



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

MONITOREO DE LA LIBERACIÓN
GLUTAMATÉRGICA Y NORADRENÉRGICA
EN LA AMÍGDALA DE RATA DURANTE LA
ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN
DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL
SABOR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A

OSORIO GÓMEZ DANIEL

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. KIOKO RUBÍ GUZMÁN RAMOS



MÉXICO, D.F.

JUNIO, 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.

A mi madre, Alicia.
A mi padre, Raymundo
A mis tías, Teresa y Marina.
A mi esposa, Mireya

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 60478 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN – 216709/21.

Agradezco el apoyo técnico de Perla Moreno Castilla, técnico académico en el laboratorio a cargo del Dr. Bermúdez Rattoni.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por aceptarme en su grupo de trabajo.

A la Q.F.B. Kioko Guzmán Ramos, por sus consejos y apoyo dentro y fuera laboratorio.

A los sinodales: Dr. César Casasola Castro, Martha L. Escobar Rodríguez, Dr. David N. Velázquez Martínez y al Dr. Antonio Zainos Rosales por su tiempo y dedicación a la mejora de esta tesis.

Al Q. Adrian Vázquez Sánchez, por ser mi mejor amigo.

A mis compañeros del laboratorio: Armando, Azul, Consuelo, Cristina, Eduardo, Ernesto, Israela, Julio, Lucía, Luis R., Mónica, Paola, Pascal, Paulina y Perla por los buenos tiempos.

Contenido

ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HACIA UN ESTUDIO OBJETIVO DE LA MEMORIA.	1
1.2. UN MODELO ANIMAL	2
1.3. PSICOLOGÍA FISIOLÓGICA.	3
1.4. PSICOFISIOLOGÍA DE LA MEMORIA.	4
1.5. UNA PROPUESTA MÁS	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA	7
2.1.1. <i>MEMORIA DE CORTO PLAZO A MEMORIA DE LARGO PLAZO; LA CONSOLIDACIÓN</i>	10
2.2. CONDICIONAMIENTO CLÁSICO	13
2.3. MEMORIA DE RECONOCIMIENTO AL SABOR	15
2.4. CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR	16
2.4.1. <i>SUSTRATOS NEURALES DEL CAS</i>	17
2.5. AMÍGDALA	18
2.5.1. <i>CITOARQUITECTURA DE LA AMÍGDALA</i>	19
2.5.2. <i>PROYECCIONES PRINCIPALES A LA AMÍGDALA</i>	20
2.5.3. <i>PROYECCIONES EFERENTES DE LA AMÍGDALA</i>	22
2.6. AMÍGDALA Y CAS	23
2.6.1. <i>SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN EN LA AMÍGDALA Y SU RELACIÓN CON EL CAS</i>	25
2.6.1.1. GLUTAMATO	26
2.6.1.2. GABA	29
2.6.1.3. CATECOLAMINAS: DOPAMINA Y NORADRENALINA	30
2.7. LA REACTIVACIÓN OFFLINE PARTICIPA EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
4. OBJETIVO GENERAL	36
5. EXPERIMENTO 1	37
5.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTO 1	37
5.1.1. <i>ANIMALES</i>	37
5.1.2. <i>IMPLANTACIÓN DE CÁNULAS GUÍA EXPERIMENTO 1</i>	38
5.1.3. <i>MICRODIÁLISIS</i>	38
5.1.4. <i>PROTOCOLO CONDUCTUAL EXPERIMENTO 1</i>	39
5.1.5. <i>ANÁLISIS DE MUESTRAS</i>	40
5.1.6. <i>DERIVATIZACIÓN</i>	40
5.1.7. <i>MECK</i>	40
5.1.8. <i>HISTOLOGÍA EXPERIMENTO 1</i>	41
5.1.9. <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIMENTO 1</i>	41
6. RESULTADOS EXPERIMENTO 1	41
6.1. <i>HISTOLOGÍA EXPERIMENTO 1</i>	41

6.2.	<i>LIBERACIÓN DE GLUTAMATO DURANTE LA ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN.</i>	42
6.3.	<i>LIBERACIÓN DE NORADRENALINA DURANTE LA ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN.</i>	44
6.4.	<i>LIBERACIÓN DE DOPAMINA Y GABA DURANTE LA ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN.</i>	47
6.5.	<i>CONSUMO DE SACARINA DURANTE LA PRUEBA DE MLP EN GRUPOS CONDICIONADOS Y NO CONDICIONADOS.</i>	49
7.	EXPERIMENTOS 2 Y 3.	50
7.1.	EXPERIMENTO 2	50
7.1.1.	<i>Objetivo particular:</i>	50
7.2.	EXPERIMENTO 3	50
7.2.1.	<i>Objetivos particulares:</i>	50
7.3.	METODOLOGÍA EXPERIMENTOS 2 Y 3	50
7.3.1.	ANIMALES	50
7.3.2.	IMPLANTACIÓN BILATERAL DE CÁNULAS GUÍA EXPERIMENTOS 2 Y 3.	50
7.3.3.	PROTOCOLO CONDUCTUAL EXPERIMENTOS 2 Y 3.	51
7.3.4.	MICROINYECCIONES EXPERIMENTOS 2 Y 3.	51
7.3.4.1.	MICROINYECCIÓN DE TTX.	51
7.3.4.2.	MICROINYECCIÓN DE PROPRANOLOL O APV.	52
7.3.5.	HISTOLOGÍA EXPERIMENTOS 2 Y 3	52
7.3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIMENTOS 2 Y 3.	52
8.	RESULTADOS EXPERIMENTO 2.	52
8.1.	HISTOLOGÍA EXPERIMENTO 2 Y 3.	52
8.2.	BLOQUEO DE LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS MEDIANTE LA INACTIVACIÓN TEMPORAL DE LA AMÍGDALA DURANTE LA POST - ADQUISICIÓN	53
9.	RESULTADOS EXPERIMENTO 3.	54
9.1.	LA INFUSIÓN EN LA AMÍGDALA DE ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES B – ADRENERGICOS O NMDA DURANTE LA POST - ADQUISICION DEL CAS ATENÚA LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS.	54
10.	DISCUSIÓN.	55
10.1.	CAMBIOS EN LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES DEBIDA A LA PRESENTACIÓN DEL ESTÍMULO GUSTATIVO NOVEDOSO.	56
10.2.	CAMBIOS EN LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES DEBIDA A LA PRESENTACIÓN DEL EI.	57
10.3.	LA REACTIVACIÓN OFFLINE DE LA AMÍGDALA ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS.	59
	SINERGIA DE LOS RECEPTORES B – ADRENÉRGICOS/NMDA EN LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS.	64
11.	CONCLUSIONES	65
12.	REFERENCIAS	67

ABREVIATURAS.

AAA	área anterior amigdalár.
AAH	área anterior amigdalohipocampal.
AB	amígdala basal.
ABM	amígdala basolateral.
AC	adenilato ciclasa.
ACe	amígdala central
AL	amígdala lateral.
AM	amígdala medial.
AMPA	ácido α – amino – 3 – hidroxí – 5 – metil – 4 – isoxazol propiónico.
AMPc	adenosín monofosfato cílcico.
APV	2 – amino – 5- fosfonopentanoato.
CaMKII	calcio calmodulin cinasa.
CAS	condicionamiento aversivo al sabor.
CI	corteza insular.
CoA	núcleo cortical anterior.
CoP	núcleo cortical posterior.
CREB	factor de transcripción dependiente de AMPc.
DA	dopamina.
EC	estímulo condicionado
EI	estímulo incondicionado.
GABA	ácido γ – amino butírico.
Glu	glutamato.
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia.
i.p.	intraperitoneal
LTP	potenciación a largo plazo.
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno.
MECK	electroforesis capilar micelar
MCP	memoria a corto plazo.
MLP	memoria a largo plazo.
NA	noradrenalina
NAc	núcleo accumbens
NCST	núcleo cama de la stria terminal.
NCTAO	núcleo cama del tracto accesorio olfatorio.
NMDA	N – metil – D – aspartato.
NPB	núcleo parabraquial.
NTOL	Núcleo del tracto olfatorio lateral.
NTS	núcleo del tracto solitario.
PKA	proteína cinasa dependiente de AMPc.
PKC	proteína cinasa C.
SNC	sistema nervioso central
TTX	tetrodotoxina.

