 1 de dopamina; D2-type: receptor tipo 2 de dopamina; AC adenilato ciclasa; PKA proteína cinasa dependiente de AMPc, NR1 subunidad de los receptores NMDA de glutamato. Esquema modificado de Snyder *et al.*, 1998.

Datos recientes a través del monitoreo de cambios extracelulares han mostrado que existen cambios relacionados con la asociación de los estímulos en el CAS. Se describió un aumento en la liberación de dopamina y glutamato que coincidían en temporalidad post-adquisición en el grupo condicionado (animales expuestos a sacarina al 0.1% seguida de LiCl 0.4 M i.p. y que da como resultado la formación del CAS) y que no fueron observados en el grupo no condicionado (animales expuestos a sacarina al 0.1% seguida de NaCl 0.4 M i.p. que no resulta en la formación del CAS), estos resultados sugieren que la liberación de dopamina y glutamato, está relacionada con la formación de la memoria del CAS. La comprobación de tal hipótesis se llevó a cabo mediante el bloqueo de los receptores D1 y NMDA simultáneamente, con lo que se afecta la estabilización de la MLP, comprobándose así que durante el proceso mnemónico la activación simultánea de los receptores D1 y NMDA contribuyen a la consolidación de dicha memoria (Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2007)

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

Como se ha mencionado anteriormente existe evidencia de que la exposición a un sabor nuevo genera cambios en la concentración extracelular de dopamina en la corteza insular mientras que la inducción del malestar gástrico involucra cambios corticales de glutamato en el condicionamiento de aversión a los sabores.

Con el monitoreo subsecuente a través de la microdiálisis se observa un aumento en la liberación de dopamina y glutamato que coinciden en temporalidad después del condicionamiento (alrededor de 50 min post-adquisición) y mediante el bloqueo de los receptores D1 y NMDA se comprobó que se afecta la estabilización de la memoria a largo plazo pero no la de corto plazo.

Hasta el momento se ha visto que el bloqueo de los receptores D1 afecta la memoria gustativa y que la administración del agonista SKF-38393, en otros condicionamientos de aversión mejora el desempeño en dichas tareas, pero no se ha visto el efecto de dicho agonista en la formación de la memoria del CAS.

Por otro lado se cuenta con evidencia de que los receptores D1 potencian las respuestas mediadas por los receptores NMDA a través de la fosforilación de la subunidad NR1 vía PKA. Sin embargo, no hay trabajos que indiquen que este mecanismo esté presente en el CAS.

### HIPÓTESIS

- I. Si el bloqueo de la actividad de los receptores D1 impide la formación de la memoria del CAS a largo plazo, entonces la activación de dichos receptores la mejorará.
- II. Se propone que la activación de los D1 potencian el funcionamiento de los NMDA vía PKA, por lo tanto si PKA es inhibida la interacción D1-NMDA se verá afectada y no se formará la memoria a largo plazo del CAS.

Los objetivos de esta tesis fueron:

- 1) Estudiar la participación de los receptores D1 en la formación de la memoria gustativa en la corteza insular a través de microinyecciones de un agonista (SKF 38393 a 5, 7.5 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) antes y después del estímulo gustativo.
- 2) Determinar si es necesaria la actividad de PKA para la adquisición y/o consolidación del CAS en la corteza insular a través de microinyecciones de un inhibidor de la enzima PKA (Rp-cAMP, 0.065  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 15 min antes del condicionamiento y 30 min después del mismo en diferentes grupos y evaluar la memoria a corto y largo plazo.



### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. Animales

Se emplearon 124 ratas macho Wistar de 60 días de nacidos y de 260-300 g de peso al momento de la cirugía. Se colocaron en cajas individuales en el vivario del Instituto de Fisiología Celular bajo las especificaciones técnicas de la NOM-062-200 y conforme al apéndice informativo de la misma norma (<http://amcal-ac.blogspot.com>).

#### 2. Implantación de cánulas guía

El objetivo de este procedimiento quirúrgico consiste en la implantación de dos cánulas bilaterales que permiten la administración de diferentes fármacos en la estructura que se desea estudiar. Los animales fueron anestesiados con ketamina (84 mg/kg) y xilacina (0.4 mg/kg) vía intraperitoneal y colocados en un aparato estereotáxico<sup>1</sup> (Stoelting 51600, Illinois, E.U.A; Fig. 8). Una vez retirada la piel el lugar de la implantación de las cánulas, se determinó, de acuerdo a coordenadas obtenidas del atlas Paxinos<sup>2</sup>, donde el punto de referencia antero-posterior (AP) es la unión de las suturas de los huesos craneales, llamada *Bregma*, la línea medial sagital como referencia lateral (L) y la superficie del cráneo como la referencia de profundidad (DV; ver fig. 8).

Las coordenadas empleadas para CI fueron AP= +1.2 mm, L=  $\pm$ 5.5mm y DV= -3 mm. Las cánulas fueron sujetas al cráneo con acrílico dental y dos tornillos; por último se aplicaron antibióticos tópicos para prevenir infección en el área. Los animales se recuperaron durante 5 días con agua y comida *ad libitum*.

---

<sup>1</sup> El aparato estereotáxico permite la correcta colocación de la cabeza del animal y el acceso al cerebro mediante un sistema de barras calibradas. Este instrumento se basa en el hecho de que es posible predecir la localización de una estructura cerebral a partir de puntos de referencia externos, visibles cuando el investigador sitúa al animal en el aparato estereotáxico y realiza un pequeño corte en la piel que recubre el cráneo, hasta que éste queda expuesto.

<sup>2</sup> El atlas estereotáxico es un conjunto de dibujos esquemáticos donde se representan secciones seriadas del cerebro de una determinada especie animal. Se suelen presentar secciones coronales (frontales o transversales), sagitales (o laterales) y horizontales.

