



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

División de Estudios Profesionales

Tesis de investigación empírica

“PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA FORMACIÓN DE MEMORIAS DE RECONOCIMIENTO OLFATIVO”

Que presenta

Seraid Caynas Rojas

Directora del proyecto

Dra. María Isabel Miranda Saucedo

Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva

Universidad Nacional Autónoma de México

Campus Juriquilla, Querétaro

México D.F., Enero de 2010



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.

AGRADECIMIENTOS

A mí MADRE por todo el amor y preocupación que ha tenido por mí.

A mí PADRE por todo el gran interés que ha mostrado hacia mi formación, por las experiencias compartidas, por su apoyo y por su amor.

A mi hermano EMMANUEL "EL NOVA" CAYNAS por todo aquello que hemos compartido juntos, su protección, su manera de ver el mundo y su sarcasmo.

A mi hermano SERGIO "EL PELÓN" CAYNAS por todo su apoyo y por ser tan clavado.

A la Dra. ISABEL MIRANDA por darme la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio y a todo el grupo de trabajo, en especial a LOS RANAS.

A el Dr. OSCAR PROSPÉRO por la motivación y conocimientos que en mí ha dejado.

Al Dr. EDGAR SORIA por todas las cosas que me enseñó.

A ANTONIO "EL TOÑO" ROMANO por su empeño y dedicación por compartir sus conocimientos en Química.

A la Dra. ALEJANDRA RUIZ por colaborar en la parte estadística del trabajo y a todo el GRUPO DE NEUROCIENCIAS del Laboratorio de Endocannabinoides de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A los SINODALES por el tiempo y aportaciones que hicieron durante la revisión del trabajo, especialmente al Dr. CESAR CASASOLA.

A todos aquellos amigos y compañeros que estuvieron a lo largo de mi proceso de formación.

Esta investigación fue financiada por el proyecto CONACYT C54524 y el proyecto PAPIIT IN201308.

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	6
3. Antecedentes	10
3.1 Sistema olfativo en ratas	10
3.1.1. Percepción del olor en ratas.....	10
3.1.2. Procesamiento/integración central del olor.....	16
3.2. La corteza insular y las memorias de reconocimiento	18
3.3. El estudio conductual de las memorias de reconocimiento olfativas	22
3.4. El sistema colinérgico y las memorias de reconocimiento olfativas	22
4. Planteamiento del problema	30
5. Hipótesis	32
6. Objetivos	33
6.1. Objetivo general.....	33
6.2. Objetivos específicos.....	33
7. Materiales y Métodos	34
7.1. Sujetos.....	34
7.2. Olores.....	34
7.2.1. Recolección de orina de hembra en estro.....	35
7.3. Procedimiento de habituación al olor	35
7.4. Protocolo de generalización y curva de retención a largo plazo al olor	37
7.5. Protocolo de infusiones	39
7.5.1. Cirugía esterotáxica para implantación de cánulas.....	39
7.5.2. Infusión.....	40
7.5.3. Sacrificio y Perfusión.....	41
7.5.4. Histología.....	42

7.6. Análisis de datos.....	42
8. Resultados.....	43
8.1. Habitación al olor a largo plazo e intensidad de la habitación (evocación).....	43
8.2. Generalización.....	46
8.3. Efectos de las infusiones de escopolamina en la corteza insular durante la formación de la memoria al olor.....	53
9. Discusión.....	57
9.1. Habitación al olor a largo plazo e intensidad de la habitación (evocación).....	57
9.2. Generalización.....	58
9.3. Bloqueo de los receptores muscarínicos de la corteza insular durante la formación de las memorias de reconocimiento olfativas.....	59
10. Conclusión.....	62
11. Referencias.....	63

1. Resumen.

La corteza insular (CI) en roedores, se encuentra en el lóbulo temporal y está definida por un área que abarca desde la corteza frontal lateral y la corteza peririnal, en la dirección rostro caudal, y en la porción más ventral de la corteza somatosensorial a la corteza piriforme en la dirección dorso ventral. Es un área que recibe información de todas las modalidades sensoriales e información visceral. En estudios previos se ha reportado la participación de la CI en la formación de memorias de reconocimiento de diferentes modalidades sensoriales. En específico, el bloqueo de los receptores muscarínicos en la CI, con las mismas dosis y en las mismas coordenadas empleadas en este estudio, ha impedido la formación de las memorias de reconocimiento del contexto, de reconocimiento de objetos y de reconocimiento del sabor, no teniendo efecto en la recuperación de estas memorias. Se ha propuesto a la CI como una estructura con participación general en la formación de memorias de reconocimiento, sin definirse aún su alcance. En estudios más recientes se ha encontrado que el bloqueo de los receptores muscarínicos a nivel sistémico impide la formación de memorias de reconocimiento olfativas no asociadas a estímulos relevantes para la supervivencia del organismo, no socialmente aprendidas y con estímulos que no suscitan una respuesta emocional incondicionada en el organismo. El presente trabajo evalúa el papel de los receptores muscarínicos en la CI durante la adquisición y/o consolidación de la formación de la memoria olfativa a largo plazo.

Los objetivos de este trabajo han sido el replicar el protocolo de habituación al olor empleado recientemente, así como evaluar la adaptación de este protocolo que podría servir en otros trabajos sobre generalización de olores. En particular se evaluó el tiempo que es retenida la memoria de reconocimiento a un olor adquirida en este protocolo y se estudió la

participación de los receptores muscarínicos en la CI durante las primeras etapas de la formación de memorias de reconocimiento olfativo.

El protocolo de habituación al olor podría servir para el estudio de memorias de reconocimiento olfativas a largo plazo, los resultados obtenidos sugieren que el tiempo de retención de esta memoria es de al menos 72 horas; y que la participación de los receptores muscarínicos en la corteza insular en la tarea de habituación al olor a largo plazo no parece ser necesaria en las primeras etapas de formación.

Palabras clave: sistema colinérgico, corteza insular y memoria de reconocimiento olfativa.

2. Introducción.

Desde el punto de vista de las neurociencias, la memoria es entendida como cambios en eficacia y número de las conexiones en las redes interactivas de neuronas, así como cambios en la estructura y función de al menos, alguna de las neuronas que las integran (fenómeno conocido como plasticidad neuronal) debido a la experiencia del organismo con su ambiente (Carew & Sutton, 2001). Uno de los principales objetivos de la investigación neurocientífica ha sido describir estas redes y entender los mecanismos de su plasticidad (Tronel & Sara, 2002). El presente trabajo se origina con la finalidad de contribuir en la investigación sobre los diferentes procesos neuroquímicos (estructuras y neurotransmisores) que pueden estar involucrados en la detección multimodal del sabor/olor (gusto).

Cada uno de los circuitos neuronales que permiten el posterior reconocimiento de estímulos discretos (**memorias de reconocimiento**) es diferente. Por ejemplo Kippin y colaboradores (2003) utilizando una técnica de inmunohistoquímica de marcaje del gen de expresión temprana Fos concluyen que, en ratas macho, el olor de orina de hembra en estro activa estructuras diferentes que los olores neutros sexualmente condicionados; Miranda y colaboradores (2009) sugieren que el procesamiento de diferentes olores en las diferentes etapas de la formación de memorias de reconocimiento implica diferentes sistemas de neurotransmisión en diferentes magnitudes. Esto exige que en la investigación de la formación de memorias de reconocimiento se deba establecer puntualmente las estructuras y neurotransmisores implicados en el paradigma conductual utilizado.

El cerebro anterior basal (**CAB**) ha sido implicado en el correcto funcionamiento de las capacidades mnémicas (Miranda, 2000). El CAB es la mayor fuente de inervaciones colinérgicas a la corteza cerebral (Mesulam, Mufson, Wainer & Levey, 1983). Lesiones en

esta estructura son acompañadas de impedimentos de las funciones mnémicas (Helper, Wenk, Cribbs, Olton & Coyle, 1985), siendo la dificultad de formar nuevos recuerdos uno de los primeros síntomas (Katzman, 1986). Se ha especulado que la pérdida de las neuronas colinérgicas en el CAB puede ser la causa de los síntomas de pérdida de las funciones de memoria y las perturbaciones conductuales observados en la demencia de tipo Alzheimer (Bartus, Dean 3rd, Beer & Lippa, 1982), los cuales, cabe mencionar, incluyen una sensibilidad olfativa deficiente (Doty, Reyes & Gregor, 1987).

Diferentes estudios han encontrado que las perturbaciones en los mecanismos colinérgicos tienen implicaciones en las tareas simples de habituación a un olor. Hunter y Murray (1989) inyectaron escopolamina (un antagonista competitivo y no selectivo de los receptores muscarínicos para acetilcolina) a nivel sistémico y encontraron que, en comparación con los grupos controles, los sujetos experimentales fueron incapaces de mostrar tanto habituación a un olor que fue presentado repetidas veces, así como la capacidad para discriminar este de otro nuevo olor. Este efecto se lograba sólo si la administración de la droga era dada antes de la primera exposición al olor, no afectando la memoria de olores previamente aprendidos ni la sensibilidad olfativa. Paolini y McKenzie (1993) realizando una lesión en la región medial de la extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca (**mDBh**, el principal núcleo de inervación colinérgica al bulbo olfatorio y la corteza olfativa; Macrides, Davis, Young, Nadi & Margolis, 1981; Rye, Wainer, Mesulam, Mufson & Saper, 1984) observan la pérdida tanto de habituación como de discriminación a nuevos olores, en comparación con los grupos control y con el mismo grupo antes de la lesión. Con estos experimentos generalmente se ha estudiado la **memoria a corto plazo** (aquella que es retenida por menos de cuatro horas; Sánchez-Andrade, James & Kendrick, 2005); sin embargo, recientemente en el laboratorio se logró desarrollar un

modelo que permite el estudio de la formación de memorias de reconocimiento olfativas a largo plazo. En estos estudios se ha demostrado la formación en un sólo ensayo de estas memorias y que son retenidas al menos por 24 horas. Con este protocolo también se demostró que la adquisición de memorias de reconocimiento de olores incidentales puede impedirse con la administración intraperitoneal de escopolamina durante el periodo de formación (Miranda, et al., 2009).

A pesar de estos resultados los mecanismos concretos de la modulación colinérgica en la formación de memorias de reconocimiento olfativas se desconoce (Wilson, 2006). El presente trabajo pretende someter a prueba la hipótesis de que la participación de los receptores muscarínicos en la corteza insular es necesaria en las etapas tempranas de la formación de memorias de reconocimiento olfativas. Para ello se emplea el protocolo simple de habituación a un olor a largo plazo y se ha trabajado con olores no socialmente relevantes (Miranda et al., 2009). Bermúdez-Rattoni y colaboradores (2005), empleando el antagonista muscarínico escopolamina en la corteza insular, han descrito que cuando la escopolamina es administrada en la CI inmediatamente después de la primera presentación de un objeto se impide la formación de una memoria de reconocimiento del objeto en cuestión, lo que amplía el alcance de la participación de la actividad colinérgica en la corteza insular, jugando un papel más general en la adquisición/consolidación de memorias de reconocimiento y exige la necesidad de delimitar su alcance en otras modalidades sensoriales y tipos de aprendizajes.

Por tanto en esta investigación se evalúa, en primer lugar la capacidad olfativa a largo plazo a través de una tarea simple de reconocimiento al olor, la cual implica la formación de una **memoria de reconocimiento olfativa de largo plazo** (aquella que es retenida al menos 12 horas; Sánchez-Andrade, et al., 2005) que es evaluada 24 horas

después (García-Velásquez, 2008; Miranda et al, 2009). Así mismo, con el fin de comprobar que en sujetos intactos la disminución de la conducta de exploración de un olor en su segunda presentación no se debe a falta de motivación o fatiga, se expone a estos sujetos en el mismo día de la segunda presentación de uno de tres olores a la primera presentación de otro, además de que se mide la retención de la memoria de reconocimiento olfativo exponiendo a los sujetos a la segunda presentación de estos olores con demoras de 24, 48 y 72 horas. Finalmente se estudia el papel de la neurotransmisión colinérgica en la corteza insular en esta tarea simple de habituación a un olor, a través del bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina.

3. Antecedentes.

3.1. Sistema olfativo en ratas.

3.1.1. Percepción del olor en ratas.

El procesamiento nervioso de los olores empieza cuando alguna molécula de una **sustancia volátil**¹ alcanza los receptores de los cilios de las neuronas receptoras olfatorias (**ORN's**). Las ORN's se encuentran incrustadas en el **epitelio olfatorio** que recubre la cara más anterior de la **lamina cribiforme** del hueso etmoides, el epitelio olfatorio se encuentra a lo largo de la parte superior del septum nasal y en la pared medial de la turbina superior del hueso etmoides, en la parte superior-caudal de la cavidad nasal (Fig. 1; Shipley, McLean & Ennis, 1995).

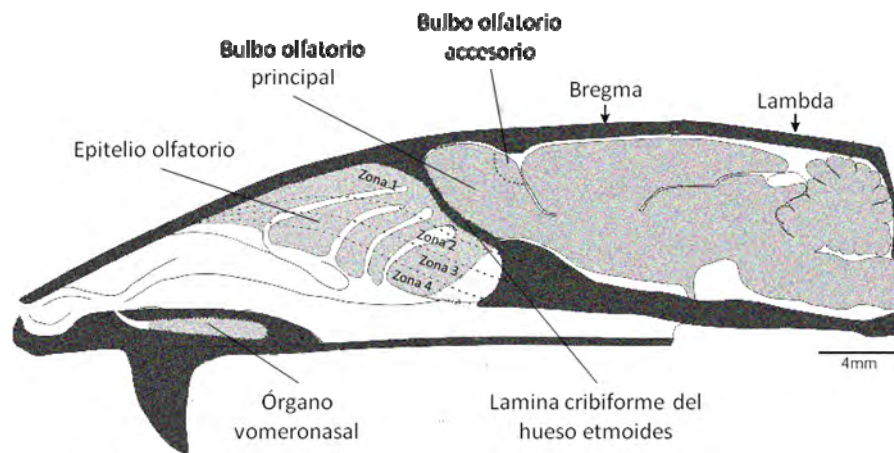


Figura 1. Ubicación del epitelio olfatorio en ratas.

Se estima que el epitelio olfatorio de los roedores se compone de 50 000 000 de ORN's en cada fosa nasal (Lowenstein, 1969; Carlson, 2000). Cada una de estas neuronas extiende

¹ Casi todos los compuestos olorosos son liposolubles y orgánicos, sin embargo muchas sustancias dentro del rango de peso molecular (entre 15 y 300 daltones) y que cumplen con el resto de estos requisitos no huelen (Carlson, 2000).

una ramificación de entre 5 y 20 cilios en la superficie del epitelio olfatorio y proyectan un único axón hacia el bulbo olfatorio (Fig. 2), los axones de estas neuronas se unen para formar de los 15 a 20 ases que integran la **fila olfatoria** y atravesar la lamina cribiforme a través de las perforaciones de esta última (Shiple et al., 1995).

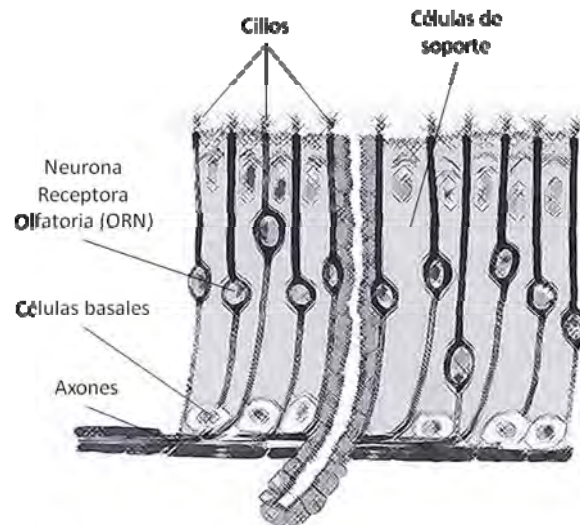


Figura 2. Anatomía del epitelio olfatorio.

Buck y Axel (1991), utilizando técnicas de genética molecular, identificaron una familia de genes nombrada “receptor 7-transmembranal” (**7-TMR**), expresada exclusivamente por las ORN’s del epitelio olfatorio. Esta familia de genes codifica una variedad de 1,000 proteínas diferentes que se alojan en las membranas de los cilios de las ORN’s, además estas proteínas contienen secuencias comunes a todos los receptores ligados a proteínas G (Buck & Axel, 1991; Ressler, Sullivan & Buck, 1994; ver Fig. 3).