RESUMEN

La supervivencia de los organismos requiere del reconocimiento de estímulos que predigan situaciones nocivas, este tipo de aprendizaje tiene un componente emocional importante lo que facilita su adquisición. Regularmente este aprendizaje es vital, por lo que es necesario que perdure. Para tal efecto se ha postulado que el proceso de consolidación de la memoria requiere de la reactivación offline de los circuitos neuronales involucrados en la adquisición de la tarea. No obstante se desconoce si dicha reactivación involucra cambios en los niveles extracelulares de neurotransmisores durante la post – adquisición.

Usando como paradigma conductual al condicionamiento aversivo al sabor (CAS), en el cual se pareo un estímulo gustativo novedoso (EC) y un estímulo visceral aversivo (EI), se analizaron cambios en la liberación de glutamato, noradrenalina, dopamina y GABA durante la adquisición y post – adquisición del CAS dentro de la amígdala, en esta estructura converge el procesamiento de ambos estímulos y cuya integridad funcional es importante para el establecimiento de la memoria gustativa de aversión. Adicionalmente se estudió la funcionalidad de los cambios de liberación de los neurotransmisores antes mencionados en la consolidación del CAS.

El monitoreo se realizó mediante la técnica de microdiálisis en libre movimiento. Se utilizaron tres grupos de ratas macho de la cepa Wistar, al primer grupo (Sac/LiCl, n=6) se le presentó 10 mL de sacarina 0.1%, pasados 15 min se inyectó i.p. LiCl 0.4M; al segundo grupo (Sac/NaCl, n=5) se le presentó 10 mL de sacarina 0.1%, pasados 15 min se inyectó i.p. NaCl 0.4M; finalmente al tercer grupo (Retrógrado, n=4) se le inyectó i.p. LiCl 0.4M y 15 minutos después se le proporcionó 10 mL de sacarina 0.1%. Los cuales fueron monitoreados durante la adquisición y una hora post – adquisición. La prueba del CAS se realizó 72 horas después del condicionamiento con la presentación de 30 mL de sacarina 0.1%. Se registra el incremento de noradrenalina ante la presentación del EC y ante la irritación del peritoneo mediante la inyección i.p. de NaCl 0.4M o LiCl 0.4M. Asimismo, existe un incremento de glutamato en la amígdala ante la inyección i.p. de LiCl 0.4M pero no de NaCl 0.4M. Se observó un incremento de noradrenalina y de glutamato en la amígdala 40 minutos después de la adquisición. Estos incrementos no aparecen en los grupos controles que fueron incapaces de adquirir el CAS.

Para comprender el papel de la reactivación offline de la amígdala en la consolidación del CAS se utilizaron 5 grupos de ratas macho de la cepa Wistar (PBS, n=7; TTX, n=7; SS, n=18; PROP, n=19; APV, n=17) a los cuales se les presentó 30 mL de sacarina 0.1% y 15 minutos después se les inyectó i.p. LiCl 0.4M. Se microinyectó en la amígdala inmediatamente después del EI (PBS ó TTX) ó 30 minutos después del EI (SS, PROP ó APV). Para evaluar la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo se presentó de 30 mL de sacarina 0.1% a las 4 y 72 horas respectivamente. La inactivación temporal de la amígdala, así como el bloqueo de los receptores NMDA o los β – adrenérgicos durante la reactivación offline, atenúa la consolidación de la memoria aversiva al sabor. Por lo tanto, se requiere de la reactivación de la amígdala para la consolidación de la memoria aversiva, esta reactivación se compone de la señal glutamatérgica y parece estar modulada por la noradrenalina.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. HACIA UN ESTUDIO OBJETIVO DE LA MEMORIA.

Mucho antes de que la psicología emergiera como una ciencia, el aprendizaje y la memoria fueron estudiados desde la perspectiva filosófica; en un principio, Platón proponía que el aprendizaje era de carácter innato, pues para él, el origen del conocimiento era recordar aquello que el alma había aprendido previamente mientras se encontraba libre del cuerpo y que había olvidado al reencarnar. Por lo tanto, para Platón, el alma es un recipiente de la memoria y la información que posee proviene de una vida anterior a aquella de la que se es consciente en el presente (Valencia, 2008).

Sin embargo, Aristóteles, discípulo de Platón y considerado como el primer asociacionista, propuso una teoría elemental sobre la memoria donde tres principios describen cómo un pensamiento se asocia a otro. El primer principio es el de contigüidad, entre más cerca en espacio o tiempo están dos objetos, es más probable que el pensamiento de uno de los objetos conlleve al otro. Los otros dos principios son el de similitud y contraste, donde el pensamiento de un concepto u objeto tiene la capacidad de trasladar al pensamiento hacia objetos análogos u opuestos. (Mazur, 2006). Además, Aristóteles consideró que la experiencia a través de los sentidos es la que da origen al conocimiento (Valencia, 2008).

Siglos después, varios filósofos conocidos como los Asociacionistas Británicos, influenciados por las ideas de Aristóteles, tomaron al asociacionismo como una teoría que explicaba todo el conocimiento. No obstante, fue hasta 1885, cuando Hermann Ebbinghaus sometió los principios asociacionistas a una prueba experimental; sus experimentos consistieron en la búsqueda de medidas objetivas para la adquisición y recuerdo de paquetes de información en la memoria humana (Dudai, 1989); además, estableció metodologías experimentales para el estudio de los fenómenos de la memoria, y describió la curva de retención y de aprendizaje (Anderson, 2001). Los experimentos hechos por Ebbinghaus son considerados un hito en la investigación sobre la memoria, aunque estos no facilitaban la comprensión de cómo es que el cerebro construye dichos recuerdos.

1.2. UN MODELO ANIMAL.

Veintiséis años antes de que Ebbinghaus publicara sus resultados, Charles Darwin (1859), en su teoría sobre la evolución por selección natural, sugirió que las especies evolucionaron de otras como resultado de un proceso adaptativo. Las variaciones en los organismos que promovieron la supervivencia de los mismos, serían transmitidas durante generaciones, y por lo tanto, esparcidas a través de la población. Esto nos permite encontrar diferencias y similitudes entre las especies en el comportamiento y en los procesos psicológicos de manera similar a las encontradas en características morfológicas. Consecuentemente, la teoría Darwinista logró que el estudio sistemático de la conducta en otros animales sea una rama legítima del quehacer científico (Mackintosh, 1994).

No obstante, los métodos utilizados por Ebbinghaus para el estudio de la memoria no eran aplicables a los demás animales, dado que éstos métodos dependen del uso del lenguaje, por lo que eran necesarios otros paradigmas ajustables a un modelo animal no humano (Dudai, 1989). No fue hasta que Iván Pavlov, al estudiar la fisiología de la digestión, consideró al método del reflejo condicionado como un procedimiento ideal para investigar la organización del sistema nervioso, es decir, el sustrato neural para el aprendizaje y la memoria (Mackintosh, 1994). Este procedimiento es conocido como condicionamiento clásico o pavloviano.

Por otro lado, Edward Thorndike estudió una situación de aprendizaje diferente a la que estudió Pavlov. Thorndike estaba interesado en el estudio objetivo de la conducta, los movimientos, y particularmente en el “intelecto” de los animales, utilizando como medición objetiva la resolución de problemas (Dudai, 1989). Este paradigma fue pionero en el establecimiento del condicionamiento operante o instrumental.

Los dos procedimientos experimentales que Pavlov y Thorndike implementaron, condicionamiento clásico o pavloviano y el condicionamiento operante o instrumental, respectivamente, llegaron a dominar la investigación psicológica en el aprendizaje animal (Mackintosh, 1994). Estos paradigmas constituyen las bases de la escuela conductista; sin embargo, esta corriente

dejó a un lado el estudio de la fisiología, siendo entonces incapaz de poder explicar cómo es que los estímulos logran cambios fisiológicos en los organismos y cómo los organismos son capaces de emitir conductas; esta fue la principal crítica de Edward Tolman (1922) hacia el conductismo no fisiológico.