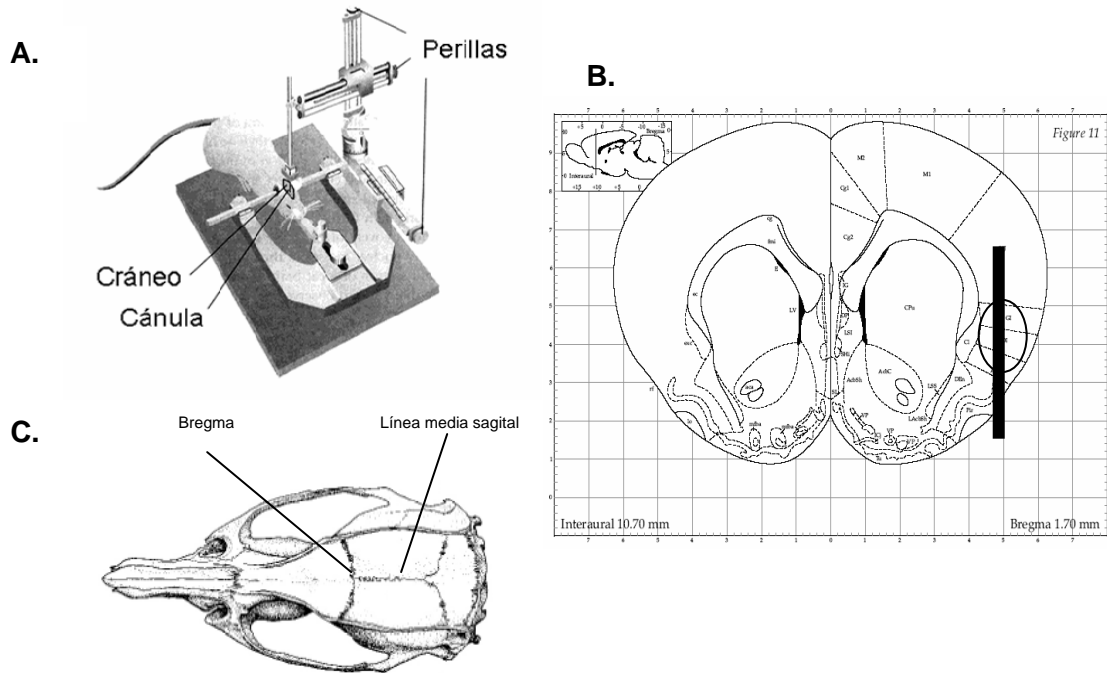


Fig. 8. (A) Esquema del aparato estereotáxico. (B) Sección coronal correspondiente a un atlas estereotáxico del cerebro de rata donde se remarca la localización de la CI. (C) Imagen del plano superior de un cráneo de rata, observándose la línea media sagital y el punto de referencia Bregma (A) y (B) modificados de <http://www.us.es/dfba/programas/practicas/TecExpFisiolAnimal-P1>. (C) Paxinos & Watson, 1998.

### 3. Protocolo conductual del Condicionamiento de Aversión al sabor (CAS).

Las ratas fueron privadas de agua durante 24 hrs; posteriormente se les proporcionaron 30 ml de agua en una probeta graduada por 15 minutos, mañana y tarde por 5 días. Se registraron los ml de agua promediando los consumos de la mañana para obtener la línea basal de consumo.

Para la adquisición del CAS se presentó durante 15 minutos una solución de sacarina sódica al 0.1% (Sigma St. Louis MO), después de 15 minutos se inyectó intraperitonealmente Cloruro de Litio 0.4 M (7.5 mL/kg, Fluka) para inducir malestar gástrico. Para medir la memoria a corto plazo (MCP) se les presentó a los animales sacarina después de 4 horas y para medir la memoria a largo plazo (MLP) se presentó nuevamente sacarina 72 horas después (Bermúdez-Rattoni, 2004).

4. *Microinyecciones intracorticales.*

Para la administración de los fármacos se utiliza un inyector de 11.5 mm de largo, el cual es conectado mediante tubería a una bomba de perfusión (Cole Parmer). El fármaco es inyectado a una velocidad de 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante dos minutos para la administración de 1  $\mu\text{l}$  total, en cada hemisferio, dejando el inyector durante 1 minuto más para permitir la difusión del líquido.

5. *Fármacos.*

Los fármacos utilizados fueron:

- R  $-(+)$ -8-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-5-fenil-1H-3-benzacepina-7-ol (SCH 23390), antagonista de los receptores D1, en la dosis 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
- 2-amino-5-ácido fosfopentanoico (APV), antagonista de los receptores NMDA, en la dosis 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Ferreira *et al.*, 2002).
- SKF 38393, agonista de los receptores dopaminérgicos D1, en las siguientes dosis: 5, 7.5 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
- Rp-cAMP 0.065  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , inhibidor de PKA.

Todos de sigma St. Louis MO disueltos en solución salina.

6. *Análisis de los resultados:*

El volumen de agua consumido se expresó como porcentaje de línea basal de consumo de agua  $\pm$  ESM.

Para obtener el porcentaje de la línea basal de consumo de agua se utilizó la fórmula: porcentaje de consumo con respecto a la línea base de consumo de agua =  $100 \times \frac{\text{Consumo de sacarina en ml}}{\text{Promedio de consumo basal de agua en ml}}$ .

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Stat View, y se empleó la prueba ANOVA; un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

7. *Histología.*

Después de finalizar el experimento los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico y perfundidos transcárdialmente con solución salina isotónica para que el cerebro quedara libre de sangre, el cual fue retirado y colocado en una solución de paraformaldehído al 4%, posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa al 10%, 20% y 30% paulatinamente y conservados a 4°C hasta ser cortados en secciones coronales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor a través de las áreas circundantes a la inserción de las cánulas. Por último los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo al 1%, para observar con el microscopio si la localización de la cánula era correcta.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### *Histología.*

En la Fig.9. se muestra la fotografía de un corte coronal de CI, de 40  $\mu\text{m}$  de grosor teñido con violeta de cresilo, la que es contrapuesta con un esquema de la sección coronal correspondiente a un atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 1998). La fotografía muestra que la inserción de la cánula se realizó correctamente.