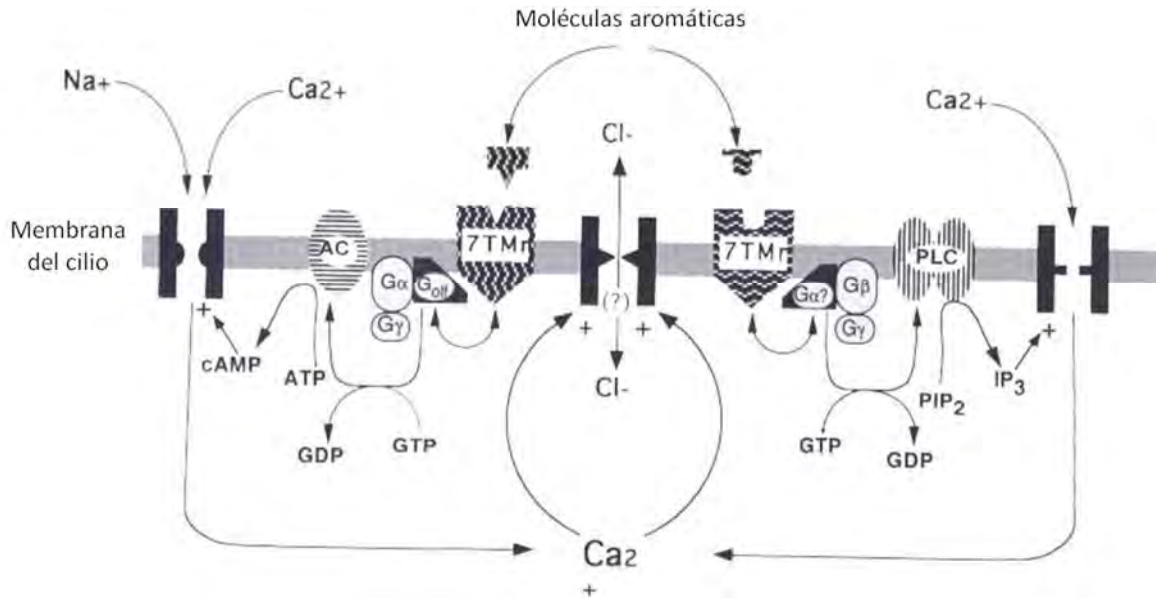


Figura 3. Mecanismo de transducción de los receptores a olores. 7TMr: receptor 7-transmembranal; AC: adenilato ciclasa; PLC: fosfolipasa C; GTP: guanosa trifosfato; GDP: guanosa difosfato; ATP: adenosin trifosfato; cAMP: adenosin monofosfato cíclico; PIP₂: inositol bifosfato; IP₃: inositol trifosfato.

Con técnicas de hibridación in situ para marcar los genes que codifican a los receptores de los olores en los cilios de las ORN's se ha descubierto que neuronas individuales expresan un único tipo de receptor, esto implica que el epitelio olfativo presenta 1,000 tipos diferentes de ORN's (Vassar, Ngai & Axel, 1993; Ressler et al., 1994). Las neuronas que expresan determinado receptor se encuentran azarosamente distribuidas dentro de una de cuatro zonas en el epitelio olfativo, siendo cada zona una banda en el epitelio olfativo (Fig. 1), permitiendo que el flujo de aire inspirado atravesase por las cuatro bandas, sugiriendo una distribución anatómico-funcional del órgano receptor olfativo (Sullivan, Adamson, Ressler, Kazak & Buck, 1996; Nagi, Chess, Doeling, Necles, Macagno & Axel, 1993).

Haciendo uso de marcaje fluorescente anterogrado se ha descubierto que las ORN's que expresan el mismo receptor a olores en sus cilios proyectan sus axones a un mismo glomérulo en el bulbo olfatorio (Saucier & Astic, 1986; Schoenfeld, Clancy & Macrides, 1994). Los **glomérulos** son estructuras discretas ovoides de entre 80 y 160 micras de diámetro y se estima que existen 3,000 de estas estructuras en cada bulbo olfatorio en ratas (Meisami & Safari, 1981). Diferentes receptores son activados por partes estructurales diferentes de una misma molécula aromática con la cual tienen mayor afinidad y activan a otros receptores en menor grado con los cuales tienen menor afinidad (Sicard & Holley, 1984; Firestein, Picco & Manini, 1993; 2000), estos receptores producen un determinado patrón de actividad en los glomérulos dependiendo de la estructura de cada olor, de esta forma la identidad de un olor pasa a un código de actividad concreto en los glomérulos (Ressler et al., 1994), esto quiere decir que cada olor tiene una combinación única de respuestas electrofisiológicas en los glomérulos.

Dentro de los glomérulos las neuronas receptoras a olores establecen sinapsis con las dendritas apicales de las células mitrales y en racimo (**mitral/tufted cells, MC/TC**), y con las células periglomerulares (**PGC's**). Las dendritas de las células mitrales y en racimo tienen contactos sinápticos recíprocos entre sí y con los procesos espinales de las células periglomerulares (Shiple et al., 1995). Las células mitrales y en racimo (MC/TC) son la principal unidad de salida de información del bulbo olfatorio. Antes de alcanzar la corteza cerebral, el estímulo es refinado y procesado a través de las diferentes capas del bulbo olfatorio. Las dendritas de las células granulares (**GC's**) y PGC's (periglomerulares) forman sinapsis dendro-dendríticas recíprocas con las MC/TC's, poseyendo elementos pre y post-sinápticos en las mismas espinas dendríticas (gemmules) tanto las GC's como las PGC's (ver Fig. 4).

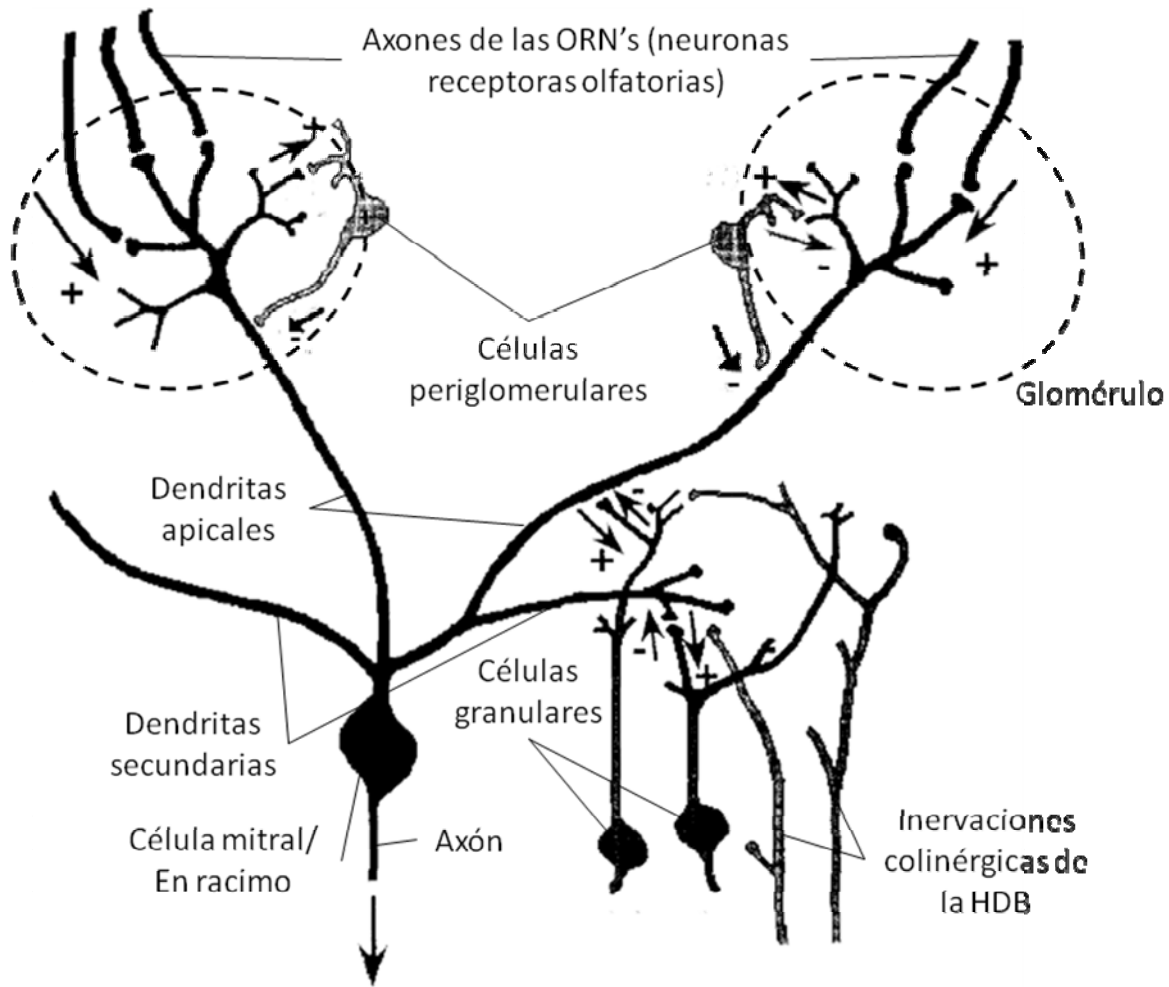


Figura 4. Diagrama de las principales neuronas y sus interacciones sinápticas en el bulbo olfatorio. HDB: extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca.

Shiple, Nickell y McLean, (1986) inyectando marcadores anterógrados iontoforeticamente (iontophoretically) en las neuronas de la banda diagonal de Broca (**DB**) y comparando este marcaje con el patrón de tinción de acetilcolinesterasa (**AChE**, enzima que degrada a la acetilcolina) en el bulbo olfatorio, han descubierto que los puntos principales de acción sináptica de las fibras provenientes de la DB son la capa glomerular, la capa plexiforme externa (**EPL**), la capa plexiforme interna (**IPL**) y la mitad más superficial de la capa de las células granulares (**GCL**). La liberación de acetilcolina (**ACh**;

disparada por la atención del organismo hacia un estímulo olfativo) por parte de las proyecciones sinápticas centrifugas establecidas con las interneuronas granulares GABAérgicas reduce la liberación de GABA (a través de receptores M2, acoplados a proteínas Gi) hacia las MC/TC's y en consecuencia las desinhibe. Estas células MC/TC's desinhibidas, que están siendo estimuladas por las ORN's, incrementan su liberación de glutamato en sus sinapsis dentro-dendríticas recíprocas con las GC's. Esto resulta tanto en una mayor autoexcitación de las MC/TC en sus receptores glutamatérgicos presinápticos y a su vez incrementan la retroalimentación inhibitoria de las GC's hacia las dendritas de las MC/TC's (Sánchez-Andrade, et al. 2005; Fig. 5). Esto quiere decir que la liberación de ACh debido a la atención al estímulo olfativo tiene como resultado el incremento del impulso electrofisiológico de las células mitrales hacia los niveles superiores de procesamiento del estímulo olfativo².

² Cabe aclarar aquí que este mecanismo puede ser desencadenado por la liberación de noradrenalina (NA) en las terminales axónicas del bulbo olfatorio provenientes del locus coeruleus (LC; McLean, Shipley, Nickell, Aston-Jones & Reyher, 1989), pero esta liberación es desencadenada por estímulos motivacionales, como el sexo o aquellos que son socialmente relevantes (Kendrick, Levy & Keverne, 1995; Brennan & Keverne, 1997; Sánchez-Andrade, et al. 2005)

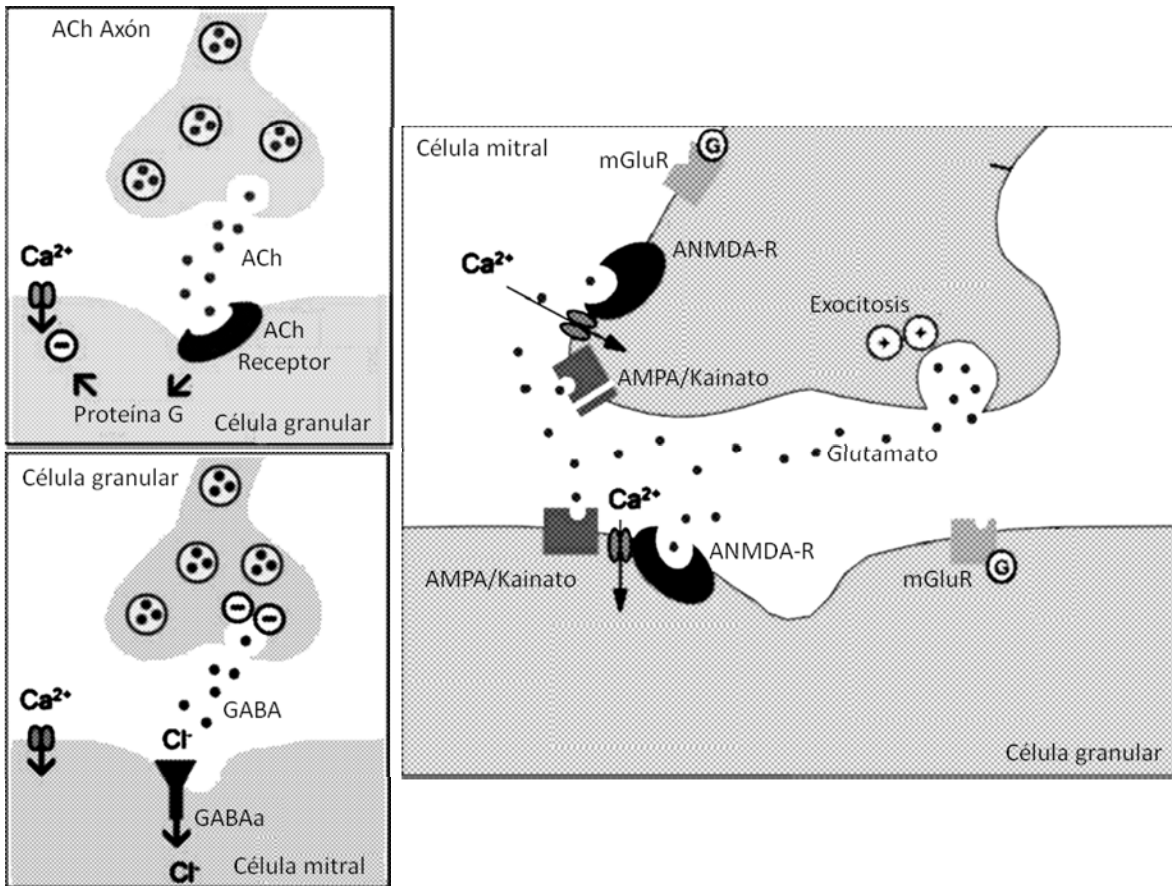


Figura 5. Liberación de acetilcolina en las células granulares del bulbo olfatorio y la consecuente desinhibición de las células de salida del bulbo. ACh: acetilcolina; mGluR: receptor metabotrópico a glutamato; AMPA/Kainato: receptor ionotrópico al glutamato y al ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico y al monohidrato del ácido acético-2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil; NMDA-R: receptor ionotrópico al glutamato y al N-metil-D-aspartato.

3.1.2. Procesamiento/integración central del olor.

Los axones de las células mitrales (y en menor grado las células en racimo) envían el estímulo electrofisiológico hasta la corteza entorhinal, a través del tracto olfatorio lateral (LOT). En su transcurso pasa por varias zonas estimulándolas. Estas zonas (desde la más

anterior hasta la más posterior) son: núcleo olfatorio anterior (**AON**), tubérculo olfatorio (**Tu**), corteza piriforme (**PCX**), la corteza periférica a la amígdala y la corteza entorhinal (Shipley et al., 1995; Buck, 2001; Sánchez-Andrade, et al. 2005). En conjunto, las regiones inervadas directamente por el tracto olfatorio lateral (LOT) han sido nombradas como la corteza olfatoria primaria (**POC**; De Olmos, Hardy & Heimer, 1978). La corteza olfatoria primaria (POC) alcanza áreas de la neo-corteza implicadas en la percepción y la toma de decisiones, así como áreas en el sistema límbico implicadas en las respuestas emocionales y motivacionales, y el hipocampo (Sánchez-Andrade, et al. 2005; Fig. 6).

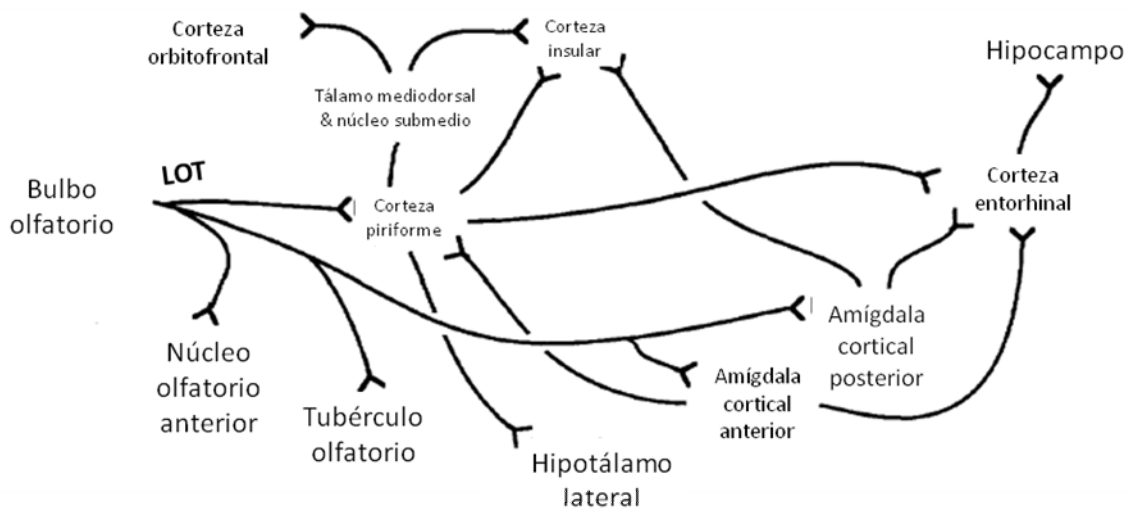


Figura 6. Diagrama esquemático de las principales conexiones del sistema olfatorio.