1.3. PSICOLOGÍA FISIOLÓGICA.

A pesar de que la escuela conductista había relegado a la fisiología, el estudio de una psicología fisiológica se venía desarrollando desde la antigüedad; culturas como la egipcia, hindú y china consideraron al corazón como la base del pensamiento y de las emociones; los antiguos griegos también creían lo mismo, pero fue Hipócrates quien concluyó que este papel debía ser asignado al cerebro (Carlson, 2007).

No fue sino hasta el siglo XVII cuando, el filósofo y matemático francés, René Descartes, especuló sobre el papel de la mente y el cerebro en el control de la conducta. En otras palabras, creía que la mente controlaba los movimientos del cuerpo, mientras que el cuerpo, a través de los órganos de los sentidos, proveía a la mente de información de lo que sucedía en el ambiente (Carlson, 2007).

En el siglo XIX hubo un gran debate centrado en la localización de las funciones psicológicas en el cerebro, Joseph Gall insistía en que la mente estaba situada en el cerebro, y planteó la teoría de localizar una función psicológica en una región particular del cerebro, teoría que después fue llamada frenología. Sin embargo, Pierre Flourens se convirtió en el antagonista de Gall, proponiendo que los hemisferios cerebrales tienen funciones específicas pero no localizadas; pensamiento que después se vio comprometido por los trabajos hechos por Paul Broca, David Ferrier, Eduard Hitzig, Gustav Theodor Fritsch y Karl Wernicke (Cooper, 2005).

A pesar de los datos clínicos mostrados sobre la localización de funciones en el cerebro, Karl Lashley puso en duda la localización del aprendizaje y la

memoria a un área circunscrita al cerebro, y resurgió la idea de equipotencialidad¹ aplicada a las funciones corticales cerebrales.

Karl Lashley es conocido como el psicofisiólogo norteamericano más influyente, pues logró unificar el conductismo con la fisiología. Su experimento más famoso fue aquél donde entrenó ratas en un laberinto, y posteriormente lesionó diferentes proporciones de la corteza cerebral, la conducta que midió fue la capacidad de resolver dicho laberinto. A partir de este experimento, las conclusiones de Lashley fueron las siguientes: "...pequeñas lesiones en la corteza cerebral producen síntomas transitorios o simplemente no los producen, así que es claro que los mecanismos para los hábitos no se encuentran cercanamente agrupados en pequeñas áreas. Cuando áreas grandes son comprometidas, usualmente existen amnesias para varias actividades. Después de lesionar el cerebro, la taza de información de algunos hábitos está relacionada de forma directamente proporcional a la dimensión de la lesión y es independiente de la localización en la corteza cerebral. Esto puede ser interpretado únicamente como la evidencia de que la memoria no es una función de células individuales, pero es una propiedad de la masa total del tejido" (Lashley, 1930).

1.4. PSICOFISIOLOGÍA DE LA MEMORIA.

A principios del siglo XX, el neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal, propuso que el crecimiento de contactos entre las neuronas parecía ser la base a través de la cual el sistema nervioso central (SNC) podía alterarse en respuesta a la experiencia; dichos contactos son llamados actualmente sinapsis, término que fue apuntado por Sherrington (Mackintosh, 1994).

Los avances en neuroanatomía, fisiología, psicología y la unión de estas disciplinas permitieron la creación de dos propuestas teóricas sobre los mecanismos neurales del aprendizaje hechas de forma independiente por Jerzy Konorski y Donald Hebb; la teoría de Konorski dice que "el preconditionamiento óptimo para el reflejo condicionado es la coincidencia de excitación en el centro emisor con un incremento abrupto en la actividad del

¹ Equipotencialidad: capacidad que posee cualquier área intacta del sistema nervioso para reemplazar, sin reducción en eficiencia, las funciones perdidas por la destrucción de otras áreas.

centro receptor”. En otras palabras.... “Los impulsos establecidos por el centro que será condicionado deben alcanzar el centro incondicionado en el período que la activación del centro incondicionado está creciendo” (Konorski, 1948).

Un año más tarde Hebb propuso que “cuando un axón de la célula A está lo suficientemente cerca para excitar a la célula B y repetidamente o persistentemente toma parte en excitarla, algún proceso de crecimiento o cambio metabólico ocurre en una o ambas células tal que la eficiencia de A, como una de la células que dispara a B, se incrementa” (Hebb, 1949).

Desde principios de la década de los 50's se intentó varias veces explorar la relación entre el aprendizaje y los cambios neuronales o sinápticos (Mackintosh, 1994), también durante esta década se dieron varios casos clínicos que revelaron los sustratos anatómicos para la memoria. El caso más citado ha sido el del paciente H.M., el cual sufría de convulsiones desde la edad de 16 años y fue sometido a cirugía a la edad de 27 años. En dicha cirugía se removió de forma bilateral el lóbulo temporal medial; después de su recuperación, su vida cambió dramáticamente debido a un déficit profundo de la memoria. Varias pruebas psicológicas mostraron que no existían deficiencias en la percepción, el pensamiento abstracto o en el razonamiento, sin embargo, H.M. era incapaz de recordar información que adquiría durante su vida diaria (Purves et al., 2008).

Fue hasta los años 60's, cuando el grupo de investigadores encabezado por Mark Rosenzweig pudo establecer experimentalmente que el ambiente donde crecían las ratas (aisladas, en ambientes sociales o en un ambiente enriquecido), estaba relacionado con cambios significativos en el peso del cerebro, engrosamiento cortical, cambios químicos y ramificaciones dendríticas (Bennett et al., 1964; Bennet et al., 1969; Rosenzweig et al., 1996). Esto fue un gran avance que apoyaba que el aprendizaje ocasiona cambios estructurales en el cerebro.

El esfuerzo de centenares de científicos arrojó todo un arsenal de herramientas electrofisiológicas, farmacológicas, bioquímicas y de biología molecular al estudio de la conducta, el aprendizaje y la memoria. En 1973 se

publicó un trabajo que revolucionó el estudio de las bases neurales del aprendizaje. Bliss y Lømo implantaron electrodos en los cerebros de conejos anestesiados y estimularon la vía entrante de la formación hipocampal mientras se registraban los cambios eléctricos en una región llamada giro dentado; reportaron que la aplicación previa de trenes de estimulación de alta frecuencia, durante los periodos de estimulación de baja frecuencia, ocasionaba un incremento en el tamaño de los potenciales evocados (Mackintosh, 1995, Bliss et al., 1973); dicho procedimiento es conocido como potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). Hoy en día, la LTP se utiliza como modelo para el estudio del aprendizaje y la memoria, y es muy útil para poder comprender las bases biológicas que subyacen a dichos procesos.

A pesar de los avances en las diferentes técnicas para el estudio del aprendizaje, aún quedaba por conocer cómo es que el condicionamiento y el aprendizaje no asociativo ocasionaban cambios estructurales en los organismos. Los estudios realizados por Eric Kandel y su grupo, en el molusco de mar *Aplysia californica*, ayudaron a comprender las bases biológicas del aprendizaje asociativo y no asociativo (Anderson, 2001). La *Aplysia californica*, tiene un sistema nervioso simple que contiene alrededor de 20,000 células nerviosas centrales y por lo tanto es un excelente sistema para estudiar la memoria. Además posee un repertorio conductual de reflejos defensivos para contraer la agalla y su sifón, un conducto carnosos que rodea la agalla y es usada para expeler el agua (Kandel et al., 2001). Dicho reflejo exhibe formas de aprendizaje asociativo y no asociativo (Hawkins et al., 2006), lo cual permitió estudiar los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios estructurales en la memoria.

1.5. UNA PROPUESTA MÁS....

Las preguntas acerca de la memoria deben responderse a varios niveles de análisis, desde los eventos moleculares que subyacen los cambios sinápticos hasta problemas más generales en la organización de la memoria dentro del cerebro y la formación de la conducta. Dichas preguntas promueven el uso de técnicas modernas de la neurociencia conductista: lesiones, registro

de la actividad neuronal, mediciones bioquímicas y anatómicas, estimulación eléctrica del cerebro y administración de fármacos (Squire, 1987).