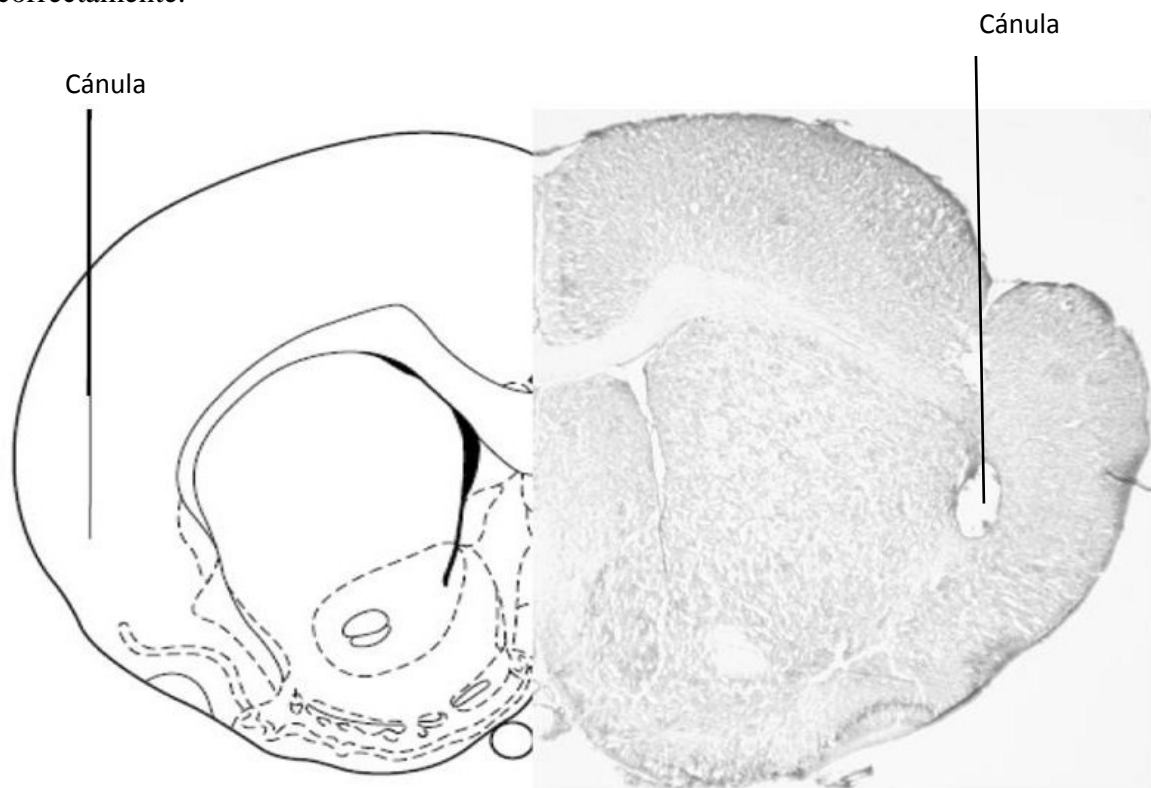


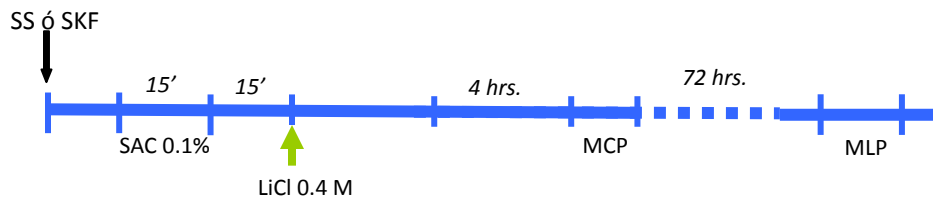
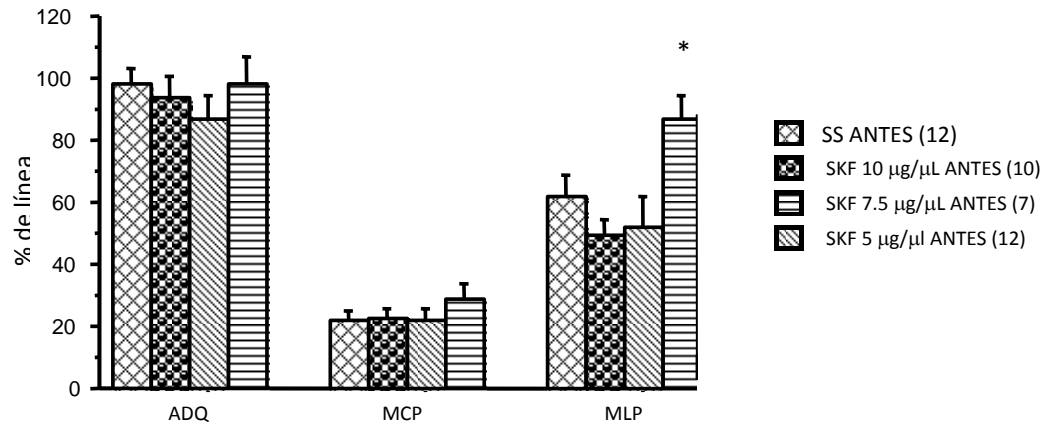
Fig. 9. El lado de la derecha muestra la fotografía de un corte coronal de 40  $\mu\text{m}$  de ancho teñido con violeta de cresilo al 1 %, en donde se observa el espacio dejado por la cánula. En el lado izquierdo se contrapone un esquema tomado del atlas estereotáxico (Paxinos & Watson) para ubicar el sitio donde se encuentra la CI.

En la primera fase de los experimentos se evaluó la participación de los receptores D1 en la formación de la memoria gustativa a través de la administración de un agonista de dichos receptores (SKF-38393) a varias dosis (5, 7.5 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en la CI, 15 minutos antes de la presentación del estímulo gustativo durante el condicionamiento de aversión al sabor (CAS).

En la Fig 10. se muestra el porcentaje de línea base de consumo de sacarina al 0.1 % en las diferentes etapas de la memoria: adquisición (ADQ), memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP), la barra con rombos representa a los animales control a los que se les administró solución salina, la barra con círculos representa animales a los que se les administró el SKF-38393 a una dosis de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , la barra con líneas horizontales representa animales a los que se les administró el SKF-38393 a una dosis de 7.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y la barra con líneas diagonales representa animales a los que se les administró el fármaco a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En la línea de tiempo se muestra el protocolo experimental llevado a cabo, la flecha negra representa la administración intracortical de solución salina o SKF-38393 15 minutos antes de la exposición al sabor nuevo, la fecha gris representa la inyección de LiCl 0.4 M 15 minutos después de la presentación del sabor nuevo, la memoria a corto plazo (MCP) fue evaluada 4 horas después y la memoria a largo plazo (MLP) se evaluó 72 horas después.

En el análisis estadístico ANOVA, no hay diferencias significativas entre el porcentaje de consumo entre los grupos experimentales y el consumo del grupo al cual solo se le administró el vehículo (solución salina, SS) en la adquisición ni en la memoria a corto plazo. En la prueba de memoria a largo plazo se observa una diferencia significativa entre el grupo al cual se le administró SKF-38393 a una dosis de 7.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con respecto a su grupo control SS ( $F_{4,42}=3.958$ ;  $p<0.05$ ).



\*P < 0.05

Fig. 10. Se presenta consumo del sabor nuevo (sacarina al 0.1%) como porcentaje de consumo con respecto a la línea basal de agua en animales a los cuales se les administró intracorticalmente solución salina (SS) ó SKF-38393 antes de la presentación del estímulo gustativo. No se observan diferencias significativas en la adquisición (ADQ) ni en la memoria a corto plazo (MCP) en ninguno de los grupos. En la memoria a largo plazo (MLP) hay diferencia significativa entre el grupo de animales inyectados con la dosis de 7.5µg/µl (barra con líneas horizontales) y su grupo control (barra con rombos). \*P<0.05

La administración de varias dosis se hizo con la finalidad de buscar un efecto de dosis-dependencia. En nuestro experimento la única dosis que tuvo efecto es la de 7.5 µg/µl, esto puede deberse a que la regulación de la dopamina muestra un perfil de U invertida en relación con el nivel basal del neurotransmisor, lo cual significa que: 1) en la administración del agonista a bajas dosis pareada con el condicionamiento, el aprendizaje ocurre, 2) a dosis medias pareadas con el estímulo, el aprendizaje no es adquirido y 3) a altas dosis de la administración del agonista, el aprendizaje es impedido (Harley 2004, Williams & Castner, 2006; Vijayraghavan *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, la administración de SKF-38393 antes del condicionamiento en otras tareas potencia el aprendizaje, es decir fortalece la memoria (Bernabeu *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2003). Con la administración de SKF-38393 antes del condicionamiento, se esperaba que el grupo de animales condicionados presentaran mayor aversión a la sacarina en las posteriores presentaciones con respecto al grupo control y se obtuvo el efecto contrario.

Que los animales no tuvieran MLP del CAS, podría ser resultado de la forma en la que las acciones de dopamina son reguladas. Una posible explicación se da a través de la desensibilización del receptor D1, en este proceso la respuesta de las células disminuye por la exposición a agonistas, como consecuencia de una combinación de diferentes mecanismos, entre los que se incluye el desacoplamiento del receptor desde su proteína G, en respuesta a la fosforilación del receptor, la internalización del receptor desde la superficie celular hacia los compartimientos membranosos intercelulares y la regulación a la baja de los receptores debido a una reducción en RNAm y síntesis proteica, así como también la degradación de los receptores preexistentes en la membrana plasmática (Barton & Sibley, 1990; Niznik, 1994; Ferguson, 2001).