Las neuronas en la porción anterior de la corteza piriforme (**aPCX**) muestran campos receptivos a olores similares a los reportados en las ORN's y los glomérulos (Wilson 1998a; 2000b). Los campos receptivos de la corteza piriforme son neuronas que individualmente responden a un determinado olor, que una vez combinado con otros olores

es tratado como un estímulo complejo individual (Wilson, 2000a). Wilson (2001) ha propuesto que la formación de estos campos requiere de experiencia.

El estímulo olfativo llega a la corteza olfatoria primaria, donde es procesado, luego de lo cual es redirigido a otras regiones del cerebro que integran la información olfativa con otras funciones neuronales (Shipley et al., 1995). La formación inicial de la memoria y su retención a corto plazo requieren de un sistema distribuido, mientras que después de la consolidación (después de 8 h), sólo el bulbo olfatorio y la corteza periforme han demostrado ser importantes para su correcta evocación (Sánchez-Andrade, et al. 2005). El presente trabajo pretende comprobar la hipótesis de que el bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular durante la adquisición/consolidación de una memoria de reconocimiento olfativo impide su formación, evaluando su evocación 24 horas después.

3.2. La corteza insular y las memorias de reconocimiento olfativas.

La corteza insular es una área que en la rata se encuentra en el lóbulo temporal, en la orilla dorsal del surco rhinal, se encuentra rostro-caudalmente entre la corteza frontal lateral (**LF**) y la corteza perirhinal (**PrhCX**) y se extiende en dirección dorso-ventral desde la corteza sensorial primaria y secundaria (**SI** y **SII** respectivamente) hasta la corteza piriforme (**PCX**; Saper, 1995; Norgren, 1995; Miranda, 2000). La CI se divide en tres bandas que la atraviesan horizontalmente: la ínsula granular (**GI**) la ínsula disgranular (**DI**) y la ínsula agranular (**AI**), las cuales reciben su nombre por la densidad de células granulares en la capa IV, siendo más prominente en la GI, menos prominente en la DI y ausente en la AI (Saper, 1995; Fig. 7). Otra diferencia importante entre estos tres campos que conforman la CI es que la DI es la corteza principal de la sensación gustativa en ratas, mientras que la GI recibe aferencias viscerales generales y la AI posee las eferencias preponderantes de la CI

hacia las estructuras autonómicas, como el hipotálamo posterolateral (**PLH**) y la amígdala (**A**; Allen, Saper, Hurley & Cechetto, 1991).

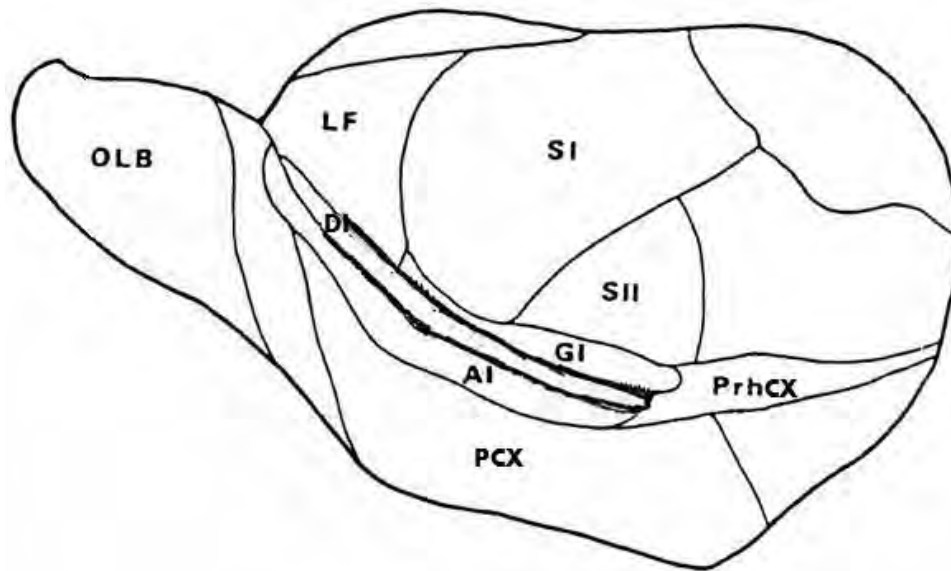


Figura 7. Ubicación y divisiones anatómicas de la corteza insular en ratas. OLB: bulbo olfatorio; LF: corteza frontal lateral; PrhCX: corteza perirhinal; SI: corteza somatosensorial primaria; SII: corteza somatosensorial secundaria; PCX: corteza piriforme; GI: ínsula granular; DI: ínsula disgranular; AI: ínsula agranular.

La memoria reside en parte en aquellas regiones del cerebro que tienen que ver con la modalidad y/o información específica de los estímulos que la conforman, así como en estructuras cerebrales que codifican varios tipos de memoria, considerándose estas estructuras componentes básicos de sistemas de memoria generales (Miranda, 2000). Se ha establecido que las cortezas perirhinal, parahipocampal y entorhinal, junto con el hipocampo son estructuras implicadas en la formación de memorias de reconocimiento de manera general (Bermúdez-Rattoni, Okuda, Roozental, & McGaugh, 2005). Se ha

demostrado que la CI recibe información de todas las modalidades sensoriales: gusto, olfato, audición, somestesis y visión (Mesulam & Mufson, 1982a, 1982b), además de que se ha demostrado que lesiones permanentes en la ínsula anterior (**aCI**) impiden el condicionamiento aversivo al sabor (**CAS**), este procedimiento se establece presentando un sabor novedoso al organismo, el cual es seguido por un malestar gastrointestinal, con lo cual se genera como consecuencia una conducta de aversión hacia este sabor por parte del organismo (Yamamoto, 1993), se ha demostrado también que la inactivación reversible de la CI con tetrodotoxina (**TTX**, que bloque los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, con lo cual se evita que los potenciales de acción se propaguen a lo largo del axón de las neuronas afectadas por la toxina), produce deterioros severos en la consolidación de la evitación inhibitoria³ y el aprendizaje espacial en el laberinto de agua (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison & McGaugh, 1991). Para el caso, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores muscarínicos con infusiones de escopolamina en la CI impide la formación de memorias de reconocimiento de objetos (Bermúdez-Rattoni et al. 2005), así como la inhibición latente⁴ en una tarea de evitación inhibitoria y la evitación inhibitoria misma (Miranda & Bermudez-Rattoni, 2006), además de que esta misma manipulación farmacológica en la CI impide la inhibición latente en el CAS y el CAS mismo (Naor & Dudai, 1996; Gutierrez, Rodriguez-Ortiz, DeLaCruz, Núñez-Jaramillo & Bermudez-Rattoni, 2003). Estos resultados sugieren que la CI es una estructura con participación general en la formación de memorias de reconocimiento.

³ La evitación inhibitoria es un protocolo útil para el estudio de la memoria, cuando un organismo evita pasar a un contexto que previamente ha sido asociado con un estímulo aversivo, demuestra que lo recuerda como un lugar nocivo (Miranda & Bermudez-Rattoni, 2006).

⁴ La inhibición latente se define como la pre-exposición de un estímulo neutro que lo hace resistente a ser asociado con estímulos incondicionados (Anderson, 2001a).

La corteza insular es activada durante el procesamiento del estímulo olfativo directamente por el núcleo olfatorio anterior (AON), la corteza piriforme (PCX), la amígdala cortical posterior, e indirectamente a través del núcleo submedio y mediodorsal del tálamo que reciben aferencias del AON, la PCX, la amígdala y la corteza entorhinal (Shipley et al., 1995; Buck, 2001; Sánchez-Andrade, et al. 2005; Fig. 6).

En un estudio con humanos mediante el uso de tomografía de emisión por positrones (**PET**) y en una tarea de discriminación de olores, se ha descubierto actividad significativa, en comparación con la línea base tomada antes de la segunda presentación del olor, en la corteza insular en la retención a corto y largo plazo de un olor (Dade, Zatorre, & Jones-Gotman, 2002). Al respecto, existe un modelo animal que permite el estudio de la memoria olfativa, el cual consiste en presentar a sujetos sedientos una probeta graduada llena de agua la cual esta acoplada a un bebedero de metal para que las ratas puedan beber el agua al mismo tiempo que se presenta un olor, el estímulo odorífico es inmediatamente apareado con un malestar gástrico, con lo cual se consigue que los sujetos desarrollen una leve aversión al agua que presenta el mismo olor en una segunda presentación de la probeta, este modelo es llamado condicionamiento aversivo al olor (**CAO**; Bernstein, 1991). Si en la fase de adquisición (en la primera presentación del olor, antes del malestar gástrico) el olor es presentado simultáneamente con un estímulo gustativo novedoso, los sujetos sedientos desarrollan una aversión fuerte a la presentación sola del olor en la fase de prueba, este modelo es conocido como aversión al olor potenciada por el sabor (**TPOA**; Palmerino, Rusiniak & García, 1980). Dardou y colaboradores (2006) han descubierto actividad significativa de la CI en la evocación del PTOA, medida por la presencia de los genes de expresión temprana Fos y Egr1. Además se ha demostrado que lesiones en la CI impide el aprendizaje aversivo a los olores potenciado por sabor (TPOA), así como el CAS

mismo (Lasiter, Deems & Garcia, 1985). A pesar de los datos que sugieren la participación de la CI en la memoria olfativa, hasta ahora no se ha mostrado evidencia directa que vincule a la CI con una prueba simple de habituación a un olor medida a largo plazo, como la tarea empleada en este trabajo.

3.3. Estudio conductual de las memorias de reconocimiento olfativas.

El estudio conductual de la memoria olfativa se entiende como aquellas pruebas que permiten comprobar conductualmente si un organismo recuerda o no un olor previamente experimentado. El tiempo entre la fase de adquisición y la fase de prueba permite estudiar la retención a corto plazo si el intervalo es menor a 4 horas o a largo plazo, si el intervalo es mayor a 12 horas (Sánchez-Andrade, et al., 2005). Las pruebas conductuales se pueden dividir en incondicionadas si emplean una pista olfativas que desencadena respuestas de forma incondicionada, como las feromonas (Bruce, 1960), socialmente relevantes si se emplea una pista social, como por ejemplo el reconocimiento de otro miembro de la misma especie (Engelmann, Wotjak & Landgraf, 1995), asociativas si emplean olores como estímulos condicionados asociados a reforzadores (Roman, Simonetto & Soumireu-Mourat, 1993), o incidentales si se emplea un olor social y emocionalmente neutro, sin estar asociado con ninguna consecuencia relevante para el organismo (Hunter & Murray, 1989). La prueba conductual empleada en este trabajo es de tipo incidental a largo plazo (Miranda et al., 2009).

3.4. El sistema colinérgico y las memorias de reconocimiento olfativas.

La acetilcolina (ACh) es sintetizada a partir de acetil co-enzima A (**acetil-CoA**) y colina por la acción de la enzima colina acetiltransferasa (**ChAT**) y es degradada en acetato y

colina por la enzima acetilcolinesterasa (**AChE**). La ACh es sintetizada y almacenada en vesículas principalmente en los somas celulares, pero una cierta cantidad es sintetizada en las terminales axónicas, a donde es transportada desde el soma y donde es almacenada en vesículas, las cuales son las encargadas de liberar el neurotransmisor hacia el espacio sináptico. Después de ser liberada, la ACh se liga a sus respectivos receptores o es degradada por la AChE y la colina residual es transferida de vuelta a la terminal neuronal por transportadores de colina, donde es reutilizada en la síntesis de ACh (Tohyama & Takatsuji, 1998a; ver Fig. 8).

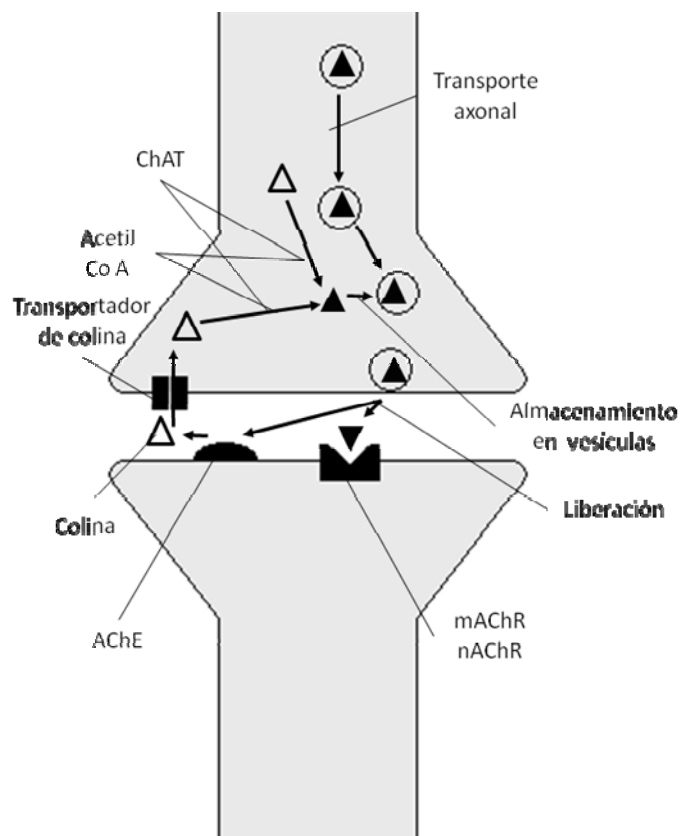


Figura 8. Síntesis y degradación de la acetilcolina. ChAT: colina acetiltransferasa; Acetil Co A: acetil co-enzima A; mAChR: receptor muscarínico a la acetilcolina; nAChR: receptor nicotínico a la acetilcolina; AChE: acetilcolinesterasa.

Los receptores colinérgicos son clasificados en nicotínicos (**nAChR**), los cuales son inotrópicos y abren canales permeables al Na⁺ y al Ca⁺⁺; y muscarínicos (**mAChR**) los cuales son metabotrópicos y se encuentran ligados a proteínas G, de los cuales existen 5 subtipos, los **m1-5**. El subtipo m1 de los mAChR es el más abundante en la corteza cerebral (Tohyama & Takatsuji, 1998b).

Existen dos principales áreas que concentran los somas de las grandes neuronas colinérgicas de proyección, el tegmento mesopontino y el cerebro anterior basal (**CAB**). Los grupos colinérgicos que concentra el CAB son: el septum medial (**MS**; grupo Ch1), la extremidad vertical de la banda diagonal de Broca (**DBv**; grupo Ch2), los cuales proveen la mayor cantidad de proyecciones colinérgicas del hipocampo; la extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca (**DBh**; grupo Ch3), el cual provee la mayor innervación colinérgica hacia el bulbo olfatorio y la corteza olfatoria primaria (POC) y el núcleo basal magnocelular (**NBM**; grupo Ch4), el cual proyecta principalmente hacia la neocorteza. Las neurona colinérgicas pontinas se concentran el tegmento latero dorsal (LDT; grupo Ch5) y pedunculopontino (PPT; grupo Ch6) e inervan el tálamo (**Th**) y la formación reticular (**RF**) del tallo cerebral (Mesulam et al., 1983; Woolf, 1991; Saper, 2001; ver Fig. 9).

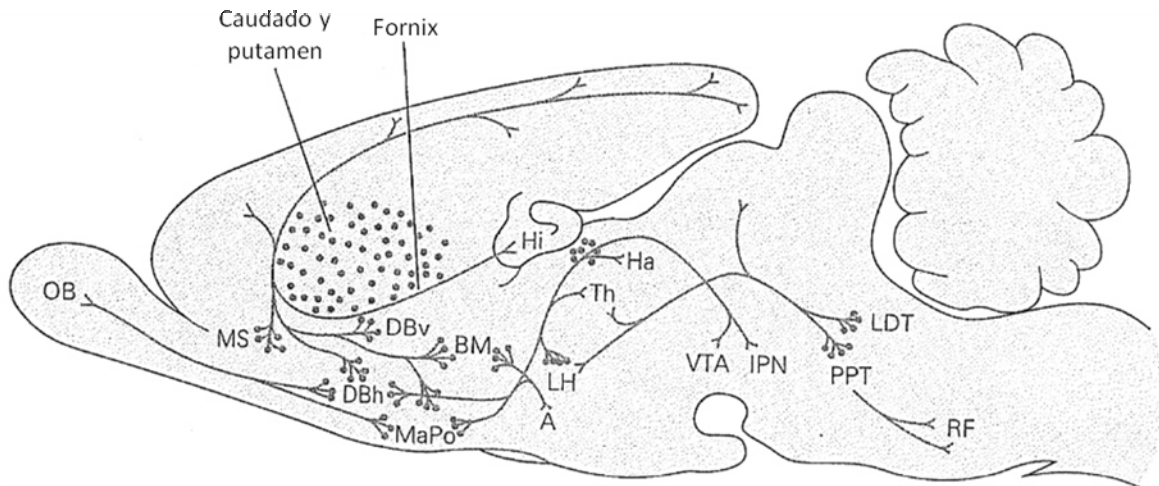


Figura 9. Sistema colinérgico. MS: septum medial; DBv: extremidad vertical de la banda diagonal de Broca; DBh: extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca; BM: núcleo basal magnocelular; Hi: hipocampo; Am: amígdala; LDT: núcleo latero dorsal tegmental; PPT: pedúnculo pontino tegmental; RF: formación reticular; Th: tálamo; Ha: habenula; IPN: núcleo interpeduncular; LH: hipotálamo lateral; MaPo: núcleo preóptico magnocelular; OB: bulbo olfatorio; VTA: área ventral tegmental.