El presente trabajo pretende responder y generar más dudas acerca de la liberación de diversos neurotransmisores ante el condicionamiento clásico, y cómo es que dichos neurotransmisores intervienen en la representación de los estímulos involucrados; así como dilucidar el papel que juega la bioquímica del cerebro en el establecimiento de la memoria.

Para tal efecto, se utilizará el paradigma conductual del condicionamiento aversivo al sabor, y para estudiar la bioquímica del cerebro durante esta tarea se empleará la técnica de microdiálisis en libre movimiento. Dicha técnica permite la recolección de neurotransmisores en el cerebro para su posterior análisis. A partir de los resultados obtenidos se administraran fármacos mediante la microinyección intracerebral que bloqueen el efecto de los neurotransmisores y comprender su papel en la adquisición y el establecimiento del condicionamiento aversivo.

La estructura a estudiar será la amígdala, estructura cerebral involucrada en el aprendizaje y la memoria, así como en procesos emocionales, motivacionales, sociales y modulación del sistema autónomo (Alheid et al. 1995).

1. MARCO TEÓRICO

1.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

La supervivencia de una especie requiere que sus miembros se comporten de forma adecuada a su entorno, este comportamiento puede llegar a adaptarse al medio ambiente por dos formas: mediante la evolución o el aprendizaje (Anderson, 2001). El aprendizaje les permite a los organismos demostrar la información adquirida sobre su ambiente y a la memoria llevar un registro de la experiencia.

De esta forma, el aprendizaje se ha definido como el proceso por el cual ocurren cambios duraderos en el potencial conductual como resultado de la experiencia (Anderson, 2001). El aprendizaje es un fenómeno continuo de la naturaleza, sin embargo, es de gran utilidad clasificar este fenómeno en

diversas categorías como una manera de organizar el estudio acerca del aprendizaje y definir las metodologías empleadas para investigarlo. Según Dudai (1989), el aprendizaje puede ser clasificado en: aprendizaje no asociativo, donde se encuentran los fenómenos de habituación y sensibilización; aprendizaje asociativo, en el cual los organismos aprenden las relaciones entre eventos, estímulos o conductas; y finalmente el aprendizaje incidental o de procesos relacionados, donde el aprendizaje es estudiado como cambios adaptativos debidos a las entradas incidentales de la información, es decir, el organismo no es capaz de identificar lo que está aprendiendo, sin embargo se puede observar en la conducta de los organismos dicho aprendizaje.

También existen otros tipos de aprendizaje que no fácilmente entran en las categorías mencionadas con anterioridad, y que pueden tener características de las mismas; fenómenos como la impronta, mecanismo que permite a los organismos jóvenes y vulnerables mantenerse junto a sus padres durante la primera parte de su vida; el aprendizaje de canciones, en el cual las aves aprenden las canciones durante un período crítico de su vida que les permitirán reproducirse y poder así mantener la especie; además existe el aprendizaje social, el cual consiste en la transmisión de información entre organismos de una misma especie, ya sea de fuentes de comida, seguridad en los alimentos o sobre depredadores, la imitación entra en esta categoría (Shettleworth, 1994).

Por otra parte, la memoria se ha definido como el proceso por el cual, el conocimiento, producto del aprendizaje, es codificado, almacenado y después evocado (Kandel et al., 2000). No obstante, debido a que la memoria es un fenómeno muy complejo y de gran diversidad, no es posible estudiar la memoria como un todo, por lo tanto, el estudio de la memoria requiere que se fraccione en componentes más manejables. Dicha división ha acuñado el concepto de sistemas de memoria, donde un sistema de memoria se define como la interacción entre los mecanismos de adquisición, retención y evocación y que utilizan ciertas reglas de operación (Fernández y Bermúdez-Rattoni, 2001). Estos sistemas comparten características en cuanto al proceso del manejo de la información, pero difieren en los propósitos, las

manifestaciones cognitivas o conductuales, los principios de operación y los mecanismos cerebrales involucrados (Tulving, 2000). La figura 1 muestra una posible categorización de la memoria.

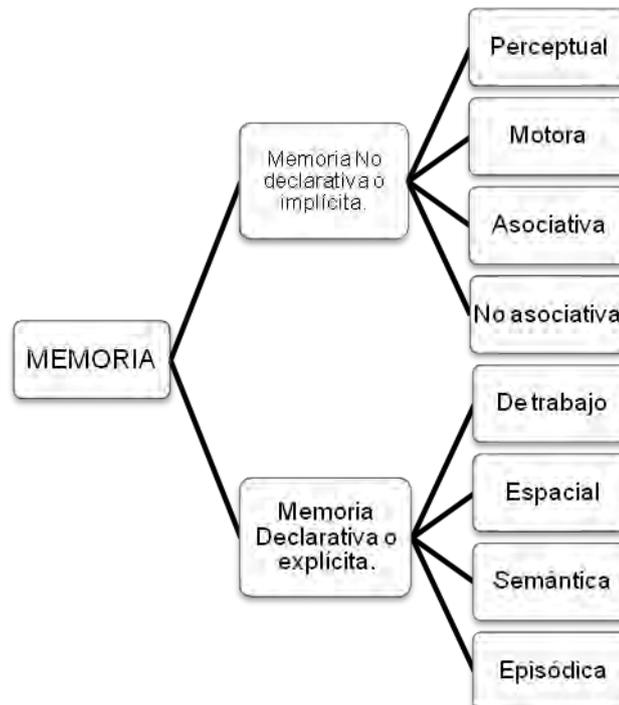


Figura 1. Clasificación de la memoria (Squire y Zola, 1996; Tulving, 2000; Carlson, 2007).

La memoria declarativa, también llamada memoria explícita, se ha subdividido en 4 categorías o sistemas. Estas son: memoria de trabajo, cuya función es mantener la información “en línea” por períodos pequeños de tiempo mientras operaciones cognitivas son llevadas a cabo; la memoria semántica, cuya función es mediar la adquisición y uso del conocimiento general sobre el mundo; la memoria episódica, cuya función es tener acceso a la información personal experimentada en el pasado (Tulving, 2000) y la memoria espacial, cuya función es la de tener información sobre la relación espacial entre los objetos (Carlson, 2007).

La memoria no declarativa, también llamada implícita, incluye instancias de memoria perceptual, que permite a los organismos tener un reconocimiento más rápido de los objetos; memorias motoras, que permiten tener ajustes automáticos de posición y corrección de movimientos al ejecutar ciertas conductas (Carlson, 2007); también se incluyen el aprendizaje asociativo, donde se requiere la asociación espacio – temporal entre estímulos, y el

aprendizaje no asociativo, donde se extrae información sobre un solo estímulo. El común denominador de dichas tareas de aprendizaje es una cierta automaticidad en la respuesta (Dudai, 1989).

1.1.1. MEMORIA DE CORTO PLAZO A MEMORIA DE LARGO PLAZO; LA CONSOLIDACIÓN.

Casi todos los sistemas de memoria son persistentes en el tiempo, a excepción de la memoria de trabajo, donde se requiere que la información se encuentre “activa” durante un período corto de tiempo mientras realizamos operaciones cognitivas (Fernández et al., 2001). Richard Atkinson y Richard Shiffrin publicaron una teoría sobre la memoria, donde indicaban que existían tres tipos de almacenamiento: la memoria a corto plazo (MCP), la memoria a largo plazo (MLP) y una memoria sensorial que es capaz de almacenar registros transitorios de la información proveniente de los órganos sensoriales. La MCP fue considerada como un sistema de almacenamiento temporal que contendría una cantidad reducida de información. Por su parte, la MLP fue considerada como un depósito de conocimiento más permanente, sin ninguna limitación aparente de capacidad. (Anderson, 2001). Y dado que dicho conocimiento requiere que se retenga a través del tiempo, es necesaria la estabilización progresiva, post - adquisición, de la MLP, proceso conocido como consolidación de la memoria (Dudai, 2004).