Debido a que no hubo diferencias significativas en la ADQ o en la MCP, se refuerza la idea de que la regulación de los receptores D1 es necesaria para la consolidación de la memoria del CAS, lo cual es consistente con otros estudios en donde se demostró mediante el bloqueo de los receptores D1 antes de la adquisición que dichos receptores participan en la codificación del estímulo gustativo y en la consolidación del CAS (Berman *et al.*, 2000; Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2007).

Está ampliamente aceptado que los mecanismos que inducen y mantienen la MLP son dependientes de modificaciones sinápticas en las redes neuronales; el modelo de potenciación a largo plazo (LTP) es propuesto para tal plasticidad sináptica.



Este modelo consiste en la aplicación de trenes de estimulación eléctrica a alta frecuencia en cualquier aferencia de importancia que conecta con otra estructura, la cual aumenta la amplitud de los potenciales post-sinápticos. La dopamina también se ha visto involucrada en la expresión de plasticidad sináptica en diferentes estructuras como el estriado, núcleo acumbens, hipocampo y corteza prefrontal, lo que da suficiente evidencia que indica que la dopamina endógena a través de los receptores D1 facilita la inducción de LTP en todas estas estructuras. (Jay, 2003, Lynch *et al.*, 2007).

Una importante convergencia de acción de diferentes neurotransmisores pueden estar actuando a nivel del LTP, indicando que otros neurotransmisores pueden ser integrados a eventos plásticos. La dopamina a través de los receptores D1 aumenta la corriente de los receptores NMDA de glutamato y la interacción es mediada por mecanismos dependientes de PKA y  $\text{Ca}^{2+}$  (Cepeda *et al.*, 1998; Jay, 2003). Por otro lado también se ha visto que cuando hay una exposición a un estímulo novedoso hay una liberación de dopamina que facilita la inducción de LTP mediante los receptores D1 y que esta inducción da lugar a la activación de genes como son *zif268* y *arc* que han sido implicados en la expresión de memorias a largo plazo (Granado *et al.*, 2008).

El LTP también requiere la activación de proteínas cinasas entre las que se encuentra CaMKII que tiene la habilidad de servir como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ésto provee un mecanismo para la decodificación molecular de eventos asociados con fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Varios estudios han demostrado que la activación de CAMKII es requerida para la consolidación de memorias espaciales y del condicionamiento al miedo (Shobe, 2002). Así como el estudio con organismos knockout de CAMKII muestran que se requiere de la activación de CAMKII en aprendizajes asociativos y en eventos de plasticidad sináptica (Lynch, 2004).

CAMKII fosforila a CREB (cAMP response element-binding, por sus siglas en inglés), el cual ha sido identificado como un importante factor de transcripción en la formación de la memoria (Alberts *et al.*, 2002). Este factor de transcripción es conservado desde moluscos hasta mamíferos y su actividad es regulada por AMPc y por el influjo de  $Ca^{2+}$ . Otro mecanismo propuesto en el cual CREB activa a promotores blanco es mediado por la inducción transcripcional a través de la fosforilación de PKA que regula la síntesis proteica necesaria para la formación de la MLP. (Korzus, 2003; Lynch, 2004).

Lo anterior muestra que a través de la estimulación de los receptores D1 se activa la cascada que lleva a la fosforilación de CREB. Varios autores han reportado la activación de CREB después de la tarea del condicionamiento al miedo (Quevedo *et al.*, 2004; Hotte *et al.*, 2006). En el CAS se ha visto que cuando se administra un inhibidor de PKA o un antisentido (fosforotiato-modificado oligodesoxinucleotido) de CREB dentro de la amígdala de ratas al mismo tiempo del entrenamiento se interfiere con la MLP pero no con la MCP asociadas al CAS (Koh *et al.*, 2002; Lampretch *et al.*, 1997).

La segunda etapa de los experimentos consistió en la administración de SKF-38393 después de la presentación del estímulo gustativo con la finalidad de comprobar que el efecto obtenido con la dosis de 7.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  era específico. En la Fig. 11, se muestra el porcentaje de consumo de línea base de sacarina al 0.1% en las diferentes etapas de la memoria: adquisición (ADQ), memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP), la barra con rectángulos representa a los animales a los que les inyectó solución salina (SS) y la barra con ondas representa animales a los que se les administró intracorticalmente SKF-38393. El análisis estadístico ANOVA no muestra diferencias significativas en ninguna etapa de la memoria.

En la línea de tiempo se describe el protocolo experimental utilizado, la flecha negra representa la administración intracortical de SS o SKF-38393 15 minutos después de la presentación de la sacarina al 0.1%, la flecha gris representa la inyección i.p. de LiCl (0.4M), 15 minutos después de la administración de SS o SKF-38393, se evaluó la MCP después de 4 hrs. y la MLP 72 hrs. después.