Uno de los primeros síntomas en la enfermedad de Alzheimer (**EA**) es la dificultad de formar nuevos recuerdos (Katzman, 1986). En pacientes con este padecimiento se ha observado una reducción del 20% en promedio de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (que en la rata se conoce como núcleo basal magnocelular; NBM) en comparación con sujetos de la misma edad que no muestran alteraciones neurodegenerativas (Perry, Tomilson & Blessed, 1978). Se ha demostrado en ratas el desarrollo de placas neuríticas, marañas neurofibrilares, atrofia y pérdida neuronal en la corteza, parecidas a las presentes en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, 14 meses después de la lesión en NBM unilateralmente, mientras que no se observan cambios en el hemisferio contralateral al NBM lesionado (Arendash, Milard & Dunn, 1987). El núcleo

basal magnocelular (NBM) tiene proyecciones colinérgicas hacia la amígdala, las cortezas piriforme, entorrinal, insular, frontal, parietal, temporal y visual (Woolf, 1991), lo que apoya a la idea de que la participación del sistema colinérgico de la corteza insular es importante para la adquisición de nuevos conocimientos. Sin embargo se ha sugerido que la pérdida neuronal y las lesiones en el NBM implican a otros sistemas de neurotransmisión, en especial el sistema GABAérgico (Miranda, 2000), no siendo contundente la evidencia a favor del decremento de ACh como explicación de los trastornos mnémicos observados en la EA.

La acetilcolina y los receptores muscarínicos han demostrado tener un papel crucial en el aprendizaje. Se ha descubierto en la corteza motora de ratas, que casi todas las células a las que se registró su actividad electrofisiológica (a excepción de solo una) que se activaban durante el condicionamiento, también se activaban por la administración de acetilcolina (Mednikova, 1990). Es remarcable la cantidad de células colinérgicas que intervienen durante el condicionamiento pues el conteo de los somas celulares que responden a anticuerpos dirigidos a receptores muscarínicos o a acetilcolinesterasa ha revelado que solo entre el 15.6% y al 14.7% de células en la corteza cerebral son colinoceptivas (Woolf, 1993). Se ha descubierto el aumento significativo en la liberación de acetilcolina medida por microdiálisis en la corteza insular y el hipocampo solo cuando se establece el aumento en la conducta de presionar una palanca, lo que indica que las ratas están empezando a asociar la conducta operante con el reforzador (Orsetti, Casamenti & Pepeu, 1996).

El engrama se define como un cambio funcional y físico en el cerebro debido a la experiencia. Se ha planteado un modelo de plasticidad dendrítica en las neuronas de la corteza y el hipocampo para la formación de memorias. En el modelo se plantea que los

cambios se inician por la actividad neuronal y la consecuente liberación de neurotrofinas, seguida por el incremento en la liberación de ACh, la respuesta de los receptores muscarínicos, la fosforilización de la fosfolipasa C (PLC) y la generación del segundo mensajero inositol trifosfato (IP3), que incrementa los niveles de Ca²⁺ en el citosol, la degradación de la proteína 2 microtubulo-asociada (**MAP-2**), y finalmente a la formación de una nueva dendrita. Las neuronas colinoceptivas y sus dendritas modificables sirven como “unidades de engramas” en la corteza y el hipocampo (Woolf, 1998).

Existen datos abundantes que apoyan el papel colinérgico en el procesamiento sensorial general (Wenk, 1997; Sarter & Bruno, 1997). Empleando la técnica de microdiálisis se ha descubierto la liberación significativa de ACh en la corteza cuando los sujetos son colocados en un nuevo contexto, pero este incremento no se presenta cuando el mismo contexto resulta familiar para el sujeto (Acquas, Wilson & Fibiger, 1996), este aumento en la liberación de acetilcolina se ha observado igualmente durante el consumo de un sabor que no ha sido probado anteriormente (Miranda, Ramirez-Lugo & Bermudez-Rattoni, 2000), mas no así cuando este sabor a sido ingerido en anteriores ocasiones y de igual manera este incremento es observable ante la primera presentación de estímulos de las modalidades sensoriales visual, auditiva, olfativa y táctil (Inglis & Fibiger, 1995). En especial, el bloqueo de los receptores muscarínicos con infusiones de escopolamina en la CI ha demostrado el impedimento de diferentes formas de memoria como el reconocimiento de objetos (Bermúdez-Rattoni et al. 2005), la inhibición latente (Miranda & Bermudez-Rattoni, 2006; Naor & Dudai, 1996), la evitación inhibitoria (Miranda & Bermudez-Rattoni, 2006) y el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS; Naor & Dudai, 1996), solo si el boqueo ocurre durante la fase de adquisición y/o consolidación. En conjunto estos

resultados siguieren que la ACh regula la formación de memorias de reconocimiento de diversas modalidades sensoriales durante los primeros estadios.

Con respecto a la formación de memorias de reconocimiento olfativas, la estimulación eléctrica del tracto olfatorio lateral (LOT) y la corteza piriforme (PCX) incrementan la actividad electrofisiológica de la región medial de la extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca (Linster & Hasselmo, 2000). Existen aferentes provenientes de la PCX, la corteza orbitofrontal y la corteza insular al cerebro anterior basal (CAB; Zaboroski, Cullinan & Braun 1991; cit. En Miranda, 2000), estas mismas están involucradas en las primeras etapas de la formación de memorias de reconocimiento olfativas (Sánchez-Andrade et al. 2005) y podrían ser a través de las cuales es activado el CAB.

La alteración del sistema colinérgico está implicada en alteraciones de varias formas de memoria olfativa. La inyección intramuscular de escopolamina en ovejas después del parto, durante la consolidación del reconocimiento del olor de su cordero, impide el reconocimiento de este último por la oveja madre, la cual no establece un vínculo maternal con este cordero (Ferreira, Gervais, Durkin, & Lévy, 1999). En una prueba de igualación a la muestra con demora, en la cual se entrena a sujetos a que se dirijan hacia el lugar de donde emana el mismo olor que fue presentado previamente justo antes de la demora, la inyección intraperitoneal de escopolamina impide la memoria a corto plazo del olor (Ravel, Vigouroux, Elaagouby & Gervais, 1992). Por el contrario, la inyección intraperitoneal del inhibidor de la enzima que degrada a la ACh, la acetilcolinesterasa, la fisostigmina, mejora el desempeño en una tarea de reconocimiento del olor (Doty, Bagla & Kim, 1999).

En cuanto a la formación de memorias incidentales, se ha demostrado que, empleando una tarea simple de habituación a un olor no socialmente relevante ni asociado a

consecuencias importantes para el individuo, tanto la administración sistémica de escopolamina (Hunter & Murray, 1989), como la lesión en la zona medial de la extremidad horizontal de Broca (mDBh; Paolini & McKenzie, 1993), impiden la formación de la memoria de reconocimiento olfativa a corto plazo. De acuerdo con la observación de que la acetilcolina interviene en los primeros estadios de la formación de memorias de reconocimiento, no es extraño el descubrimiento de que la administración sistémica de escopolamina durante la adquisición/consolidación de la memoria olfativa, pero no si la inyección intraperitoneal es dada 15 minutos antes de la evocación, en una prueba simple de habituación a largo plazo (Miranda et al., 2009). A pesar de los avances de la investigación en este tema los mecanismos concretos de la modulación colinérgica en la formación de memorias de reconocimiento olfativas se desconoce (Wilson, 2006).

4. Planteamiento del problema.

Paolini y McKenzie (1993) realizaron cuatro sesiones de una adaptación del protocolo de habituación-deshabitación desarrollado por Hunter y Murray (1989), descubrieron que al décimo día las ratas no mostraron la disminución en el tiempo de olfateo hacia un olor al que previamente han sido expuestas. De Gasperín-Estrada, Camacho y Paredes (2008), emplearon una adaptación propia del mismo protocolo (Hunter & Murray, 1989) y encontraron que el fenómeno de habituación a largo plazo dejaba de darse al séptimo día. Miranda y colaboradores (2009) demostraron que en una sola exposición los sujetos son capaces de retener el recuerdo del olor al menos 24 horas, encontrando la disminución de la conducta de exploración durante la segunda exposición a un olor 24 horas después de la primera. La pregunta que surge es *¿la habituación a un olor mostrada por ratas después de la primera exposición a este olor es mantenida por más de 24 horas?*

La generalización se entiende como la emisión de respuesta por parte de un organismo ante un estímulo con el cual no ha sido condicionada esta respuesta, pero que comparte algunas características con el estímulo que si ha sido condicionado (Anderson, 2001a). *¿En comparación con el olor presentado por segunda vez, un olor nuevo es capaz de aumentar los tiempos de exploración?*

Se ha reportado que la administración sistémica de escopolamina impide la formación de memorias de reconocimiento olfativo a largo plazo, existe evidencia que sugiere que la participación del sistema colinérgico en la corteza insular es importante para la formación de nuevas memorias, incluyendo las memorias incidentales (aquellas que no están asociadas con consecuencias relevantes para la supervivencia del organismo, ni son socialmente relevantes), así como también hay pruebas de la participación de la corteza insular en los primeros estadios de la formación de memorias olfativas, la pregunta es *¿el*

bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular impide la formación de memorias de reconocimiento olfativas a largo plazo? La respuesta a esta pregunta supondría que la corteza insular, a través de la actividad colinérgica, forma parte del engrama que permite el reconocimiento a largo plazo de un olor.

5. Hipótesis

- a) La habituación al olor, después de la primera exposición a éste, se mantiene por más de 24 horas.

- b) Un olor novedoso que se presente después de olores familiares, incrementa la conducta de exploración, esto es el tiempo de olfateo.

- c) El bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular antes de la presentación de olores novedosos impide la formación de las memorias de reconocimiento olfativas a largo plazo.

6. Objetivos

6.1. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar a través de una tarea simple la memoria de reconocimiento olfativa a largo plazo para saber la capacidad de retención a largo plazo de olores con diferente relevancia, así como si existe generalización de la habituación a estos olores. Asimismo, evaluar la función de la actividad colinérgica en la corteza insular durante la formación de las memorias olfativas a largo plazo, a través de la manipulación farmacológica de sus receptores muscarínicos.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Establecer el protocolo de habituación al olor a largo plazo y comprobar si la respuesta de habituación es mantenida con intervalos de 24, 48 y 72 horas.

- b) Estudiar si existe el fenómeno de generalización de la habituación de la respuesta de olfateo a olores familiares y novedosos en el mismo día, para determinar si los sujetos discriminan estos dos estímulos.

- c) Determinar si los receptores muscarínicos en la corteza insular son necesarios durante la formación de la memoria de reconocimiento al olor, a través de infusiones de escopolamina (antagonista muscarínicos) inmediatamente antes de la presentación de un olor novedoso.

7. Materiales y métodos

7.1. Sujetos

Se emplearon en total 69 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 250 – 300 g de peso al llegar al vivario de laboratorio, de los cuales uno tuvo que ser excluido al enfermar y morir antes de terminado el experimento. Según los estándares de trabajo del laboratorio las ratas fueron mantenidas en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum* bajo un ciclo de luz invertido de doce horas de luz (9:00 p.m a 9:00 a.m) y doce de oscuridad (9:00 a.m a 9:00 p.m), en un cuarto con temperatura regulada a 23°C. Los trabajos se realizaron durante la fase de oscuridad, siendo la fase de mayor actividad de los animales. Los sujetos fueron mantenidos en estas condiciones al menos una semana antes y hasta terminado el experimento. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Guía del Cuidado y USI de Animales de Laboratorio y Reglas en la Materia de Salud NIH (Secretaría de Salud, México) y son aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.

7.2. Olores

Se utilizó esencia de menta (Just, Walzhausen, Switzerland; en una concentración 1:10) y acetato de amilo (Sigma-Adrich, Milwaukee, WI; en una concentración 1:10) como olores neutrales/ no socialmente relevantes. Orina de hembras en la fase de estro se empleó como olor con relevancia social (De Gasperín-Estrada et al., 2008).

7.2.1. Recolección de orina de hembra en estro.

La orina fue recolectada con una jeringa de 1ml de una superficie de acero inoxidable completamente limpia, sobre la cual orinan las hembras en estro⁵. Las hembras permanecen sobre esta superficie hasta que orinan. Las muestras de orina de diferentes ratas en estro se colocan juntas en los mismos tubos eppendorff y se mantienen congeladas hasta el momento de la prueba (De Gasperín -Estrada et al., 2008).

7.3. Procedimiento de habituación al olor

Una semana después de su llegada al bioterio, las ratas fueron colocadas dentro de una caja cúbica de acrílico con la base de reja de acero inoxidable (28x22x22cm), comúnmente usada para tareas de aprendizaje de contexto y acondicionada para los experimentos de habituación al olor. La caja tiene una ranura libre, que comunica al exterior, ubicada a una distancia de 6cm de la base. La cara posterior y lateral derecha de la caja se encuentran cubiertas con papel blanco para evitar distracciones al animal. La cara lateral izquierda es de lámina, y es donde se localiza la ranura. La cara frontal está libre, para poder observar a las ratas. En la ranura se pone una cajita para pesar (3x3cm) con un filtro previamente humedecido ya sea con 10µl de agua o del olor que corresponda.

Para evitar el estrés de la manipulación las ratas fueron expuestas a un periodo de habituación. Este periodo consta de dos fases: la primera en la cual las ratas son habituadas al trato del experimentador, consta de tres días en los cuales el experimentador manipula a las ratas dentro del cubículo y delante de la caja donde se llevan a cabo las pruebas por tres

⁵Hembras de la cepa Wistar, gonadectomizadas al menos 2 semanas antes de la recolección. Cada hembra es inyectada con 25 µg de benzoato estradiol 52-56 h y 1mg progesterona 4-6 h antes de ser colocadas sobre la superficie de acero (De Gasperín -Estrada et al., 2008).

minutos cada día. Con esto se logra que las ratas se acostumbren al contexto y al olor del experimentador. La segunda en la cual las ratas son habituadas a la caja donde se llevan a cabo los trabajos con olor. Consta de tres días en los cuales se les deja a las ratas por tres minutos dentro de la caja, en la cual se coloca un plato plástico para pesar con un trozo de papel humedecido con agua (10 μ l) y se registra el tiempo que estas colocan la nariz al mismo tiempo que mueven las narinas en la ranura y/o a una distancia de 5cm al rededor.

Un total de 32 sujetos fueron empleados en esta tarea. Durante la fase de adquisición del olor (Día 1; ver Fig. 10) las ratas fueron colocadas en la cámara acondicionada para los trabajos con olor y se les presentó un papel humedecido con agua a través de la ranura de la caja. Pasados 3 minutos, durante los cuales registro el tiempo que las ratas olfatearon a través de la ranura (medida que se tomo como línea base), la ranura quedó libre por un minuto, inmediatamente después de lo cual se colocó papel filtro humedecido con el olor a menta (10 μ l en una concentración 1:10; Just, Walzhausen, Switzerland) por tres minutos e igualmente se tomó el tiempo que la rata pasó olfateando a través de la ranura. El día de prueba (Día 2; ver Fig. 10), se realizo 24 horas después del día 1. Al igual que el día de adquisición, en el día de prueba los sujetos son puestos nuevamente en la misma cámara, de igual manera son expuestos por tres minutos a trocitos de papel filtro humedecidos con agua desionizada a través de la ranura que posee esta cámara, seguido por un intervalo de un minuto durante el cual la ranura queda libre, inmediatamente seguido por un intervalo de tres minutos durante el cual se expuso a los sujetos a un trocito de papel filtro humedecido con olor a menta a través de la ranura. Tanto en el tiempo de exposición al agua como al olor se cuantifico el tiempo que los sujetos investigaban la ranura. Las fases de adquisición (Día 3; ver Fig. 10) y prueba (Día 4; ver Fig. 10) se repiten 24 horas después del día 2 con el olor de acetato de amilo (10 μ l en una

concentración 1:10; Sigma-Adrich, Milwaukee, WI). El orden de los olores fue contrabalanceado entre sujetos en este caso. Se considera como medida de exploración del sujeto el tiempo que los sujetos colocan la nariz al mismo tiempo que mueven las narinas en la ranura y/o a una distancia de 5 cm alrededor. Los animales fueron manipulados con gentileza en el transcurso de todo el trabajo. (ver Fig. 10).