Desde hace mucho tiempo se había sugerido que las memorias recién adquiridas requieren de tiempo para que perduren, y que en ocasiones, dichos trazos mnémicos pueden ser sujetos a interferencia por estímulos distractores, lesiones, o toxinas los cuales, pierden la efectividad de interferencia con el paso del tiempo (Dudai, 2004). Pero no se había demostrado experimentalmente hasta que se publicó una monografía en la que Georg Elias Müller y su discípulo Alfons Pilzecker describieron experimentos cuya finalidad era identificar las leyes que rigen el establecimiento y la evocación de la memoria. Las conclusiones principales de este trabajo fueron que la fijación de la memoria requiere del paso del tiempo (ver Figura 2), y que la memoria es muy frágil durante el período de consolidación (Prado – Alcalá y Quirarte, 2007).



Figura 2. Fases de la consolidación de la memoria (McGaugh, 2000).

Medio siglo después de lo propuesto por Müller y Pilzecker, comenzaron a publicarse varios resultados que demostraban la labilidad de la memoria durante el proceso de consolidación. En 1949, Duncan entrenó diariamente, durante 18 días, a ratas en una tarea de evitación activa¹, cada ensayo era seguido por un shock electro-convulsivo, el cual causa un disparo masivo de las neuronas produciendo convulsiones e inconsciencia. Duncan estaba interesado particularmente en la relación entre el aprendizaje y el intervalo de aplicación del shock, así que, les aplicó shocks electro – convulsivos en intervalos desde 20 segundos hasta 14 horas después del entrenamiento. Los resultados indicaban una atenuación en la consolidación de la tarea cuando los shocks eran aplicados 20 segundos después del ensayo; pero cuando el shock era aplicado a partir de una hora posterior al ensayo no parecía tener efecto sobre el aprendizaje (Roberts, 1998). En 1962 Flexner encabezó una serie de trabajos donde entrenaba a roedores en la resolución de laberintos e inyectaba subcutáneamente inhibidores de síntesis de proteínas después del entrenamiento. Sus resultados mostraban un déficit en la resolución de dichos laberintos. Dos años más tarde demostró que la inyección bilateral de inhibidores de síntesis proteica en la región temporal del cerebro afectaba el desempeño de los roedores en el laberinto (Flexner et al., 1964).

A partir de entonces, los neurocientíficos han invertido un considerable esfuerzo en encontrar los mecanismos moleculares que subyacen a las

¹ Tarea de evitación activa: Tarea en la cual, el organismo tiene que pasar de un sitio donde se le dará un choque eléctrico en las patas hacia un sitio seguro.

memorias de corto y largo plazo. Después de la inhibición de síntesis proteica y la subsecuente pérdida de la memoria, se pensaba que existían moléculas “codificantes” para una conducta en particular o para la representación de un estímulo (Squire, 1987). Sin embargo, hoy en día, con los avances en biología molecular, se ha logrado vislumbrar los mecanismos celulares detrás de la MCP y la MLP. En el caso de la MCP, cuando la información llega a través de las entradas sensoriales se liberan diferentes neurotransmisores dependiendo de la estructura y del estímulo en particular, activando canales que permiten el paso de iones y/o de diversas cascadas de segunda mensajería. Dentro de los mecanismos involucrados en la MCP se encuentra la participación de cinasas², entre las que destacan la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), cinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína cinasa C (PKC); la activación de estas enzimas producen cambios transitorios de corta duración en la fosforilación³ de canales iónicos, receptores, enzimas y/o proteínas del citoesqueleto (Micheau y Riedel, 1999)

Por otro lado, se sabe que la MLP requiere de la síntesis de proteínas (Squire, 1987); esto se logra mediante la activación de segunda mensajería a través del adenilato ciclasa (AC), la cual aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Posteriormente, el factor de la transcripción dependiente de AMPc (CREB) se activa mediante la fosforilación por la PKA y/o la calcio calmodulina cinasa (CaMKII), La fosforilación del CREB promueve el reclutamiento de coactivadores transcripcionales que inducen la transcripción de genes de expresión inmediata, lo cuales, a su vez, activan la transcripción de genes de expresión tardía. Por lo tanto, la transcripción y traducción en la sinapsis modifica la configuración de la misma, insertando nuevos receptores y/o modificando la liberación de neurotransmisores (Dudai, 2002).

La evocación de la memoria involucra la reactivación rápida de las memorias que permanecen latentes (Cammarota et al., 2004). Dicha reactivación implica la activación inicial de redes neuronales intrínsecas, la selección de estímulos extrínsecos relevantes, y la integración de estas diferentes fuentes de información en un trazo mnémico con significado (Sara,

² Cinasas: enzimas que transfieren un grupo fosfato.

³ Fosforilación: Adición de un grupo fosfato (PO₄) a una proteína o molécula.

2000). La regulación de la evocación se lleva a cabo mediante la intervención los sistemas de neurotransmisión (Cammarota et al., 2004). Sin embargo aún se desconoce mucho sobre los procesos fisiológicos partícipes en el acto de recordar.

1.2. CONDICIONAMIENTO CLÁSICO.

El condicionamiento clásico es un tipo de aprendizaje asociativo descubierto por Iván Pavlov, quien estudió la fisiología digestiva y los reflejos gástricos (Bermúdez – Rattoni et al., 2001). Uno de los jugos gástricos estudiados por Pavlov fue la saliva, la cual, es la primera secreción que tiene contacto con los alimentos. Los sujetos utilizados en sus estudios fueron perros, en los cuales desarrolló una técnica quirúrgica que le permitía dirigir la saliva de los ductos salivales a través de un tubo, y así poder medir la cantidad secretada de saliva. En su investigación, Pavlov administró comida a los perros y la salivación de estos era medida mientras comían; sin embargo, Pavlov notó que los perros que habían sido utilizados con anterioridad, comenzaban a salivar incluso antes de que la comida fuera presentada. Pavlov dilucidó que algunos estímulos que habían sido precedidos regularmente a la presentación de la comida habían adquirido la capacidad de provocar la respuesta de salivación, este fenómeno es ahora conocido como condicionamiento clásico (Mazur, 2006).

Hoy en día se sabe que para establecer un condicionamiento clásico es necesario seleccionar un estímulo que provoque una respuesta característica, este estímulo es llamado estímulo incondicionado (EI), y la respuesta es llamada respuesta incondicionada (RI); el término incondicionado es usado para establecer el significado de que la conexión entre el estímulo y la respuesta no es aprendida. El siguiente elemento necesario para el establecimiento del condicionamiento clásico es el estímulo condicionado (EC), el cual, puede ser cualquier estímulo que inicialmente no ocasione la RI; el término condicionado indica que únicamente después de que el condicionamiento se ha llevado a cabo, el EC será capaz de provocar la RI, dicha respuesta es llamada respuesta condicionada (RC) (Mazur, 2006).

Para obtener un condicionamiento, se comienza con la adquisición por asociaciones repetidas (Bermúdez – Rattoni et al. 2001), es decir, se requiere la repetición de los pareamientos entre el EC y el EI para que la RC se establezca. En los primeros ensayos, puede o no haber una ligera RC ante el EC, con pareamientos posteriores la RC incrementa gradualmente. La parte del proceso del condicionamiento clásico en la cual, el sujeto experimenta los pareamientos EC – EI y la RC aparece gradualmente e incrementa es llamada fase de adquisición (Mazur, 2006). Los EIs que son mayores en tamaño o intensidad logran establecer asociaciones más fuertes (Anderson, 2001), además se requiere de menor número de ensayos para que la RC aparezca (Mazur, 2006).

El tiempo entre la presentación del EC y el EI es de suma importancia, por lo tanto se han estudiado varios tipos de relaciones temporales entre estos estímulos (ver Figura 3). En el condicionamiento simultáneo, el EC y el EI son presentados al mismo tiempo, sin embargo, este condicionamiento es poco eficaz; para el condicionamiento de trazo el EC y el EI están separados por un intervalo de tiempo en el cual ninguno de los dos estímulos están presentes, dicho intervalo de tiempo está relacionado de manera inversa con la fuerza de asociación. Cuando el EC precede al EI por varios segundos, pero el EC sigue presente hasta la presentación del EI se obtiene un condicionamiento de larga demora; la mayoría de los experimentos en condicionamiento clásico involucra un condicionamiento de corta demora, en el cual el EC comienza alrededor de un segundo antes y continúa hasta el fin de la presentación del EI. Finalmente existe otra relación temporal donde el EC es presentado después del EI, esta relación es llamada condicionamiento retrógrado y el nivel de condicionamiento es extremadamente bajo (Mazur, 2006).