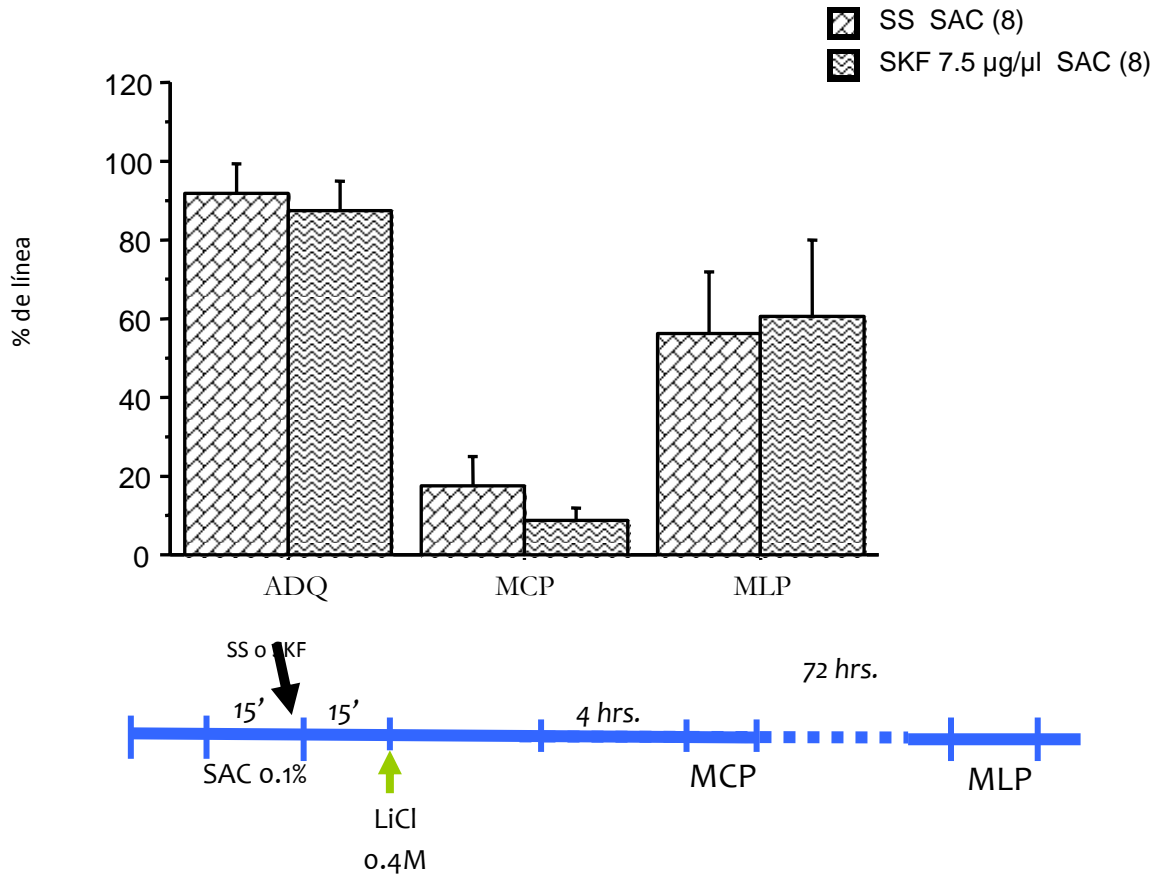


Fig.11. Resultados obtenidos en animales a los que se les inyectó intracorticalmente SKF-38393 administrados después del estímulo gustativo. Se presenta el porcentaje de consumo del sabor nuevo (sacarina al 0.1%) con respecto al consumo basal de agua y no se observan diferencias significativas en ninguna etapa de la memoria.

Con este experimento se demostró que el efecto obtenido en la administración del fármaco con la dosis de 7.5 µg/µl, está relacionado con la presentación del estímulo gustativo, ya que la administración de SKF-38393 no tiene efecto una vez que ha pasado su exposición.

Éstos resultados confirman que los receptores D1 actúan en la codificación del estímulo gustativo y que no se presenta un efecto de dosis- dependencia.

Una de las posibles vías mediante la cual los receptores D1 pueden estar actuando en la formación de la MLP es mediante la interacción con los receptores NMDA vía PKA. Dicho mecanismo no se ha estudiado en el CAS, debido a esto, los últimos experimentos tuvieron como objetivo determinar si la activación de la proteína cinasa A es necesaria para la formación de la memoria en el CAS. De manera que si se inhibía a PKA no se formaría la memoria a largo plazo. Para evaluar esto, se administró un inhibidor de la enzima PKA (Rp-AMPC, 0.065  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 15 min antes del condicionamiento y 30 min después del mismo en diferentes grupos.

Anteriormente se describió que el SCH-23390 administrado antes del estímulo gustativo, bloquea los receptores D1 con lo que se afecta la consolidación del CAS, así que al administrar intracorticalmente el Rp-AMPC, 15 min antes del condicionamiento, se propone que se inhibirá la activación de PKA y no se consolidará el CAS.

De la misma manera, se mostró por la técnica de microdialisis un aumento de dopamina y glutamato que coinciden en temporalidad post-adquisición; así que se sugiere que en este tiempo es posible que se de una interacción D1-NMDA a través de PKA, para comprobar esto se inyectó el Rp-AMPC, 30 min después del condicionamiento, con lo que se sugiere que tal interacción no se lleva a cabo y por lo tanto no se consolida el CAS. En todos los grupos se evaluó la MCP y la MLP.

En la Fig. 12 se muestra el porcentaje de consumo de línea base de sacarina al 0.1 % en las diferentes etapas de la memoria: adquisición (ADQ), memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP). El análisis estadístico ANOVA no muestra diferencias significativas en la ADQ ni en la MCP pero si en la MLP en los grupos a los que se les administro Rp-AMPC, 0.065  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  antes (barra con rombos) y después (barra punteada) del condicionamiento.

La línea del tiempo describe el protocolo experimental llevado a cabo en dichos experimentos; las flechas negras representan las inyecciones intracorticales 15 min antes o 30 min después del condicionamiento, la flecha gris representa la inyección i.p. de LiCl 15 min después de la presentación del estímulo gustativo, la MCP se evaluó 4 hrs. después y la MLP fue evaluada 72 hrs después.

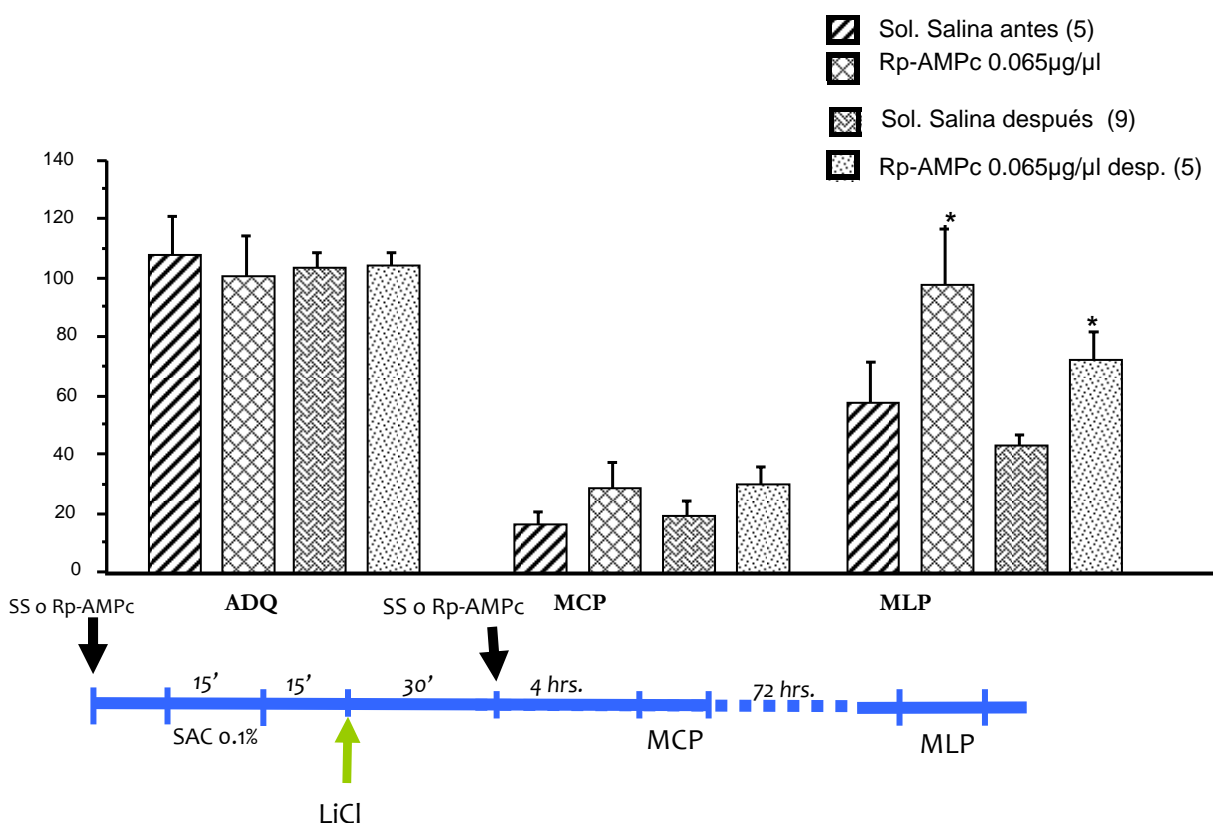


Fig. 12. Se muestra el porcentaje total de consumo del sabor nuevo (sacarina al 0.1%) en animales a los que se les administró Rp-cAMP (inhibidor de PKA) 0.065µg/µl (\* p<0.05) antes y después del condicionamiento. Solo se observan diferencias significativas en la MLP cuando el Rp-cAMP fue administrado 15 min antes y 30 min después del condicionamiento.