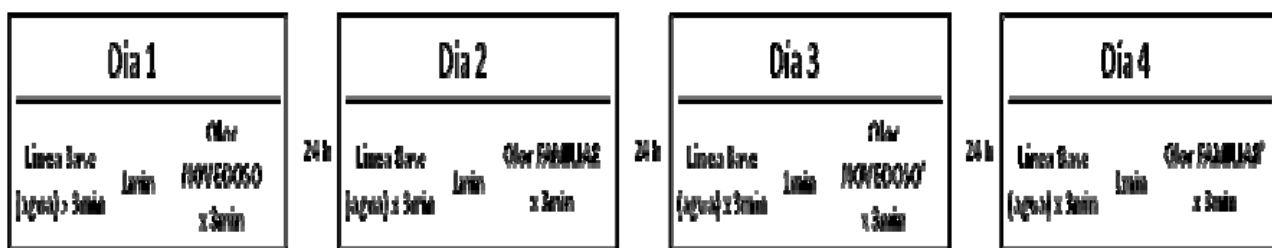


Figura 10. Protocolo de habituación al olor. Este grupo se conformó de 32 sujetos.

Este grupo sirvió para establecer el protocolo de memoria de habituación al olor a largo plazo estandarizado ya por el laboratorio. Los datos obtenidos con este grupo no se muestran.

7.4. Protocolo de generalización y curva de retención a largo plazo al olor.

Para el estudio de la generalización en el protocolo de habituación al olor se emplearon 16 sujetos, los cuales fueron, al igual que el grupo anterior, habituados a los procedimientos experimentales antes de empezar el experimento. Durante la fase de adquisición (Día 1; ver Fig. 11A) se registraron tres minutos de línea base y el tiempo de olfateo hacia un olor novedoso, después de lo cual los sujetos fueron devueltos a sus cajas hasta el día siguiente. El día de prueba (Día 2; ver Fig. 11A), después de los tres minutos de línea base y de los tres minutos de exposición al olor familiar, con su respectivo intervalo de un minuto entre

ellos, se dejó a los sujetos 5min más en la caja con la ranura libre, después de lo cual se tomó una nueva la línea base por tres minutos en presencia de un trozo de papel filtro humedecido con agua, seguido por un olor novedoso (olor NOVEDOSO') por tres minutos con el mismo intervalo de un minuto entre la línea base y el otro olor. Esta misma etapa se repitió un día más (Día 3; ver Fig. 11A) con el tercer olor (olor NOVEDOSO''). El último día (Día 4; ver Fig. 11A) se realizó la prueba en la que solo se registra la línea base y el tiempo de exposición al olor familiar por tres minutos cada uno (ver Fig. 11A). El orden en la presentación de los olores no se balancea. Siempre es presentado en primer lugar el olor de orina de hembra en estado de estro, en segundo lugar el olor a menta y en tercer lugar el olor de acetato de amilo.

Empleando el mismo protocolo descrito en el párrafo anterior y con el fin de estudiar el tiempo de retención de la memoria de reconocimiento olfativa, los 16 sujetos fueron subdivididos en 3 grupos, en cada grupo se incrementó el intervalo de tiempo entre la presentación del olor novedoso y la presentación del olor familiar. En el primer grupo (n=4) el tiempo entre la presentación del olor novedoso y el olor familiar fue de 24 h, para el segundo grupo (n=4) el tiempo fue de 48 h y para el tercer grupo (n=8) el tiempo fue de 72 h. En el cuadro que se presenta a continuación (Fig. 11), se muestra el orden y la secuencia de procedimientos que se realizaron en cada uno de los 3 subgrupos (A, B y C) para esta fase experimental.

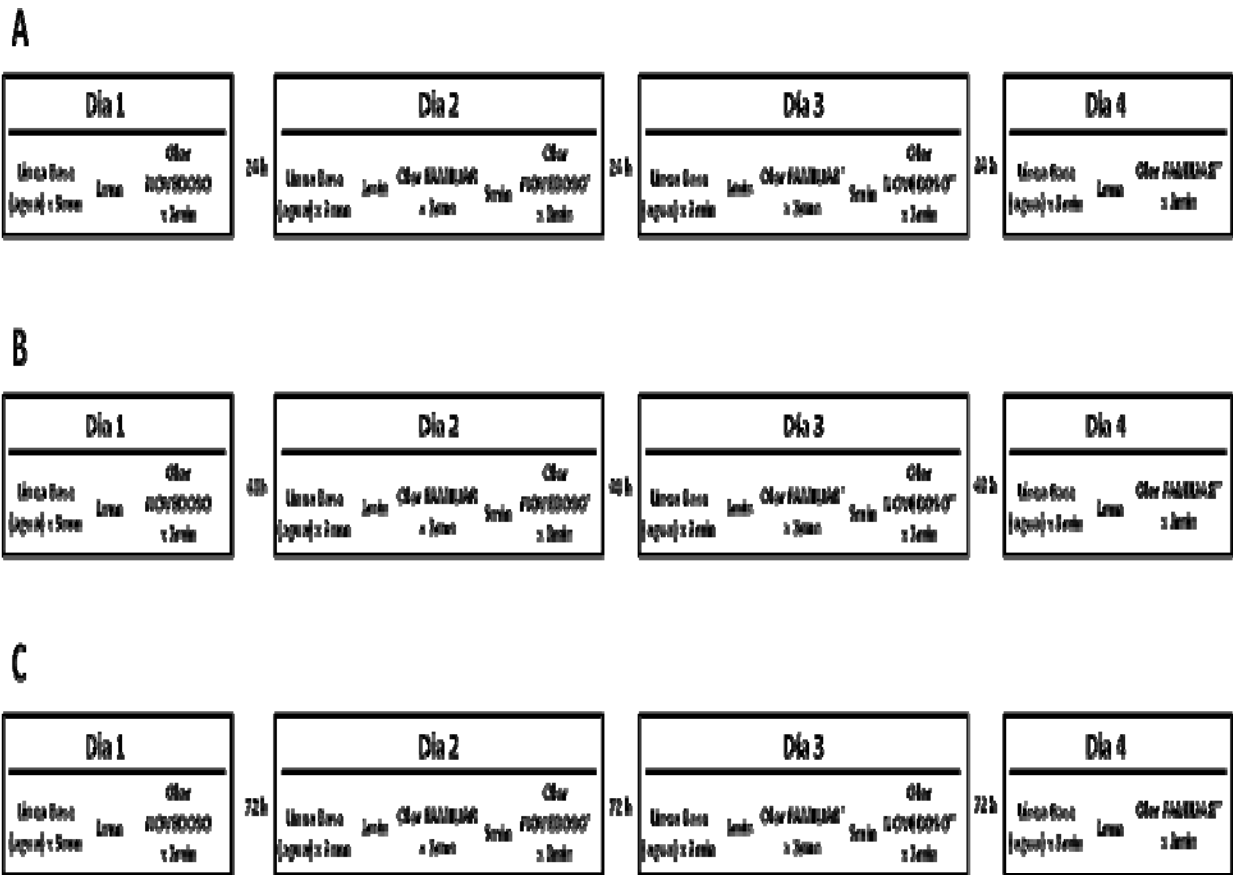


Figura 11. Protocolo de habituación al olor, evaluación de generalización de la respuesta olfativa y curva de retención. Se muestran los tres subgrupos (A, B y C), los cuales difieren en el tiempo de retención, con intervalos de 24 (n=4), 48 (n=4) y 72 (n=8) horas entre la primera presentación y la segunda de un mismo olor (NOVEDOSO y FAMILIAR respectivamente).

7.5. Protocolo de cirugía e infusiones.

7.5.1. Cirugía esterotáxica para implantación de cánulas

Después de una semana en el vivario del laboratorio, un total de 20 sujetos fueron sometidos a cirugía con la ayuda de un aparato estereotáxico para roedores. La anestesia consistió en una mezcla de xilacina (6 mg/kg) y ketamina base (70 mg/kg), inyectada por

vía intraperitoneal. Mediante la técnica de cirugía estereotáxica se hizo el implante bilateral de dos cánulas de acero inoxidable de 12 mm de largo en la corteza insular, teniendo como referencia las siguientes coordenadas a partir de Bregma: anteroposterior +1.2 mm, mediolateral +/- 5.5 mm y dorsoventral -3.0mm, con base en el atlas de Paxinos y Watson (1998).

7.5.2. Infusión.

Una semana después de la cirugía, los sujetos (n=20) fueron entrenados bajo el protocolo de habituación antes descrito. Las infusiones se realizaron 15 minutos antes de empezar la fase de adquisición (ver Fig. 12), se emplearon inyectores cuya longitud fue 2 mm mayor al de las cánulas guía. Los inyectores fueron conectados a una jeringa Hamilton de 10µl a través de un tubo plástico, estas últimas se encontraban ajustadas a una bomba automatizada para jeringas (Sage Instruments), la cual realizó la infusión. Los inyectores fueron colocados dentro de las cánulas, luego de lo cual un volumen del fármaco o el vehículo igual a 0.5µl fue bombeado en un minuto. Los inyectores se mantuvieron un minuto adicional dentro de las cánulas para evitar el reflujo de la infusión. La escopolamina (a una concentración de 60mg/ml; Sigma) fue disuelta en solución salina isotónica para su administración. La dosis y la ubicación donde se realizó la administración fueron elegidas por haber demostrado efectos en otros tipos de memorias de reconocimiento (Gutierrez et al., 2003; Bermúdez-Rattoni et al. 2005; Miranda & Bermudez-Rattoni, 2006). La vida media del fármaco es en promedio de 4.5 h (Putcha, Cintrón, Tsui, Vanderploeg & Kramer, 1989). Las infusiones fueron aplicadas bajo régimen doble ciego y, a diferencia del grupo de generalización y curva de retención, tanto el orden en la presentación de los olores, como el tipo de infusión (salina o escopolamina) que se administro fueron balanceados

entre sujetos. Un grupo adicional de infusiones fantasma “sham” no recibió infusión alguna; en este grupo entraron aquellos sujetos a los que se les desprendió el casco de acrílico antes de poder realizarse las infusiones.



Figura 12. Protocolo de habituación al olor con infusión en la corteza insular. Las puntas de flecha indican que la infusión es dada 15 minutos antes de empezar la fase de adquisición.

Este grupo está compuesto por 20 sujetos.

7.5.3. Sacrificio y Perfusión.

Una vez finalizado el protocolo conductual, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una sobredosis de pentobarbital sódico (115 mg / kg) y fueron perfundidos con una sonda incrustada en el ventrículo cardiaco izquierdo a través de la cual se inyectó solución salina isotónica (a una concentración 9.0 g/l). Una vez removida toda la sangre del organismo se extrajo el cerebro y se conservó en una solución de formalina al 10% durante una semana para fijar el tejido. Posteriormente los cerebros se cambiaron a una solución de sacarosa al 30%, en la que se mantuvieron durante un mínimo de siete días hasta el momento de ser cortados.

7.5.4. Histología.

Se realizaron cortes coronales de 50 μm de grosor en un micrótomo (Leica) a -30°C . Los cortes fueron colocados en portaobjetos gelatinizados para su tinción con violeta de cresilo. Una vez teñidos se examinaron en un microscopio óptico para determinar el lugar en que los inyectores fueron colocados. Sólo aquellos que alcanzaron la corteza insular y no presentaron necrosis tisular fueron tomados en cuenta para el análisis estadístico.

7.6. Análisis de datos.

Para el análisis de datos se registró el tiempo de exploración (olfateo) en la ranura de cada uno de los sujetos en cada condición como factor intra-sujetos (medidas repetidas) y los diferentes tratamientos como medida entre-sujetos (grupos). Para el análisis estadístico se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas entre las diferentes mediciones, ANOVA factorial, pruebas *post hoc* Fisher's PLSD para detectar diferencias entre grupos y se emplearon pruebas "t" cuando se consideró necesario. Además se empleo estadística no-paramétrica en los casos en los que no fue posible aplicar estadística paramétrica. Comparaciones simples se realizaron con la prueba "U de Mann-Whitney" y en cuando se tuvieron que realizar comparaciones con más de dos distribuciones se empleo la prueba "Kruskal-Wallis". Los resultados fueron analizados con el programa Sigma Plot versión 11.0 para Windows (Systat Software, Inc.)

8. Resultados.

Debido a que algunas de las distribuciones no pasaron la prueba de normalidad de la varianza (Shapiro-Wilk) o no pasaron la prueba de equidad de la varianza se opto por emplear estadística no-paramétrica en todos los casos excepto en la curva de evocación del olor de acetato de amilo a largo plazo, generalización en el grupo con 72 hrs de demora y para el estudio de las infusiones en la corteza insular durante la formación de memorias de reconocimiento olfativo.

El primer grupo de 32 sujetos se empleo para replicar datos previamente obtenidos en el laboratorio con el fin de establecer el protocolo antes de las manipulaciones experimentales. Los datos no se reportan.

8.1. Habituaación al olor a largo plazo e intensidad de la habituaación (evocación).

Con el fin de conocer si la memoria de habituaación al olor podía evocarse después de intervalos mayores a 24 horas se comparo el tiempo de exploración al olor (orina de hembra en estro en el primer caso) novedoso contra el tiempo de exploración al olor familiar, además se comparo el tiempo de exploración al agua deshionizada contra el tiempo de exploración al olor novedoso. Se compararon los grupos entre sí para identificar diferencias entre ellos en los tiempos de exploración de línea base, tanto en la fase de adquisición como en la de prueba, así como en el tiempo de exploración al olor novedoso y familiar. Comparaciones simples no arrojan diferencias significativas solo entre la línea base del día 1 y la primera exposición a la orina de hembra en estado de estro para los grupos con demoras de 24 horas ($p>0.05$) y 48 horas ($p>0.05$), solo para el grupo con una demora de 72 horas las diferencias fueron significativas ($p<0.05$). No se demuestran

diferencias significativas entre el olor novedoso y familiar de orina de hembra en estado de estro ($p>0.05$), excepto para el grupo de 72 horas de demora entre el olor novedoso y familiar ($p<0.05$), las comparaciones entre los tres grupos no arrojan diferencias significativas en todos los momentos en que se midió la exploración de los sujetos ($p>0.05$; ver Fig. 13).

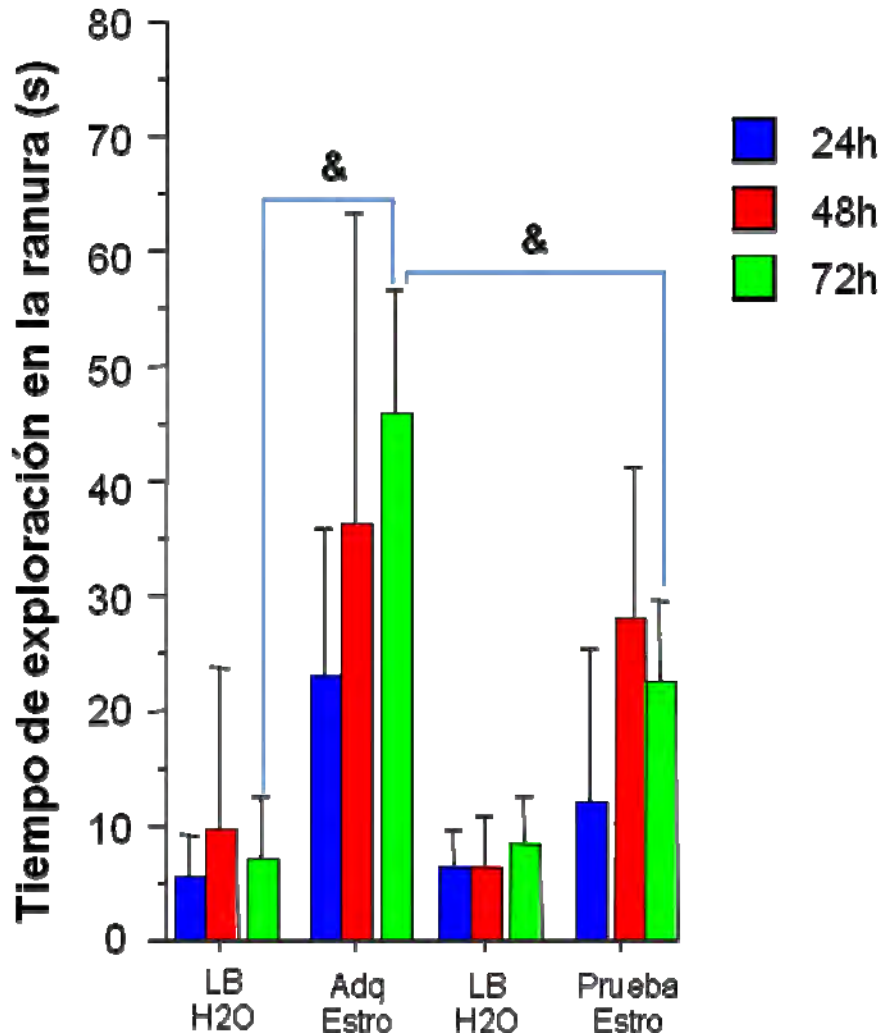


Figura 13. Grafica del tiempo de exploración durante la prueba de retención de la memoria al olor a largo plazo para el olor de orina de estro. Grupos 24h n=4; 48h n=4; 72h n=8. LB= línea base; H2O= agua; Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; Estro= orina de hembra en estado de estro.