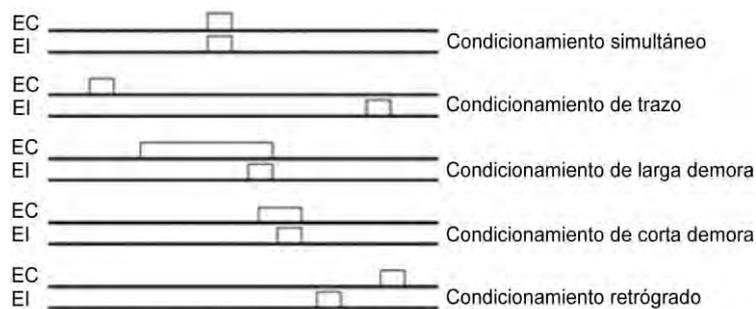


Figura 3. Relaciones temporales entre EC y EI (Mazur, 2006).

1.3. MEMORIA DE RECONOCIMIENTO AL SABOR.

Una de las habilidades de supervivencia más útiles que los animales han desarrollado a través de la evolución es la memoria de reconocimiento al sabor. La memoria de reconocimiento es la habilidad para recordar las cosas previamente encontradas. En el caso particular de la comida, cuando un animal encuentra un nuevo sabor, muestra una reducción en el consumo del mismo, es decir, una respuesta neofóbica. Cuando el nuevo sabor no tiene consecuencias negativas, en encuentros posteriores el organismo incrementará su consumo y comenzará a reconocer el sabor como seguro, proceso llamado atenuación de la neofobia. Pero si el nuevo sabor es asociado con enfermedad, los organismos evitan dicho sabor la próxima vez que lo encuentren, desarrollando una aversión de larga duración (Bermúdez – Rattoni, 2004).

Por lo tanto, dadas las variaciones del ambiente, los organismos deben aprender qué alimentos son seguros para comer y cuáles no. La mayoría de los alimentos son caracterizados por un sabor específico, así que es importante reconocer los sabores que señalan “seguridad” o “malestar” con el fin de consumir todos aquellos alimentos que son benéficos y evitar aquellos que son potencialmente dañinos (Welzl et al. 2001). La característica distintiva de este aprendizaje es la asociación que se forma entre los estados viscerales (señalados a través de aferencias viscerales) y estímulos externos (mediados por aferencias gustativas, olfativas, visuales o somatosensoriales) (Bures, 1998a).

1.4. CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR.

Una gran variedad de organismos pueden desarrollar aversiones a comida o a líquidos con sabores específicos en su hábitat natural (Welzl et al., 2001). Sin embargo, estudiar este fenómeno fuera del laboratorio resulta demasiado complejo. No fue sino hasta 1955, cuando John Garcia y colaboradores lograron introducir dicho fenómeno al laboratorio, su trabajo consistió en la exposición de ratas a rayos gamma⁴, los cuales ocasionan malestar gastrointestinal, mientras estas bebían agua con sacarina. Cuando de nuevo se presentó la sacarina a las ratas, estas mostraron un menor consumo, obteniendo una aversión al sabor (García et al., 1955). Este paradigma ahora se conoce como condicionamiento aversivo al sabor (CAS).

La adquisición de la aversión al sabor representa y sigue las reglas del condicionamiento clásico, siendo la sustancia inductora de malestar el EI y la náusea la RI. El estímulo gustativo se convierte en el EC (Welzl et al., 2001) y las RCs son: la apertura del hocico, sacudidas de cabeza, limpiar la piel y la lengua con las patas delanteras, dejar caer la sustancia y/o frotar el hocico contra el piso o las paredes (Bures, 1998b). Sin embargo, la medición de dichas conductas resulta complicada, por lo tanto una vez que el EC ha adquirido las propiedades de una señal aversiva, la medición del CAS se realiza con la cantidad de ingesta durante la re-exposición del EC en días posteriores (Yamamoto et al., 1998).

El CAS ha sido exitosamente utilizado como un paradigma de aprendizaje y memoria en roedores (Welzl et al. 2001) debido a que se conocen de manera amplia las estructuras cerebrales involucradas en este aprendizaje, presenta una rápida adquisición (Yamamoto, 1993) y por ser un condicionamiento de trazo el CAS puede ser inducido aún cuando existe un largo intervalo de tiempo entre el EC y el EI. Estas características permiten un mejor entendimiento de la formación de asociaciones y la comprensión de los eventos celulares y bioquímicos para la formación de una memoria a largo plazo (Bures, 1998^a; Bermúdez – Rattoni, 2004). Además en el CAS se han observado fenómenos como la generalización, extinción, inhibición

⁴ Rayos gamma: radiación producida por elementos radiactivos, en este caso cobalto 60

condicionada, bloqueo, condicionamiento de segundo orden, inhibición latente y ensombrecimiento (Mazur, 2006; Bures, 1998b), fenómenos característicos del condicionamiento clásico (Bermúdez – Rattoni et al., 2001; Bures, 1998b; Mazur, 2006)

1.4.1. SUSTRATOS NEURALES DEL CAS.

En diversos laboratorios se han investigado los sustratos neurales del CAS, esto se ha logrado mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, anatómicas y de lesiones cerebrales y que han resultado en la descripción de las vías neurales para los estímulos gustativos y viscerales. De forma simplificada, la vía gustativa de la lengua alcanza la parte rostral de núcleo del tracto solitario (NTS) a través de los pares craneales VII, IX, y el X (Bermúdez-Rattoni, 2004), estas neuronas mandan sus axones ipsilateralmente hacia el núcleo parabraquial (NPB) en su porción medial a través de la formación reticular (Yamamoto et al. 1994). El NPB proyecta fibras a la porción parvocelular del núcleo ventro-posterio-medial del tálamo (Bermúdez-Rattoni, y Yamamoto, 1998), al hipotálamo lateral (Li et al., 2004), al núcleo cama de la estría terminallis, a la amígdala central (ACe) y a la amígdala basolateral (ABL). Además el núcleo ventro-posterio-medial del tálamo proyecta a la corteza insular en su porción agranular (CI) (Reilly, 1999).

Existen al menos dos vías por las cuales el estímulo que provoca el malestar llega al sistema nervioso central (Bermúdez – Rattoni, 2004). Esto depende del tipo de estímulo, si el estímulo irrita el sistema gastrointestinal, la información es enviada a través del décimo par craneal y si el malestar es a causa de toxinas en la sangre o de movimientos que causan náusea, la información proviene del área postrema (Bermúdez – Rattoni et al., 1998), teniendo como sitio de llegada la porción caudal del NTS, de ahí se proyectan fibras a los subnúcleos laterales del NPB (Yamamoto et al., 1994). Las aferencias de la porción lateral del NPB llegan a la parte parvocelular de núcleo ventroposterolateral del tálamo y a la ABL, además la CI en su porción granular recibe proyecciones de la porción visceral del tálamo (Bermúdez – Rattoni et al., 1998).

La vías viscerales y gustativas convergen en varias estructuras cerebrales, donde el malestar y el sabor pueden ser asociados para crear el trazo de memoria (Bermúdez – Rattoni, 2004) (ver Figura 4); la adquisición del CAS cambia los patrones de actividad en respuesta al EC en el NTS, PBN, amígdala (Welzl et al., 2001) y en la CI (Acolla et al., 2007).