Anteriormente, se había mencionado que la participación de los receptores NMDA es importante para la formación del CAS. Se ha visto que un mecanismo de modulación del receptor NMDA es a través de la fosforilación de las subunidades: NR1, NR2 y NR3, las cuales poseen residuos de tirosina, serina y treonina. El balance de fosforilación/desfosforilación depende de la actividad de las cinasas y fosfatasas de proteínas, de manera que la activación de PKA fosforila a la subunidad NR1 y esta fosforilación mejora la respuesta de los agonistas del receptor NMDA, debido a que estos receptores se mantienen más tiempo abiertos (Jiménez & Tapia, 2004).

También se ha visto que la activación de la cascada AMPc-PKA es capaz de potenciar las respuestas de los receptores NMDA en neuronas del estriado ya que la administración de forskolin (agonista de los receptores D1) incrementa la fosforilación de la subunidad NR1 de los NMDA y también se ha visto que esa fosforilación puede ser impedida por un por un inhibidor de protein fosfatasas en donde se ha sugerido que la fosfoproteína DARPP-32 (Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa ) tiene un papel importante debido a que la fosforilación de esta proteína por PKA inhibe la desfosforilación de los receptores NMDA (Fig. 13) (Cepeda & Levine, 1998).

DARPP-32 es una proteína citosólica que es fosforilada sobre el residuo Thr 34 vía PKA, una vez que se ha fosforilado DARPP-32 actúa como un potente inhibidor de la protein fosfatasa-1 (PP1), lo que provoca que la subunidad NR1 permanezca y se activen factores de transcripción como CREB (Fig. 13) (Cepeda & Levine, 1998; Fernández et al., 2006; Snyder et al., 1998).

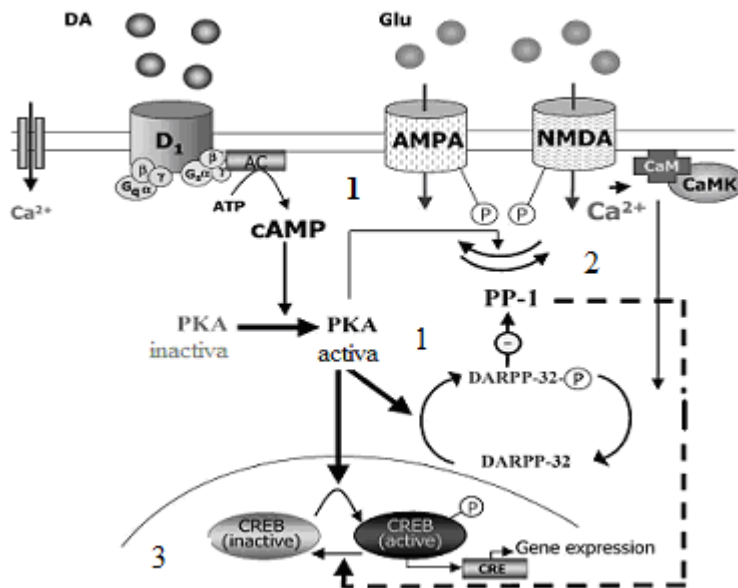


Figura 13. Representación esquemática de la señalización de la vía D1/AMPC/PKA de dopamina en la regulación de LTP. El receptor D1 acoplado positivamente a adenilato ciclasa (AC) incrementa la actividad de AC para la formación de AMPc que subsecuentemente activa a PKA dependiente de AMPc. 1) La activación de PKA fosforila a los receptores AMPA Y NMDA de glutamato y a la proteína DARPP-32. Una vez fosforilada DARPP-32 es convertida en un potente inhibidor de PP-1, el cual promueve la fosforilación de CAMKII. 2) Comúnmente la activación de los receptores NMDA incrementa el influjo del  $Ca^{2+}$  dentro de la célula que se activan a través de complejos  $Ca^{2+}$ /Calmodulina 3) PKA también fosforila a CREB un factor de transcripción. Contrariamente PP1 desfosforila a CREB. El control de PP-1 a través de DARPP-32, es un regulador clave en la transmisión de dopamina y la actividad de los receptores NMDA. Modificado de Jay, Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms 2003.

Algunos estudios han examinado el papel de DARPP-32 en procesos de memoria. Animales tratados con un agonista de los receptores D1 tienen una mejora en la evocación de la MLP que está asociada con un incremento en el nivel de fosforilación en esta proteína en la corteza prefrontal. Hotte y colaboradores han asociado un mejor desempeño en tareas espaciales con el incremento de DARPP-32 y CREB (Hotte *et al.*, 2006). Un estudio ha mostrado que en ratones knockout de DARPP-32 está impedido el aprendizaje del condicionamiento operante (Heyser *et al.*, 2000). Rosa y colaboradores observaron un incremento en la expresión de esta proteína en el hipocampo y en el estriado después del aprendizaje de prevención pasiva (Rosa *et al.*, 2008).

El papel de PKA en los procesos de memoria se ha estudiado ampliamente. En ratones transgénicos en los que se expresa R(AB), una forma inhibidora de la subunidad regulatoria de PKA, se encuentra reducida la actividad de PKA en el hipocampo y se demostró que dicha actividad es requerida entre 1 y 3 hrs después del entrenamiento del condicionamiento al miedo (Bourtchouladze *et al.*, 1998). Inhibiciones farmacológicas mediante Rp-AMPC bloquean la formación de la MLP cuando el inhibidor es administrado inmediatamente o 3 horas después del entrenamiento en el hipocampo en la tarea del condicionamiento al miedo (Quevedo *et al.*, 2004) y la inhibición de PKA en la amígdala interfiere selectivamente en la formación de la memoria del CAS, no se encontró interferencia cuando se evaluó la MCP, pero se observó una atenuación significativa a las 24 hrs así como una extinción más rápida. El que el inhibidor no tenga efecto en la MCP significa que no interfiere en la adquisición y que su efecto está relacionado con la consolidación (Koh *et al.*, 2002).

Nuestros resultados muestran que la activación de PKA es necesaria para la formación de la MLP, ya que al administrar Rp-AMPC antes del condicionamiento se afecta la MLP pero no la MCP del CAS. Dado que se ha visto que la actividad de los receptores D1 es importante para la consolidación del CAS y que dichos receptores activan a PKA, con los datos obtenidos se puede sugerir que la activación de PKA se da a través de estos receptores dopaminérgicos, lo cual no puede ser totalmente confirmado con nuestros experimentos, ya que la activación de PKA involucra cascadas de señalización paralelas a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de norepinefrina.

Por otro lado, el efecto obtenido en la MLP cuando se administró Rp-AMPC después del condicionamiento puede deberse a que se afecta la señal dopaminérgica detectada en la post- adquisición y lo que sugiere que dicha liberación es requerida en repetidas ocasiones para la estabilización de la MLP. Esto sugiere también que la hipótesis de una cascada molecular simple no puede explicar como la MLP es consolidada, sino que se requieren picos de actividad continuamente.