&= $p < 0.05$.

Para el olor a menta se hicieron las mismas comparaciones (Fig. 14), las comparaciones entre los tres grupos no reportan diferencias significativas entre los tres grupos ($p > 0.05$) en ningún momento. Se encuentran diferencias significativas entre la primera y la segunda

exposición a este olor solo para el grupo con demora de 72 horas ($p < 0.05$; ver Fig. 14), no siendo significativa en los casos de los otros dos grupos ($p > 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de exploración al agua dezhionizada y la menta novedosa para ninguno de los tres grupos.

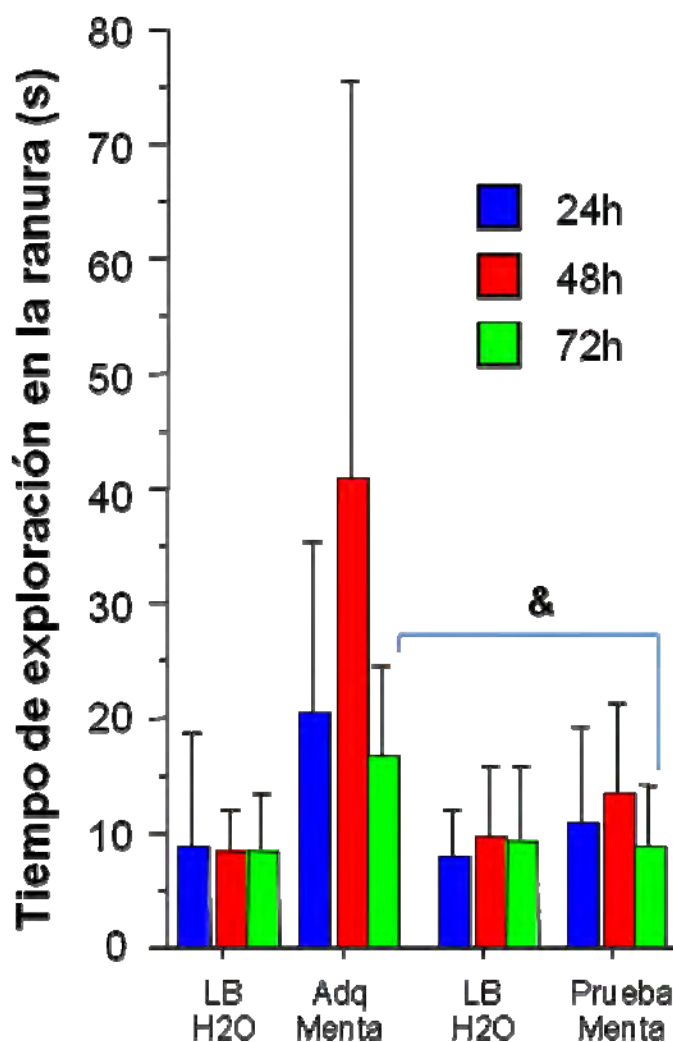


Figura 14. Gráfica del tiempo de exploración durante la prueba de retención de la memoria al olor a menta a largo plazo. Grupos 24h n=4; 48h n=4; 72h n=8. LB= línea base; H2O= agua; Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; Menta= olor a menta. &= $p < 0.05$

En el caso del olor de acetato de amilo el ANOVA de medidas repetidas no reporta diferencias significativas entre los tres grupos [$F; (2,13) = 0.595, p > 0.05$] ni para la interacción ente las medidas repetidas y el grupo [$F; (2,6) = 1.325, p > 0.05$]. Sin embargo arroja diferencias entre las medidas repetidas [$F; (2,3) = 7.795, p < 0.05$]. Un ANOVA factorial revela diferencias significativas sólo entre la prueba entre el grupo con demora de 24 horas (24h) y con el grupo de 72 horas (72h; $F; (2,13) = 5.243, p < 0.05$); *post hoc* Fisher's PLSD 24h , 72h $p < 0.05$; ver Fig. 15).

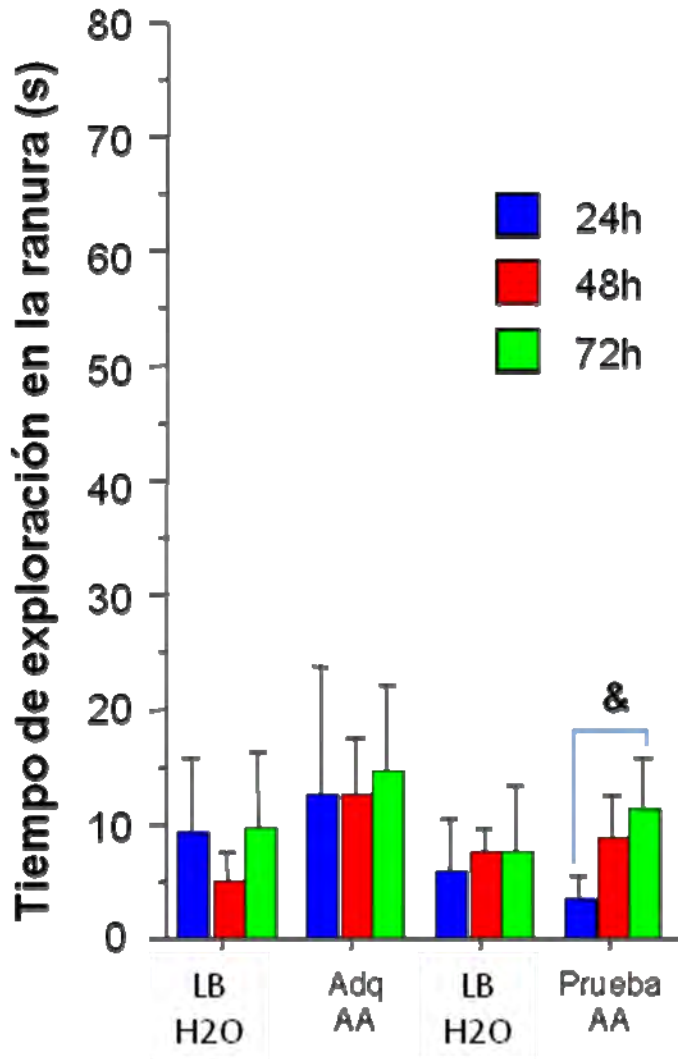


Figura 15. Gráfica del tiempo de exploración durante la prueba de retención de la memoria al olor a largo plazo para el olor de acetato de amilo. Grupos 24h n=4; 48h n=4; 72h n=8. LB= línea base; H2O= agua; Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; AA= olor de acetato de amilo; &= $p < 0.05$.

8.2. Generalización.

Con el fin de conocer si la respuesta de habituación observada el día de la prueba hacia el olor familiar no podía ser evocada por un olor novedoso se comparo el tiempo de exploración hacia el olor familiar' y el novedoso'' los cuales son diferentes olores presentados el mismo día (ver día 2 Fig. 11), además de comparar el olor novedoso' con el olor familiar', el cual es el mismo olor pero presentado en dos días diferentes (ver día 1 y 2 Fig. 11). Para el grupo con 24 horas de demora entre el olor novedoso y familiar no se encontró ninguna diferencia significativa al comparar los tiempos de exploración en las dos exposiciones para ninguno de los tres olores ($p > 0.05$), ni cuando se compararon el olor familiar con el novedoso cuando estos eran distintos ($p > 0.05$; ver Fig. 16). Lo mismo se repite para el grupo con 48 horas de demora (olor novedoso' vs familiar' $p > 0.05$; olor familiar' vs novedoso'' $p > 0.05$; ver Fig. 17). Las únicas diferencias significativas que se encontraron con pruebas t entre los olores novedoso y familiar de orina de hembra en estro ($p < 0.05$) y a menta ($p < 0.05$), así como la comparación entre orina de hembra en estro y el olor a menta familiar ($p < 0.05$; ver Fig. 18) en el grupo con demora de 72 horas ($n = 16$ total; subgrupos 24h = 4; 48h = 4; 72h = 8).

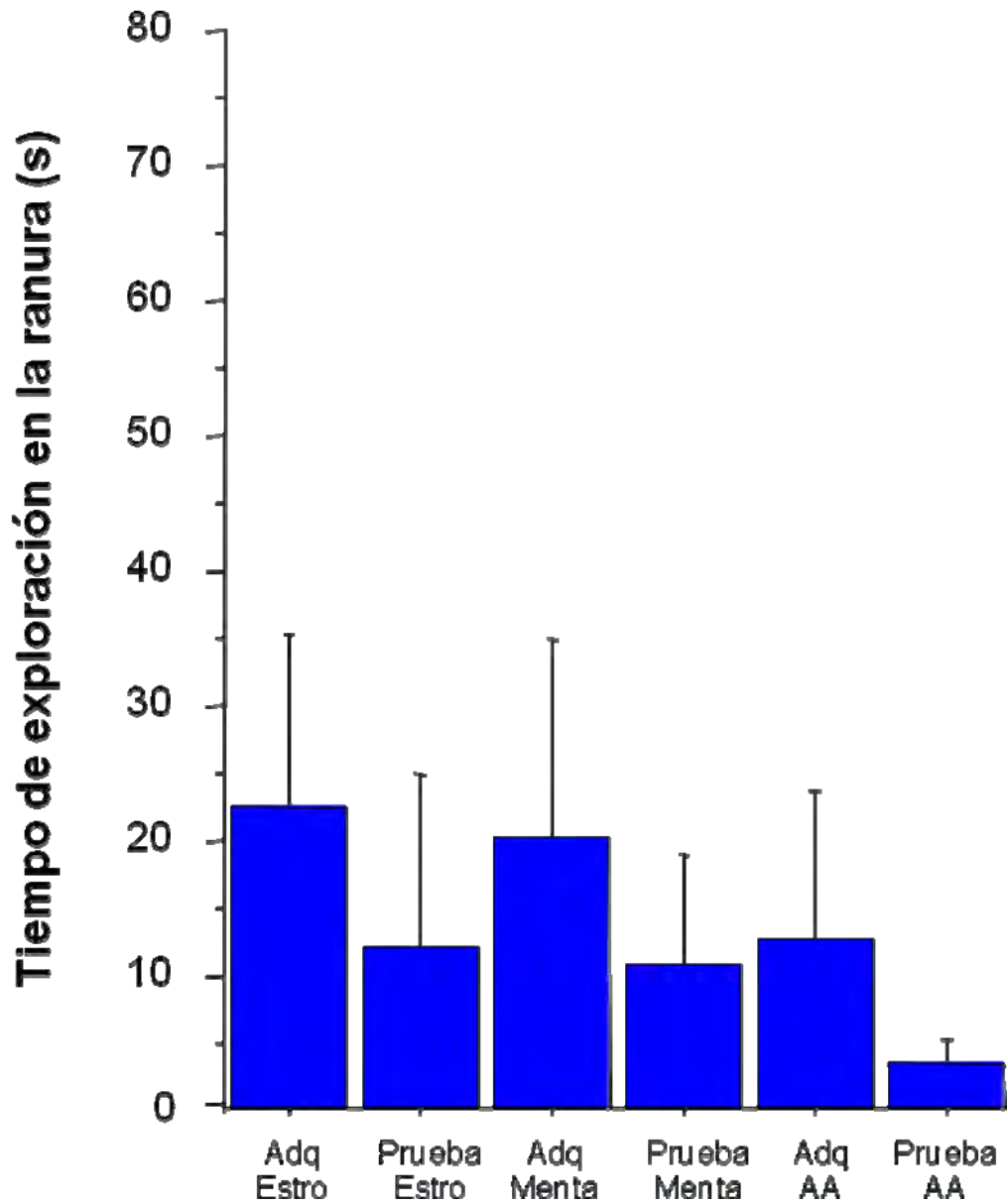


Figura 16. Gráfica que muestra la generalización entre un olor familiar y uno novedoso para los tres olores empleados, solo en el grupo con una demora de 24 horas entre la primera y la segunda exposición al mismo olor. Grupo 24h n=4. Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; Estro= orina de hembra en estado de estro; Menta= olor a menta; AA= olor de acetato de amilo.

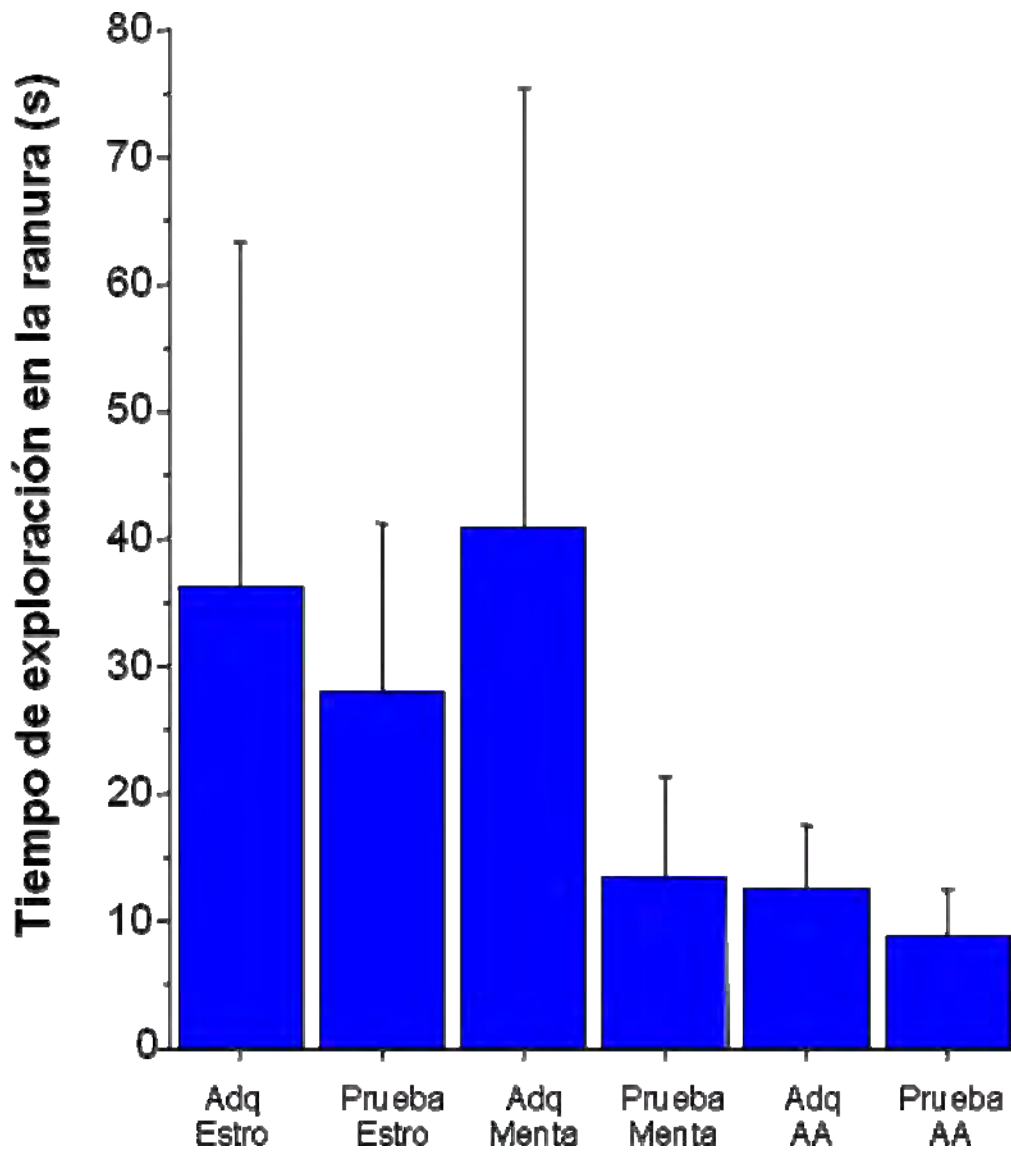


Figura 17. Gráfica que muestra la generalización entre un olor familiar y uno novedoso para los tres olores empleados, solo en el grupo con una demora de 48 horas entre la primera y la segunda exposición al mismo olor. Grupo 48h n=4. Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; Estro= orina de hembra en estado de estro; Menta= olor a menta; AA= olor de acetato de amilo.