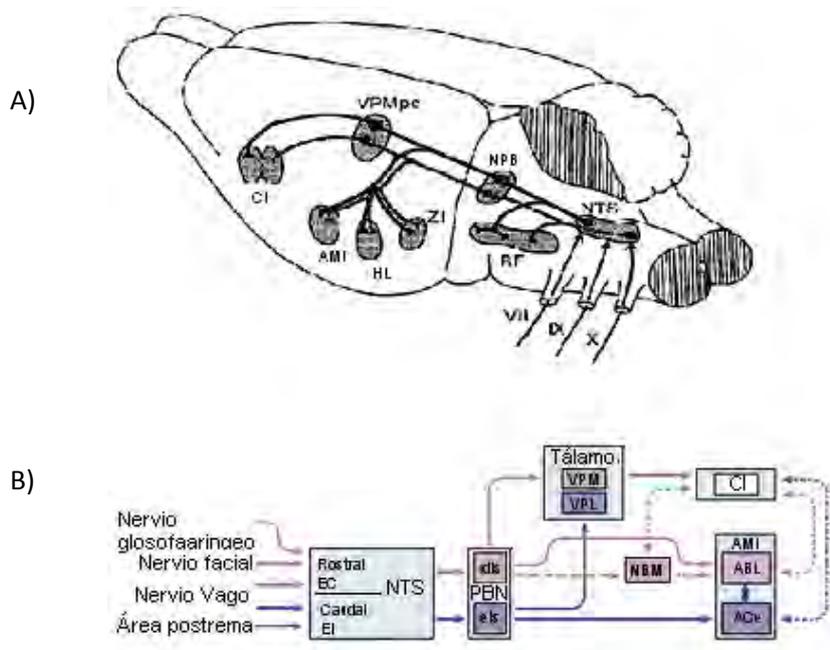


Figura 4 A) Dibujo esquemático de las vías centrales gustativas y viscerales en el cerebro de rata. (Yamamoto et al, 1998). B) Esquema de las vías cerebrales principales del CAS (Bermúdez – Rattoni, 2004). Núcleo del tracto solitario (NTS); núcleo Parabraquial (PBN); núcleo basal magnocelular (NBM); núcleo ventro-postero-medial del tálamo (VPM); núcleo ventro-postero-lateral del tálamo (VPL); amígdala central (ACe); amígdala basolateral (ABL); corteza insular (CI).

1.5. AMÍGDALA.

El término amígdala se origina del griego almendra, la cual describe burdamente la masa ovoidal de materia gris encontrada en la porción medial del lóbulo temporal en los primates y forma parte del sistema límbico⁵, sin embargo, en la rata, la amígdala difícilmente tiene forma de almendra, pero la mayoría de sus núcleos componentes son los mismos que los encontrados en primates (Alheid et al., 1994).

Los núcleos de la amígdala se encuentran divididos en cuatro grupos (ver Figura 5):

⁵ Sistema límbico: conjunto de estructuras cerebrales involucradas en las emociones.

1. Grupo profundo o basolateral, el cual contiene a los núcleos lateral (AL), el cual es llamado también basolateral (ABL); accesorio o basomedial (ABM) y el basal (AB) (Pitkänen et al., 2000) .

2. Grupo superficial o corticomedial, este grupo incluye a los núcleos del tracto olfatorio lateral (NTOL), núcleo cama del tracto accesorio olfatorio (NCTAO), los núcleos anteriores y posteriores corticales (CoA y CoP, respectivamente) y la corteza periamigdalóide (Pitkänen et al., 2000; Sah et al., 2003).

3. Grupo centromedial consiste de los núcleos central (ACe), medial (AM) y la porción amigdalóide del núcleo cama de la stria terminalis (NCST) (Sah et al., 2003).

4. Un grupo de núcleos que no entran fácilmente en estas categorías y que incluyen al área anterior de la amígdala (AAA), el área amigdalohipocámpal (AAH) y los núcleos intercalados (Sah et al., 2003).

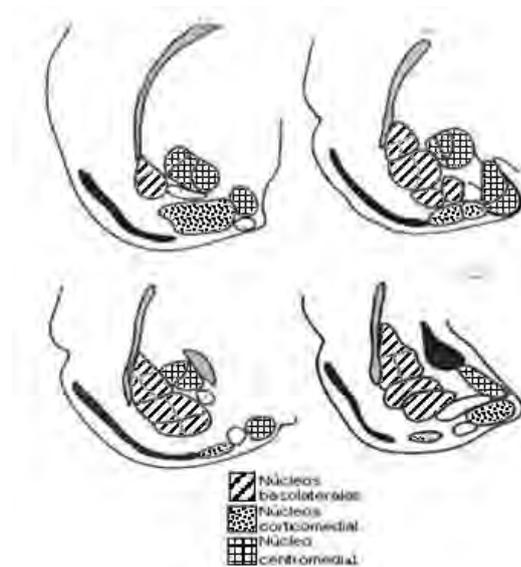


Figura 5. Esquema de cortes coronales donde se observan los diferentes grupos nucleares de la amígdala de rata (modificado de Sah et al., 2003)

1.5.1. CITOARQUITECTURA DE LA AMÍGDALA

La citoarquitectura del grupo basolateral exhibe dos tipos principales de células, neuronas piramidales espinosas y neuronas estrelladas sin espinas (Alheid et al., 1995; McDonald, 1998). Además, existen otros tipos de células

que también han sido descritas en el complejo basolateral, estas son neuronas extendidas, células cono, células chandellier y células de tipo neuroglia (Sah et al., 2003). Al igual que el conjunto basolateral, el grupo corticomediales posee dos tipos principales de células, neuronas piramidales y no piramidales (McDonald, 1998).

Las neuronas principales en las porciones laterales de la ACe se parecen a las neuronas medianas espinosas que se encuentran en el estriado. La mayoría de las neuronas en la AM también espinosas con unas dendritas más largas que las de la ACe, de igual forma las células de la porción amigdalina del NCST son similares a las de la ACe y AM (McDonald, 1998).

En comparación con los núcleos ya citados, existen muy pocos detalles sobre la citoarquitectura de los núcleos amigdalinos faltantes (Sah et al., 2003). Respecto al AAH se ha visto que las células son de tipo cortical, el AAA consiste de una población heterogénea de neuronas (McDonald, 1998), y los núcleos intercalados tienen dos tipos de células, las primeras son ovoidales con espinas con dendritas bipolares largas, el otro tipo son células grandes con dendritas con espinas o sin espinas (Sah et al., 2003).

1.5.2. PROYECCIONES PRINCIPALES A LA AMÍGDALA.

El núcleo AL recibe proyecciones importantes de las áreas corticales sensoriales, incluyendo las cortezas visual, auditiva, somatosensorial y gustativa/visceral. Las proyecciones más importantes del lóbulo frontal se originan en la región infralímbica y dorsal de la CI en su porción agranular. Las proyecciones provenientes del lóbulo temporal medial nacen en las cortezas perirrinal y entorrinal así como la porción ventral del subiculum. Otras proyecciones provienen del genículo medial del tálamo, algunos núcleos hipotalámicos y del rafé dorsal (Pitkänen et al., 2000).

Al núcleo AB le llega información proveniente de la CI, en sus porciones granular y agranular; además tiene entradas provenientes de la corteza perirrinal y de la formación hipocámpica, incluyendo la corteza entorrinal, el subiculum, y CA1; también tiene proyecciones procedentes del núcleo paraventricular del tálamo (Pitkänen et al., 2000).

Las cortezas relacionadas con los sistemas sensoriales proveen de las mayores entradas al ABM, incluyendo la CI agranular, la corteza parietal rinal y la corteza caudal piriforme. También posee proyecciones de las cortezas perirrinal y entorrinal, así como del subiculum. Otras proyecciones se originan en el núcleo paraventricular del tálamo y la región perifornical del hipotálamo (Pitkänen et al., 2000).

En el caso del grupo superficial de la amígdala, el núcleo periamigdalóide es provisto de entradas por parte del CI agranular, la corteza perirrinal y piriforme; además existen proyecciones de la corteza infralímbica y del núcleo de la banda diagonal y el núcleo endopiriforme (Pitkänen et al., 2000).

Las conexiones hacia CoA se originan en la CI agranular y disgranular. Las entradas prefrontales provienen de la corteza infralímbica y la CI agranular. También tiene aferencias del subiculum ventral, del núcleo paraventricular del tálamo y del NPB (Pitkänen et al., 2000).

El CoP recibe entradas de la corteza entorrinal, además de la corteza piriforme, el bulbo accesorio olfatorio y el núcleo endopiriforme (Pitkänen et al., 2000).

El NTOL tiene entradas de la CI agranular, el núcleo de la banda diagonal, del tubérculo olfatorio, del núcleo endopiriforme y del subiculum (Pitkänen et al., 2000).