## V. CONCLUSIONES

De acuerdo con las evidencias citadas anteriormente la administración del agonista SKF 38393 fortalece otras memorias. Este trabajo determinó que la memoria de aversión a los sabores no fue fortalecida con la administración de dicho agonista, sin embargo provocó el efecto contrario en la consolidación de la memoria, lo que implica que la regulación de dichos receptores es muy sensible a los cambios de concentración de dopamina, pudiendo involucrar procesos asociados con la desensibilización que provocan el malfuncionamiento de los receptores D1.

No se encontró el efecto esperado, es decir, no hubo un fortalecimiento en el desempeño del CAS; sin embargo el haber afectado la MLP indica que la buena regulación de los receptores D1 es necesaria para la consolidación del CAS. La administración de SKF-38393 después de la presentación del estímulo gustativo evidenció que el efecto obtenido está relacionado con la liberación de dopamina, ya que al haber pasado dicha señalización no hay efecto alguno en ninguna etapa de la memoria.

Por último, la administración de Rp-AMPC tuvo efecto en la MLP cuando fue administrado antes del condicionamiento, lo que indica que la activación de PKA es fundamental para la consolidación del CAS. Además, la administración de Rp-AMPC después de 30 min del condicionamiento sugiere que la interacción entre los receptores D1 de dopamina y los receptores NMDA de glutamato opera para la formación del CAS.

---

---

## Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. **Molecular Biology of Cell**. New York and London. Garland Science. 2002. Cap.15.
- Aleksandrov, V.G. & Fedorova, K. P. **Structure of the Insular Region of the Rat Neocortex**. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2003; 33:199-202.
- Bahena-Trujillo, Flores, G., Arias- Montaña. **Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central**. *Rev Biomed*. 2000; 11:39-60.
- Baldwin, A., Sadeghian, K., Kelley, E. **Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex**. *J. Neurosci*. 2002; 22(3):1063-1071
- Barros, D., Izquierdo, L., Medina, J., Izquierdo, I. **Pharmacological Findings Contribute to the Understanding of the Main Physiological Mechanims of Memory Retrieval**. *Current Drug Targets- CNS & Neurological Disorders*. 2003; 2:81-94.
- Barton, A. & Sibley, D. **Agonist-Induced Desensitization of D1-Dopamine Receptors Linked to Adenylyl Cyclase Activity in Cultured NS2OY Neuroblastoma Cells**. *Molecular Pharmacology*. 1990; 38: 531-540.
- Berman, D., Hazvi, S., Neduva, V., Dudai, Y. **The Role of Identified Neurotransmitter Systems in the Response of Insular Cortex to Unfamiliar Taste: Activation of ERK1-2 and Formation of a Memory Trace**. *The Journal of Neuroscience* 2000; 20(18): 7017-7023.
- Bermúdez-Rattoni, F. & McGaugh, J. **Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion**. *Brain Reserch*. 1991; 549:165-170.
- Bermúdez-Rattoni F & Prado Alcalá R. **Memoria. Dónde reside y cómo se forma**. Ed. Trillas. México 2001; pp: 11-85.
- Bermúdez-Rattoni F. **Molecular Mechanims of Taste- Recognition Memory**. *Nature Rev Neuroscience*. 2004; 5:209-217.
- Bermúdez-Rattoni F. **Neural Plasticity and Memory From Genes To Brain Imaging**. CRC Press USA 2007; pp:157-175.

- 
- 
- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin., M, Izquierdo, I., Medina, J. **Involvement of hippocampal cAMP/cAMP- dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1997; 94:7041-7046.
  - Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., Kandel, E. **Different Training Procedures Recruit Either One or Two Critical Periods for Contextual Memory Consolidation, Each of Which Requires Protein Synthesis and PKA.** *Learning and Memory* 1998; 5:365-374.
  - Bures. Y. **Conditioned Taste Aversion Memory of a Special Kind.** Oxford University Press caps:2-6
  - Castner, S. & Williams, G. **Tuning the engine of cognition: A focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex.** *Brain and Cognition.* 2007; 63: 94–122.
  - Cepeda, C., Buchwald, NA., Levine, MS. **Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes actived.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 9576-9580.
  - Cepeda, C. & Levine, MS. **Dopamine and N-Methyl-D- Aspartate Receptor Interactions in the Neostriatum.** *Dev Neurosci.* 1998; 20: 1-18.
  - Chance, P. **Learning and Behavior.** Brooks/ Coler Publishing Company 1999 E.U.A. pp: 83-156.
  - Coffen, U., López-Avila, A., Ortega-Legaspi, M., Rosendo del Ángel., López-Muñoz, F., Pellicer, F. **Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat.** *Eur. J. Pain.* 2007; pp: 535-543
  - Dunn, L.T. & Everitt, B.J. **Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxic ibotenic acid.** *Behav. Neurosci.* 1998; 102: 3-22.
  - Escobar, M., & Bermúdez-Rattoni., F. **Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention.** *Brain Res.* 2000; pp:208–212.
- 
-

- 
- 
- Ferguson, S.G. **Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling.** *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 1–24.
  - Fernandez, É., Schiappa, R., Girault, Jean-Antoine, Le Novere, N. **DARPP-32 Is a Robust Integrator of Dopamine and Glutamate Signals.** *PLoS Comput Biol.* 2006; 2: 1619-1633.
  - Fernández-Ruíz, J., Miranda, M., Bermúdez-Rattoni, F., Drucker-Colín R. **Effects of Catecholaminergic Depletion of the Amygdala and Insular Cortex on the Potentiation of Odor by Taste Aversions.** *Behavioral and Neural Biology.* 1993; 60: 189-191.
  - Ferreira, G., Gutiérrez, R., De la Cruz, V., Bermúdez-Rattoni, F. **Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory.** *European Journal of Neuroscience.* 2002; 16: 1139-1145.
  - Fienberg, A. A., Hiroi, N., Mermelstein, P. G., Song, W. J., Snyder, G. L., Nishi, A., Cheramy, A., O’Callaghan, J. P., Miller, D. B., Cole, D. G., Greengard, P. **DARPP-32: Regulator of the Efficacy of Dopaminergic Neurotransmission.** *Science.* 1998; 281: 838-842.
  - García et al. **“X- Rays and Learned Taste Aversions: Historical and Psychological Ramifications”**, en T.C., Burish (eds.), *Cancer, nutrition and eating behavior: A biobehavioral perspective*, Laurence Erlbaum Associates, Hillsdale, Nueva Jersey, 1985, pp. 8-20
  - Granado, N., Ortiz, O., Suárez, Luz M., Martín, D., Ceña, V. Solís, José M., Mortalla, R. **D1 but not D5 Dopamine Receptors Are Critical for LTP, Spatial Learning, and LTP-Induced arc and zif268 Expression in the Hippocampus.** *Cerebral Cortex.* 2008; 18:1-12.
  - Gurden, H., Tassin, J. P., Jay, T. M. **Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal-prefrontal cortex long-term potentiation.** *Neuroscience.* 1999; 94: 1019-1027.
- 
-