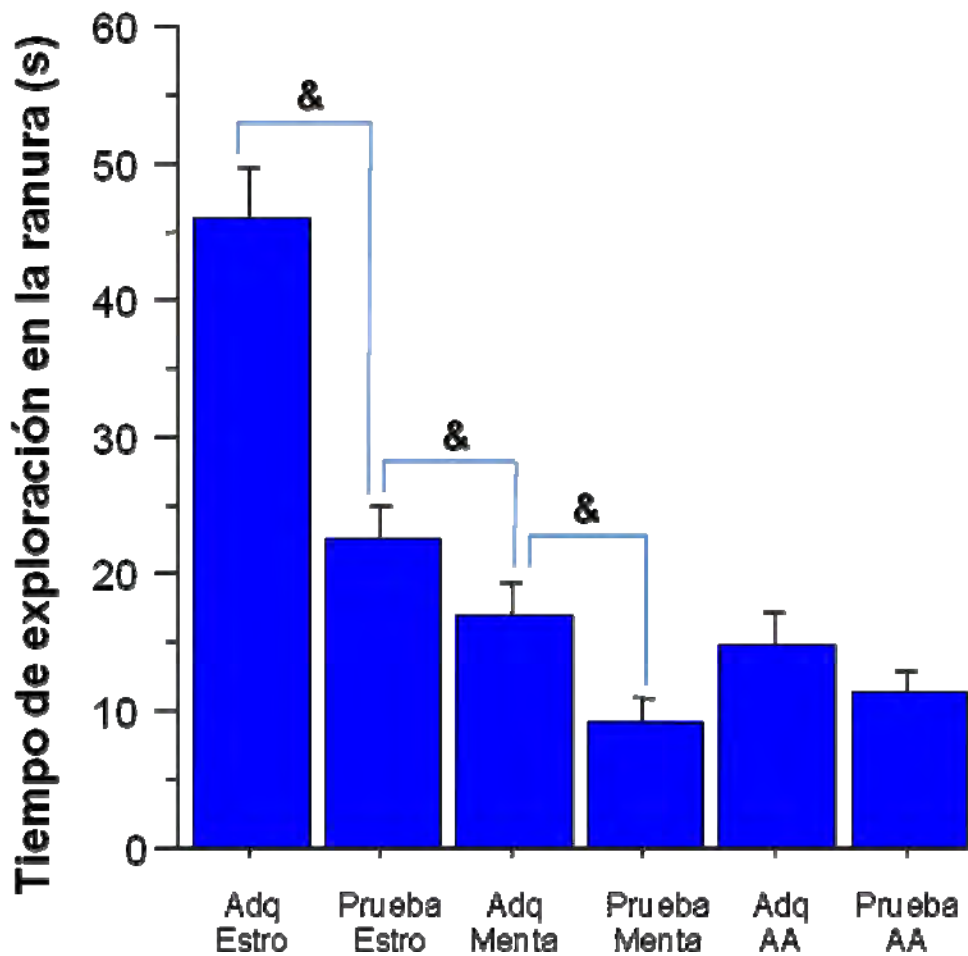


Figura 18. Gráfica que muestra la generalización entre un olor familiar y uno novedoso para los tres olores empleados, solo en el grupo con una demora 72 horas entre la primera y la segunda exposición al mismo olor. Grupo 72h n=8. Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; Estro= orina de hembra en estado de estro; Menta= olor a menta; AA= olor de acetato de amilo; & = $p < 0.05$.

8.3. Efectos de las infusiones de escopolamina en la corteza insular durante la formación de la memoria al olor.

Para lograr el último objetivo, veinte del total de los sesenta y nueve sujetos fueron sometidos al mismo protocolo de habituación al olor descrito en el apartado 7.5 (ver Fig. 12). Los resultados se muestran en la figura 19. El análisis estadístico de medidas repetidas (ANOVA) revela que no hay diferencias por grupo [$F; (2,17) = 2.975, p > 0.05$] ni existe interacción entre grupo (infusión salina, escopolamina y sham) y medidas repetidas (olor novedoso y familiar; [$F; (2,6) = 0.595, p > 0.05$]), sin embargo revela diferencias significativas entre las mediciones [$F; (2,3) = 18.089, p < 0.05$] para el olor de acetato de amilo. Pruebas “t” rebelan diferencias significativas en el tiempo de olfateo entre la línea base y el olor de acetato de amilo en la fase de adquisición ($p < 0.05$) para los tres grupos, pero solo para el grupo que recibió infusiones de solución salina las diferencias entre las dos exposiciones a este mismo olor fueron significativas ($p < 0.05$; ver Fig. 19).

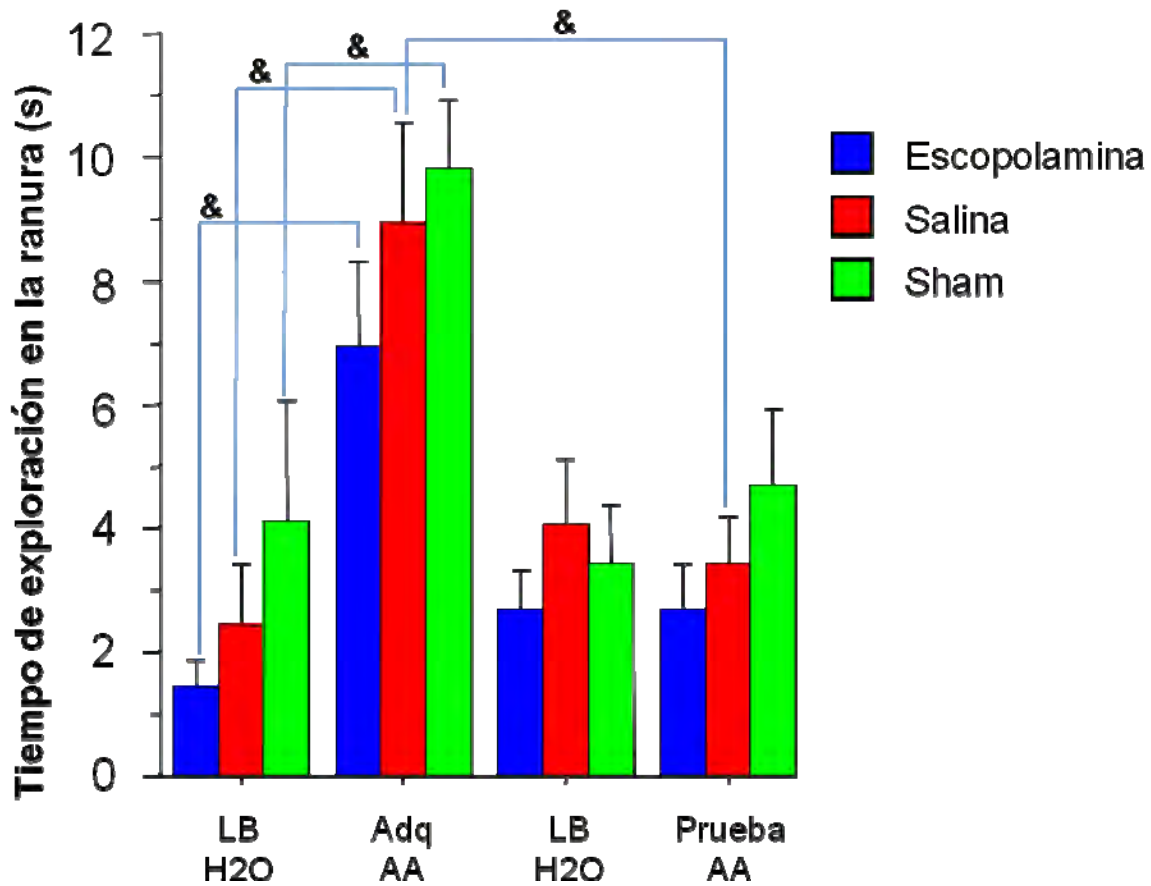


Figura 19. Grafica del tiempo de exploración durante la prueba de habituación de olor a largo plazo para el olor de acetato de amilo. Grupos Escopolamina n=7; Salina n=8; Sham n=5. LB= línea base; Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; AA= olor de acetato de amilo. &= p<0.05

En el caso del olor a menta el ANOVA de medidas repetidas revela diferencias significativas entre grupos [F; (2,17) = 6.869, p<0.05] y entre las medidas repetidas [F; (2,3) = 4.140, p<0.05] sin diferencias significativas por interacción por grupo y medidas repetidas [F; (2,6) = 1.002, p>0.05]. La prueba *post hoc* Fisher's PLSD revela diferencias

entre el grupo con infusión de solución salina y el grupo sham ($p < 0.05$) y entre los grupos con infusiones de solución salina y escopolamina ($p < 0.05$), no siendo significativa la diferencia entre el grupo con infusión de escopolamina y el grupo sham, el cual no recibió ninguna infusión ($p > 0.05$). Como puede apreciarse en la figura 19 el grupo con infusión de solución salina tiene una respuesta de exploración menor a la que tienen los otros dos grupos tanto en las líneas bases como en los momentos en los que son expuestos al olor a menta, tanto novedosa como familiar. Pruebas “t” rebelan diferencias significativas en el tiempo de olfateo entre la línea base y el olor a menta en la fase de adquisición ($p < 0.05$) para los tres grupos, pero solo para el grupo sham las diferencias entre las dos exposiciones a este mismo olor fueron significativas ($p < 0.05$; ver Fig. 20).

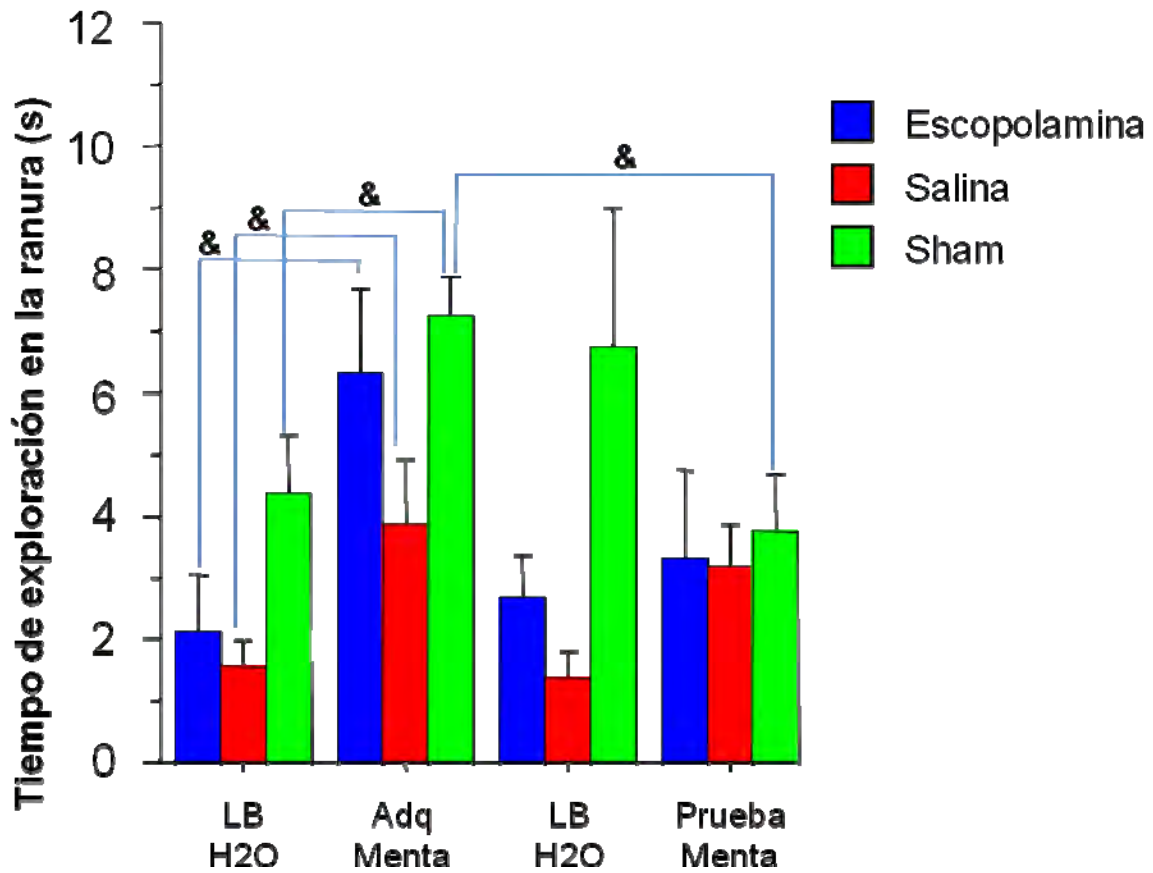


Figura 20. Grafica del tiempo de exploración durante la prueba de habituación de olor a largo plazo para el olor a menta. Grupos Escopolamina n=6; Salina n=6; Sham n=8. LB= línea base; Adq= adquisición o primera exposición a un olor; Prueba= prueba de evocación o segunda exposición a un olor; Menta= olor a menta. &= p<0.05

9. Discusión.

9.1. Habituaación al olor a largo plazo e intensidad de la habituaación (evocación).

En el experimento de habituaación al olor a largo plazo e intensidad de la habituaación (evocación) se evaluó el tiempo de retención de la memoria de habituaación a un olor a largo plazo en tres grupos. Los resultados sugieren una tendencia en los tres grupos para los tres olores (Fig. 13, 14 y 15) hacia la reducción del tiempo de exploración cuando el olor es familiar en comparación con el tiempo de exploración cuando este olor resulta novedoso, siendo esta significativa solo para el grupo con demora de 72 horas para los olores de orina de hembra en estro y el olor a menta (Fig. 13 y 14). Cabe destacar que este grupo es el que posee mayor número de sujetos de los tres (8 vs 4), sugiriendo que la falta de diferencias significativas en los otros grupos en el tiempo de exploración entre la primera y segunda presentación de estos olores (orina de hembra en estro y menta) podría deberse a lo reducido de la muestra. En el caso del olor de acetato de amilo se encuentra una diferencia significativa entre el tiempo de exploración del olor familiar entre los grupos con demora de 24 y 72 horas entre las dos presentaciones de este olor, sin ser significativa la diferencia entre el grupo con 48 horas de demora y estos dos grupos, encontrándose en un punto intermedio entre ambos, lo que asemeja a una curva dosis respuesta en la que se incrementa el tiempo de exploración al olor familiar conforme el tiempo de la demora entre la presentación del olor novedoso y familiar aumenta. La retención se entiende como el periodo entre la adquisición y la evocación de una memoria. La evocación depende de las rutas de recuperación formadas en la fase de adquisición, estas rutas se entienden como la combinación de elementos que forman un registro de memoria o recuerdo, estos elementos se emplean como claves para evocar este recuerdo. Cuando el organismo atiende a estas

claves asociadas a un registro de memoria, ya sea porque se encuentran en el ambiente en ese momento o en los sistemas de ensayo (memoria de trabajo, atención), activan sus registros asociados en la memoria permanente (Anderson, 2001c). La frecuencia con la que estos registros de memoria son activados determina la probabilidad de evocación de la memoria a la que subyacen, siendo mayor la probabilidad de evocación cuando la frecuencia de activación de estos registros es mayor. Un intervalo de más tiempo entre la activación de la ruta de recuperación de una determinada memoria de reconocimiento implica una frecuencia menor de activación de esta ruta de recuperación, reduciendo la probabilidad de evocación de una determinada memoria proporcionalmente a la magnitud del intervalo de retención.

9.2. Generalización.

La deshabitación en este trabajo se define como el incremento en el tiempo de exploración olfativa por parte del sujeto experimental debido a la presencia del un nuevo olor (Hunter & Murray, 1989). Existen diferencias significativas entre el olor a estro y a menta, pero el olor a menta novedoso produce una respuesta de exploración menor que la orina en estro familiar. Estas diferencias son estadísticamente significativas, al igual que el hecho de que el tiempo de exploración al olor a menta novedoso sea mayor que el olor a menta familiar, al menos en el grupo con demora de 72 horas (Fig. 18), este hecho sugiere que los sujetos no están generalizando su respuesta ya que es apreciable una disminución significativa en la segunda exposición al olor a menta y el hecho de que el tiempo de exploración al olor a menta novedoso sea menor que el tiempo de exploración al olor de orina de hembra en estro coincide con estudios previos (De Gasperín-Estrada, et al., 2008; Miranda, et al., 2009) que indican que el olor de orina de hembra en estado estro es un estímulo relevante y

preferido por las ratas macho sin experiencia sexual. El fenómeno en el cual el olor novedoso produce un incremento en la respuesta de exploración en comparación con la respuesta causada por el olor familiar puede observarse ante el olor a menta y el olor de acetato de amilo, aunque no de forma significativa (Fig. 18). Estos experimentos deberán replicarse aumentando la muestra y exponiendo a los individuos a estos olores de forma contrabalanceada.

9.3. Bloqueo de los receptores muscarínicos de la corteza insular durante la formación de las memorias de reconocimiento olfativas.

Los resultados de los experimentos donde se bloquea a los receptores muscarínicos en la corteza insular durante la presentación del olor de acetato de amilo o menta, demuestran que la escopolamina no impide la capacidad olfativa de los animales ya que se observa un incremento, al igual que en los grupos control, en el tiempo de olfateo en comparación con la línea base, cuando se presenta por primera vez estos olores, (Fig. 19 y 20; acetato de amilo y menta novedosos). Y replica resultados previos de otros grupos (Hunter & Murray, 1989; Miranda et al., 2009). La comparación en los tiempos de exploración al olor novedoso y del olor familiar de acetato de amilo revela una disminución significativa en el segundo caso, siendo significativa solo en el subgrupo que fue infundido con salina, el cual es el subgrupo con la mayor cantidad de sujetos de los tres (ver Fig. 19), lo cual sugiere que al incrementarse el tamaño de la muestra en todos los grupos podrían replicarse las diferencias significativas reportadas previamente en otros trabajos del laboratorio. Esta posibilidad es apoyada por la evidencia encontrada en el experimento en el que se utilizó olor a menta, con la diferencia de que el único grupo que demostró una reducción significativa en el tiempo de olfateo al olor a menta familiar en comparación con el tiempo

de exploración al olor a menta novedoso fue el subgrupo sham, el cual se compone de la muestra de sujetos más amplia en este caso (ver Fig. 20).

La actividad de la corteza insular está fuertemente implicada en los primeros momentos de la percepción de olores (Shipley et al., 1995; Buck, 2001; Sánchez-Andrade, et al. 2005), pero existe la posibilidad de que la actividad mostrada por la corteza insular se deba a la participación de otros neurotransmisores como el glutamato. Se han demostrado deficiencias en una tarea de discriminación de olores debidas a la administración crónica intracerebroventricular del antagonista competitivo de los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido D-amino-fosfono-valérico (AP5). Esta manipulación farmacológica sólo afecta a la adquisición de nuevos olores, dejando intactas la memorias de reconocimiento olfativas previamente adquiridas (Staubli, Thibault, DiLorenzo & Lynch, 1989).

Con respecto a estructuras que podrían estar implicadas en la memoria de olor, se ha reportado que las lesiones o la inactivación por TTX en la BLA impiden el aprendizaje de aversión al olor potenciada por sabor (TPOA) pero no impide la aversión al sabor solo en este paradigma (Bermúdez-Rattoni, Rusiniak & Garcia, 1983; Hatfield, Graham & Gallagher, 1992), además se ha reportado que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propanolol de la BLA impide el aprendizaje del condicionamiento aversivo al olor (CAO; Miranda, Ferry, & Ferreira, 2007). Las neuronas colinoceptivas conforman el 80% de las neuronas corticales que contienen altas concentraciones de la proteína MAP-2, cuya fosforilización está implicada en la plasticidad cerebral, estas neuronas colinoceptivas reciben entradas de casi todos los neurotransmisores y 20% de estas neuronas, no son colinérgicas (Wolf, 1998). La participación de los receptores noradrenérgicos en la BLA no niega la participación de los receptores muscarínicos, y el fenómeno reportado por Miranda

y colaboradores (2009), donde la administración sistémica de escopolamina antes de la primera presentación de un olor impide su reconocimiento 24 horas después podría deberse al bloqueo de los receptores muscarínicos en la BLA, siendo un buen sitio donde seguir experimentando.

10. Conclusión.

El protocolo de habituación al olor a largo plazo es replicable, fácil y rápido de realizar, siendo un modelo útil para el estudio de la memoria a largo plazo, pero requiere de muestras mayores a 10 sujetos. Con algunas modificaciones este protocolo podría servir para el estudio de la generalización en memorias de reconocimiento olfativas debida a manipulaciones farmacológicas. El tiempo de retención de estas memorias se sugiere es de al menos 72 horas y queda aún por definir el tiempo máximo de retención para otros olores.

La participación colinérgica de la corteza insular en la tarea simple de habituación al olor a largo plazo no parece ser necesaria en la fase de adquisición de la memoria de un olor novedoso. Queda aún por determinar si la acción de la escopolamina en la CI durante la fase de adquisición de las memorias de olores con relevancia social (p.e. orina de estro) como ha sido reportado previamente a nivel sistémico (Miranda et al., 2009).

11. Referencias.

- Acquas, E., Wilson, C. & Fibiger, H. C. (1996). Conditioned and Unconditioned Stimuli Increase Frontal Cortical and Hippocampal Acetylcholine Release: Effects of Novelty, Habituation, and Fear. *The Journal of Neuroscience*, 16, 9, 3089-3096
- Allen, G.V., Saper, C.B., Hurley, K.M. & Cechetto, D.F. (1991). Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 311, 1, 1-16.
- Anderson, J. R. (2001a). La teoría de Rescorla y Wagner. En J. R. Anderson: *Aprendizaje y Memoria*. McGraw-Hill Interamericana, Mexico pp. 70-83.
- Anderson, J. R. (2001b). ¿Que es un estímulo condicionado?. En J. R. Anderson: *Aprendizaje y Memoria*. McGraw-Hill Interamericana, México pp.90-100.
- Anderson, J. R. (2001c). Retención de recuerdos. En J. R. Anderson: *Aprendizaje y Memoria*. McGraw-Hill Interamericana, Mexico pp. 284-326.
- Arendash, G. W., Milard, W. J., Dunn, A. J. & Meyer, E. M. (1987). Long-term neuropathological and neurochemical effects of nucleus basalis lesions in the rat. *Science*, 238, 4829, 952-956.
- Bartus, R. T., Dean 3rd, R. L., Beer, B. & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 4558, 408-414.
- Bermúdez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozental, B., McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning and Memory*, 12, 5, 447-449.
- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B., McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde amnesia for inhibitory

avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of the America*, 88, 12, 5379-5382.

Bernstein, I.L. (1991). Flavor aversion. En T. V. Getchell, L. M. Bartoshuk, R. L. Doty & J. B. Snow: *In Smell and taste in health and disease*. Raven Press, New York pp. 414-428.

Brennan, P. A., Keverne, E. B. (1997). Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology*, 51, 457-481.

Buck, L. B. (2001). Olor y gusto: El sentido químico. En E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell: *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana, México pp. 625-647.

Buck, L., Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175-187.

Carew, T. J., Sutton, M. A. (2001). Molecular stepping stones in memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 4, 769-771.

Carlson, N. R. (2000). Audición, sentidos somáticos y sentidos químicos. En N. R. Carlson: *Fisiología de la conducta*. Ariel, Barcelona, pp. 215-261.

Contreras, M., Ceric, F. & Torrealba, F.. (2007). Inactivation of the interoceptive insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium. *Science*, 318, 655-658.

Dade, L. A., Zatorre, R. J. & Jones-Gotman, M. (2002). Olfactory learning: convergent findings from lesion and brain imaging studies in humans. *Brain*, 125, 86-101

Dardou, D., Datiche, F. & Cattarelli, M. (2006). Fos and Egr1 expression in the rat brain in response to olfactory cue after taste-potentiated odor aversion retrieval. *Learning and Memory*, 13, 150-160.

De Gasperín-Estrada, G. P., Camacho, F. J. & Paredes, R. G. (2000). Olfactory discrimination and incentive value of non copulating and sexually sluggish male rats. *Physiology and Behavior*, 93, 742-747.

- De Olmos, J., Hardy, H. & Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *Journal of Comparative Neurology*, *181*, 2, 213-244.
- Doty, R. L., Reyes, P. F. & Gregor, T. (1987). Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain Research*, *18*, 597-600.
- Doty, R. L., Bagla, R. & Kim, N. (1999). Physostigmine enhances performance on an odor mixture discrimination test. *Physiology and Behavior*, *65*, 4;5, 801-804.
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Chaput, M. A. (2000). Peripheral Odor Coding in the Rat and Frog: Quality and Intensity Specification. *Journal of Neuroscience*, *20*, 6, 2383-2390.
- Engelmann, M., Wotjak, C. T. & Landgraf, R. (1995). Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rat. *Physiology and Behavior*, *58*, 315-321.
- Fernández-Ruiz, J., Miranda, M. I., Bermúdez-Rattoni, F. & Drucker-Colín, R. (1993). Effects of Catecholaminergic Depletion of the Amygdala and Insular Cortex on the Potentiation of Odor by Taste Aversions. *Behavioural and Neural Biology*, *60*, 189-191.
- Ferreira, G., Gervais, R., Durkin, T. P. & Lévy, F. (1999). Postacquisition Scopolamine Treatments Reveal the Time Course for the Formation of Lamb Odor Recognition Memory in Parturient Ewes. *Behavioural Neuroscience*, *113*, 1, 136-142.
- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C. J., DeLaCruz, V., Nunez-Jaramillo, L., Bermudez-Rattoni, F. (2003). Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, *80*, 3, 323-331.

- Hatfield, T., Graham, P. W. & Gallagher, M. (1992). Taste potentiated odor aversion learning: Role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus, *Behavioral Neuroscience*, *106*, 289-293.
- Helper, D. J., Wenk, G. I., Cribbs, B. L., Olton, D. S. & Coyle, J. T. (1985). Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Research*, *346*, 8-14.
- Hunter, A. J. & Murray, T. K. (1989). Cholinergic mechanisms in a simple test of olfactory learning in the rat. *Psychopharmacology*, *99*, 270-275.
- Inglis, F. M. & Fibiger, H. D. (1995). Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience*, *66*, 81-86.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H. & Touhara, K. (2001). Molecular Bases of Odor Discrimination: Reconstitution of Olfactory Receptors that Recognize Overlapping Sets of Odorants. *Journal of Neuroscience*, *21*, *16*, 6018-6025.
- Katzman, R. (1986). Alzheimer's disease. *New England Journal of medicine*, *314*, *15*, 964-970.
- Kendrick, K. M., Levy, F. & Keverne, E. B. (1992). Changes in the sensory processing of olfactory signals induced by birth in sheep. *Science*, *256*, 833-836.
- Kippin, T. E., Cain, S. W. & Pfau, J. G. (2003). Estrous odors and sexually conditioned neutral odors activate separate neural pathways in the male rat. *Neuroscience*, *117*, 971-979.
- Lasiter, P.S., Deems, D.A. & Garcia, J. (1985). Involvement of the anterior insular gustatory neocortex in the taste-potentiated odor aversion learning. *Physiology and Behavior*, *34*, 71-77.

Linster, C. & Hasselmo, M. E. (2000). Neural activity in the horizontal limb of the diagonal band of Broca can be modulated by electrical stimulation of the olfactory bulb and cortex in rats. *Neuroscience Letters*, 282, 157-160.

Lowenstein, O. E. (1969). El sentido químico. En E. O. Lowenstein: *Los sentidos*. Fondo de Cultura Económica, Mexico pp. 174-195.

Macrides, F., Davis, B. J., Young, W. M., Nadi, S. & Margolis, F. L. (1981). Cholinergic and catecholaminergic afferents to the olfactory bulb in the hamster: a neuroanatomical, biochemical, and histochemical investigation. *Journal of Comparative Neurology*, 203, 3, 495-514.

McLean, J.H., Shipley, M. T., Nickell, W. T., Aston-Jones, G. & Reyher, C. K. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 285, 339-349.

Mednikova, Y. S. (1990). The influence of microiontophoretic application of acetylcholine on the formation of conditioned reactions of neurons of the motor cortex. *Neuroscience of Behavioral Physiology*, 20, 310-316.

Meisami, E. & Safari, L. (1981). A quantitative study of the effects of early unilateral olfactory deprivation of the number and distribution of mitral and tufted cells and of the glomeruli in the rat olfactory system. *Brain Research*, 221, 81-107.

Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H. & Levey, A. I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, 10, 1185-1201.

Miranda, M. I. (2000). *Modulación colinérgica de las etapas tempranas del aprendizaje aversivo a los sabores: señalización del estímulo novedoso*. Tesis de doctorado, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico, D.F.

- Miranda, M. I., Ortiz-Godina, F. & Garcia-Velasquez, D. (2009). Differential involvement of cholinergic and beta-adrenergic systems during acquisition, consolidation and retrieval of long term memory of odors with different emotional content. *Behavioural and Brain Research*, 202, 2009, 19-25.
- Miranda, M. I. & Bermúdez-Rattoni, F. (2006). Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 2007, 343-351.
- Miranda, M. I., Ramirez-Lugo, L. & Bermudez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus, *Brain Research*, 882, 230-235.
- Miranda, M. I., Ferry, B. & Ferreira, G. (2007). Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88, 260-263.
- Nagi, J., Chess, A., Doeling, M. M., Necles, N., Macagno, E. R. & Axel, R. (1993). Coding of olfactory information: Topography of odorant receptor expression in the catfish epithelium. *Cell*, 72, 667-680.
- Naor, C. & Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 79, 61-67.
- Nickell, W. T. & Shipley, M. T. (1988). Two anatomically specific classes of candidate cholinceptive neurons in the rat olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 8, 4482-4491.
- Norgren, R. (1995). Gustatory system. En G. Paxinos: *The rat nervous system*. Academic Press Inc. San Diego, California pp. 751-772.

- Orsetti, M., Casamenti, F. & Pepeu, G., (1996). Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Research*, 724, 89-96.
- Palmerino, C. C., Rusiniak, K. W. & Garcia, J. (1980) Flavor-illness aversions: The peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science*, 208, 753-755.
- Paolini, A. G. & McKenzie, J. S. (1993). Effects of lesions in the horizontal diagonal band nucleus on olfactory habituation in the rat. *Neuroscience*, 57, 3, 717-724.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). En G. Paxinos & C. Watson: *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd edition). Academic Press, San Diego, California.
- Perry, E. K., Tomilson, B. E. & Blessed, G. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in dementia. *British Medical Journal*, 2, 6150, 1457-1459.
- Putchá, L., Cintrón, N. M., Tsui, J., Vanderploeg, J. M. & Kramer, W. G. (1989). Pharmacokinetics and oral bioavailability of scopolamine in normal subjects. *Pharmaceutical Research*, 6, 6, 481-485.
- Ravel, N., Vigouroux, M., Elaagouby, A. & Gervais, R. (1992). Scopolamine impairs delayed matching in an olfactory task in rats. *Psychopharmacology*, 109, 4, 439-443.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L. & Buck, L. B. (1994). A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 588-596.
- Roman, F. S., Simonetto, I. & Soumireu-Mourat, B. (1993). Learning and memory of odor-reward association: Selective impairment following horizontal diagonal band lesions, *Behavioural Neuroscience*, 107, 72-81.
- Rye, D. B., Wainer, B. H., Mesulam, M. M., Mufson, E. J. & Saper, C. B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and non-cholinergic

components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 13,627-643.

Sánchez-Andrade, G., James, B. M. & Kendrick, K. M. (2005). Neural encoding of olfactory recognition memory. *Journal of Reproduction and Development*, 51, 5, 547-558.

Saper, C. B. (1995). Central autonomic system. En G. Paxinos: *The rat nervous system*. Academic Press Inc. San Diego, California pp. 107-136.

Saper, C. B. (2001). Modulación del tallo cerebral de la sensación, el movimiento y la conciencia. En E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell: *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana, México pp. 889-909.

Sarter, M. & Bruno, J. P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Research Review*, 23, 28-46.

Saucier, D. & Astic, L. (1986). Analysis of the topographical organization of olfactory epithelium projections in the rat. *Brain Research Bulletin*, 16, 4, 455-462.

Scoenfeld, T. A., Clancy, A. N., Forbes, W. B. & Macrides, F. (1991). The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. 1. Receptor neuron projections to the main olfactory bulb. *Brain Research Bulletin*, 34, 3, 183-210.

Shipley, M. T., McLean, J.H. & Ennis, M. (1995). Olfactory system. En G. Paxinos: *The rat nervous system*. Academic Press Inc. San Diego, California pp. 899-926.

Shipley, M. T., Nickell, W. T. & McLean, J.H. (1986). Organization of afferents from the nucleus of the diagonal band to the olfactory bulb. *Chemical Senses*, 11, 663-663.

Staubli, U., Thibault, O., DiLorenzo, M. & Lynch, G. (1989). Antagonism of NMDA Receptors Impairs Acquisition but Not Retention of Olfactory Memory. *Behavioural Neuroscience*, 103, 1, 54-60.

- Sullivan, S. L., Adamson, M. C., Ressler, K. J., Kozak, C. A. & Buck, L. B. (1996). The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of the America*, 93, 884-888.
- Tohyama, M. & Takatsuji, K. (1998a). The cholinergic system. En M. Tohyama & K. Takatsuji: *Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat*. Oxford University, Oxford pp. 66-69.
- Tohyama, M. & Takatsuji, K. (1998b). Acetylcholine receptors. En M. Tohyama & K. Takatsuji: *Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat*. Oxford University, Oxford pp.70-95.
- Tronel, S. & Sara, S. (2002). Mapping of Olfactory Memory Circuits: Region-Specific c-fos Activation After Odor-Reward Associative Learning or After Its Retrieval. *Learning and Memory*, 9, 105-111.
- Vassar, R., Ngai, J. & Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74, 309-318.
- Wenk, G. L. (1997). The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67, 85-95.
- Wilson, D. A. (2001). Scopolamine enhances generalization between odor representations in rat olfactory cortex. *Learning and Memory*, 8, 279-285.
- Wilson, D. A. (2000a). Odor Specificity of Habituation in the Rat Anterior Piriform Cortex. *Journal of Neurophysiology*, 83, 139-145.
- Wilson, D. A. (1998a). Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, 79, 1425-1440.
- Wilson, D. A. (2000b). A comparison of odor receptive field plasticity in the rat olfactory bulb and anterior piriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, 84, 3036-3042.

Woolf, H. J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology*, 37, 475-524.

Woolf, N. J. (1993). Cholinoceptive cells in rat cerebral cortex: somatodendritic immunoreactivity for muscarinic receptor and cytoskeletal proteins. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6, 375-390.

Woolf, N. J. (1998). A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology*, 55, 59-77.

Yamamoto, T. (1993). Neuronal mechanisms of taste aversion learning. *Neuroscience Research*, 16, 3, 181-185.