- 
- 
- Gutierrez, H., Hernández-Echeagaray, E., Ramírez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F. **Blockage of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Insular Cortex Disrupts Taste Aversion and Spatial Memory Formation.** *Neuroscience*. 1999; 89: 751-758.
  - Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, F. **Dopamine and Glutamate release response in the insular cortex taste aversion learning.** *J Neurochem*. 2007. 102, 45-46.
  - Harley, C. W. **Norepinephrine and Dopamine as Learning Signals.** *Neural Plasticity*. 2004; 11: 191-204.
  - Heyser, C. J., Fienberg, A. A., Greengard, P., Gold, L. H. **DARPP-32 knockout mice exhibit impaired reversal learning in a discriminated operant task.** *Brain Research*. 2000; 867: 122–130.
  - Hotte, M., Thuault, S., Lachaise, F., Dineley, K. T., Hemmings, H. C., Nairn, A.C., Jay, T. M. **D1 receptor modulation of memory retrieval performance is associated with changes in pCREB and pDARPP-32 in rat prefrontal cortex.** *Behavioural Brain Research*. 2006; 171: 127–133.
  - Izquierdo, I., Medina, J. H., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Souza, Marcia M., Mello e Souza, Tadeu. **Short- and Long- Term Memory Are Differentially Regulated by Monoaminegic Systemns in the Rat Brain.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 1998; 69:219-224.
  - Jay T. **Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms.** *Progress in Neurobiology*. 2003; 69: 375–390.
  - Jimenéz, B. & Tapia, R. **Biochemical Modulation of NMDA Receptors: Role in Conditioned Taste Aversion.** *Neurochemical Research*. 2004; 29: 161-168.
  - Kandel. **Learning and Memory** en **Principios de neurociencia**. México. 2001 McGraw-Hill Interamericana
  - Kim, Ok- Jin., Gardner, Benjamín R., Williams, Daniel B., Marinec, Paul S., Cabrera, David M., Peters, Jennifer D., Sibley, David R. **The Role of Phosphorylation in D1 Dopamine Receptor Desensitization.** *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 7999–8010.
- 
-

- 
- 
- Koh, T. M., Thiele, T. E., Bernstein, L. **Inhibition of protein kinase A activity interferes with long-term, but not short-term memory of conditioned taste aversions.** *Behavioral Neuroscience*. 2002; 116: 1070–1074.
  - Korzus E. **The relation of transcription to memory formation.** *Quarterly Review*. 2003; 50: 775-782.
  - Lampretch, R., Hazvi, S., Dudai, Y. **cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory.** *Journal of Neuroscience*. 1997; 17:8443–8450.
  - Lynch M. A. **Long-Term Potentiation and Memory.** *Physiol Rev*. 2004; 84: 87-136.
  - Lynch, G., Rex, C. S., Gall, C. M. **LTP consolidation: Substrates, explanatory power, and functional significance.** *Neuropharmacology*. 2007; 52: 12-23.
  - Milner, B., Squire, L., Kandel, E. **Cognitive Neuroscience and the Study of Memory.** *Neuron*. 1998; 20: 445-468.
  - Miranda, Ma Isabel, Ferreira, G., Ramírez-Lugo, L., Bermúdez-Rattoni, F. **Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation.** *PNAS*. 2002; 99: 11417-11422.
  - Nagai, T., Takuma, K., Kamei, H., Ito, Y., Nakamichi, N., Ibi, D., Yutaka, N., Murai, M., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., Yamada, K. **Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex.** *Learning and Memory*. 2008; 14: 117-125.
  - Niznik H. **Dopamine, Receptors and Transporters (Pharmacology, Structure and Function)**. Ed. Marcel Dekker. USA. 1994; pp: 35-72.
  - Ohara, P., Granato, A., Moallem., T., Wang, Bai-Ren., Tillet, Y., Jasmin, L. **Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat.** *Journal of Neurocytology*. 2003; 32: 131–141.
  - Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D. **Principles in Neuroscience**. Sinauer Associates, Inc. 2001. Caps: 6, 7 y 8.
-

- 
- 
- Quevedo, J., Vianna, M., Martins, M., Barichello, T., Medina, J., Roesler, R., Izquierdo, I. **Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long- term memory in rats.** *Behavioural Brain Research.* 2004; 154: 339-343.
  - Rosa, D., Souza, R., Souza, B., Guimarães, M., Carneiro, D., Valvassori, S., Gomez, M., Quevedo, J., Romano-Silva, M. **DARPP-32 Expression in Rat Brain After an Inhibitory Avoidance Task.** *Neurochem Res.* 2008.
  - Roseblum, K., Berman, D., Hazvi, S., Lamprecht, R., Dudai, Y. **NMDA Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of Its 2B Subunit in Taste Learning in the Rat Insular Cortex.** *The Journal of Neuroscience.* 1997; 17: 5129-5135.
  - Runyan, J. & Dash, P. **Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats.** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2004; 82: 65-70.
  - Swards, T. & Swards, M. **Cortical association areas in the gustatory system.** *Neuroscience and Biobehavioral.* 2001; 25: 395-407.
  - Shobe, J. **The Role of PKA, CaMKII, and PKC in Avoidance Conditioning: Permissive or Instructive?.** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2002; 77:291-312.
  - Siegel, G., Agranoff., Bernard, W., Albers, R. **Glutamate en Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects.** 2000. Caps 12, 15 y 20.
  - Smith-Roe, S. & Kelley, A. **Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning.** *Journal of Neuroscience.* 2000; 20:7737-7742.
  - Snyder, L., Fienberg, A., Huganir, L., Greengard, P. **A Dopamine/D1 Receptor/Protein Kinase A/Dopamine and cAMP Regulated Phosphoprotein (Mr 32 kDa)/Protein Phosphatase-1 Pathway Regulates Dephosphorylation of the NMDA Receptor.** *The Journal of Neuroscience.* 1998; 18:10297–10303.
  - Jay, T.M. **Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms.** *Progress in Neurobiology.* 2003; 69:375-390.
- 
-

- 
- 
- Tseng, K. & O'Donnell, P. **Dopamine- Glutamate Interactions Controlling Prefrontal Cortical Piramidal Cell Excitability Involve Multiple Signaling Mechanisms.** *The Journal of Neuroscience.* 2004; 24: 5131-5139.
  - Vianna, M., Izquierdo, L., Barros, D., Walz, R., Medina, J., Izquierdo, I. **Short- and Long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades.** *An Acad Bras. Ci.* 2000; 72:353-364.
  - Vijayraghavan, S., Wang, M., Birnbaun, S., Williams, G., Arnsten., A. **Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory.** *Nature Neuroscience.* 2007; 10: 376-384.
  - Wang, H., Hu, Y., Tsien, J. **Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage.** *Progress in Neurobiology.* 2006; 79:123–135.
  - Welzl, H., D'Adamo, P., Lipp, Hans-Peter. **Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm.** *Behavioural Brain Research.* 2001; 125:205-213.
  - Williams, G.V. & Castner, S.A. **Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory.** *Neuroscience.* 2006; 139: 263–276.
  - Yamamoto, T. **Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain.** *Arch Histol Cytol.* 2006; 69: 243-255.
  - Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T., Yasoshima, Y. **Roles of Chemical Mediators in the Taste System.** *Jpn. J. Pharmacol.* 1998; 78: 325-348.



**Páginas Web:**

- <http://amcal-ac.blogspot.com>
- <http://encolombia.com/medicina>
- <http://www.us.es/dfba/programas/practicas/TecExpFisiolAnimal-P1>