El complejo centromedial, en particular la ACe recibe aferencias de las cortezas visual, somatosensorial y gustativa/visceral. También recibe proyecciones de la corteza infralímbica y la CI agranular. Las entradas del lóbulo temporal se originan en las cortezas perirrinal, entorrinal y del subiculum. Otras regiones que emiten proyecciones a la ACe son la sustancia innominada, el núcleo paraventricular del tálamo, el núcleo premamilar del hipotálamo, el área hipotalámica lateral, el NPB y el núcleo subcoeruleus (Pitkänen et al., 2000).

Las proyecciones principales hacia la AM tienen su origen en la CI agranular y la corteza infralímbica, también le llegan entradas del subiculum, la corteza endopiriforme y los núcleos hipotalámicos premamilares y

ventromediales. (Pitkänen et al., 2000). Además el NCST recibe aferencias del NPB y de la CI en sus porciones granular y agranular (McDonald, 1998)

Finalmente, el AAH posee entradas que tienen su origen en CA1, el subiculum, los núcleos premamilares y el área hipotalámica lateral (Pitkänen et al., 2000).

Resumiendo se puede decir que la amígdala tiene entradas muy importantes de las cortezas sensoriales, de la CI tanto en su porción visceral como gustativa, y algo que hay que resaltar es la entrada de información por parte de la formación hipocampal, sistema involucrado en el aprendizaje. (McDonald, 1998; Pitkänen et al., 2000; Sah et al., 2003).

1.5.3. PROYECCIONES EFERENTES DE LA AMÍGDALA

Las proyecciones eferentes son bastante amplias e incluyen regiones corticales, hipotalámicas y regiones del tallo cerebral (Sah et al., 2003). Las proyecciones provenientes del grupo basolateral, en particular ABL, tienen llegada a la CI en su porción agranular, también presentan proyecciones a las cortezas entorrinal y perirrinal, así como al parasubiculum, algunas proyecciones se han descrito hacia el núcleo accumbens (NAc). Además la AB provee de entradas a la corteza infralímbica, CA1 y CA3 en el hipocampo, subiculum y parasubiculum, núcleos caudado y putamen, sustancia innominada, NAc y el tubérculo olfatorio. Para finalizar este grupo, la AB tiene aferencias con la corteza infralímbica, las cortezas perirrinal y entorrinal, CA1, subiculum y parasubiculum, los núcleos putamen y caudado, NAc, la sustancia innominada y al núcleo ventromedial del hipotálamo (Pitkänen et al., 2000).

El CoA provee proyecciones a las cortezas infralímbica, peduncular dorsal, insular agranular y tenia tecta. También provee entradas a las cortezas entorrinal piriforme, el tubérculo olfatorio y el núcleo endopiriforme; el CoA también envía información olfatoria y además proyecta hacia la corteza entorrinal, infralímbica, insular agranular y a la región CA1 en el hipocampo. Los núcleos NTOL y NCTAO tienen importantes proyecciones al sistema olfatorio (Pitkänen et al., 2000).

La ACe, parte del grupo centromedial, provee entradas importantes a la sustancia innominada y a la sustancia negra. Además de proyectar de forma importante hacia el NPB, el locus coeruleus, núcleo caudal reticular del puente y al NTS. De igual forma, manda información al núcleo paraventricular del hipotálamo, a las áreas lateral hipotalámica, preóptica y retroquiasmática, así como a la región perifornical y al tuber cinereum (Pitkänen et al., 2000). La activación del la ACe estimula grupos de neuronas en el tallo cerebral que controlan el sistema autónomo, principalmente al NPB, la sustancia gris periacueductal y al NTS (Sah et al., 2003)

La AM proyecta a varios niveles del sistema olfatorio, incluyendo el bulbo olfatorio accesorio, la corteza piriforme y al núcleo endopiriforme. Asimismo envía entradas al septum lateral, la corteza entorrinal y a los núcleos paraventricular, reuniens y mediodorsal del tálamo. Finalmente la amígdala innerva a los núcleos paraventricular, periventricular y las áreas posterior y lateral del hipotálamo, núcleos tuberales, supraóptico, preóptico ventromedial, premamilar y al *tuber cinereum* (Pitkänen et al., 2000). Se ha descrito que el NCST tiene proyecciones importantes hacia grupos monoaminérgicos y colinérgicos. Estos incluyen al locus coeruleus, la sustancia negra, el área ventral tegmental, núcleo del rafé y al núcleo basal magnocelular (Sah et al., 2003)

Los demás núcleos proveen de información a la corteza perirrinal, núcleos premamilares, área preóptica y núcleo ventromedial hipotalámico (Pitkänen et al., 2000).

1.6. AMÍGDALA Y CAS.

Como se mencionó anteriormente, la amígdala recibe aferencias gustativas y viscerales, por lo tanto esta estructura cerebral se ha estudiado desde hace mucho tiempo para determinar su papel en el CAS (Andre y Reilly 2007).

Desde hace más de 30 años, se ha descrito que la amigdalotomía bilateral en la porción medial (Kolb et al., 1977), así como la remoción bilateral de la AL (Fitzgerald y Burton, 1983) ocasiona déficits en el establecimiento del CAS.

Además, existen reportes donde lesiones que abarcan los núcleos AM, ACe, ABL, CoA y ABM, hechas mediante excitotoxicidad⁶, ocasionan un déficit en el establecimiento del CAS (Yamamoto et al., 1995), dicho déficit depende de forma directamente proporcional con la dimensión de la lesión (Yamamoto et al., 1995). Asimismo, existen reportes donde se ha visto que las lesiones hechas por la administración de ácido iboténico⁷ en la ABL (Andre y Reilly 2007; Yamamoto et al., 1995) producen una pérdida del CAS; sin embargo esto no ocurre en lesiones hechas en la ACe (Andre y Reilly 2007), ni en la AM (Yamamoto et al., 1995).

Aparte de las lesiones excitotóxicas, se ha detallado que las ratas con lesiones electrolíticas⁸, que involucran a los tres grupos de núcleos amigdalares (Kesner et al., 1992), conjuntamente a los núcleos ACe, ABL, AM, y ABM, (Schafe y Bernstein, 1996); o únicamente ABL (Aggleton et al, 1981; Borsini y Rolls, 1984; Fitzgerald y Burton, 1983; Rollins et al., 2001) no adquieren CAS. Las lesiones hechas en la porción corticomedia de la amígdala (Aggleton et al., 1981) únicamente en AM o ACe (Rollins et al., 2001) no tienen efecto alguno en el CAS.

Además se ha visto que la inactivación temporal, mediante la inyección intra – amigdalares de tetrodotoxina (TTX)⁹ inmediatamente después de la presentación del EC y no antes, causa la atenuación del CAS (Gallo et al., 1992). Dicha atenuación es dependiente de la dosis administrada de TTX (Roldan y Bures, 1994).

Sin embargo también existe literatura que difiere de los reportes presentados, esta confusión puede ser explicada en términos del tipo de lesión, el tamaño de la lesión, los núcleos lesionados y diversos protocolos utilizados (Reilly y Bornovalova, 2005).

⁶ Excitotoxicidad: Lesión producida por la inyección intracerebral de un amino ácido excitador.

⁷ Ácido iboténico: Compuesto químico procedente de la *Amanita muscaria* utilizado para realizar lesiones; agonista de los receptores NMDA.

⁸ Lesión electrolítica: Lesión producida por el paso de corriente a través de un filamento expuesto.

⁹ Tetrodotoxina: Compuesto obtenido del pez globo que bloquea canales de Na⁺, evitando potenciales de acción

1.6.1. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN EN LA AMÍGDALA Y SU RELACIÓN CON EL CAS.

Las neuronas se comunican unas con otras y al sitio de comunicación entre dos neuronas se le conoce como sinapsis, dicha transmisión sináptica es fundamental para varios procesos cognitivos y conductuales. Las sinapsis se han categorizado en dos grandes grupos: eléctricas y químicas. En las sinapsis eléctricas, la terminal presináptica y la célula postsináptica no están completamente separadas y la corriente generada por un potencial de acción en la neurona presináptica fluye directamente a la neurona postsináptica a través de canales especializados. En las sinapsis químicas, existe una pequeña separación entre las células, donde un cambio en el potencial de membrana en la célula presináptica conlleva a la liberación de un neurotransmisor, el cual se difunde a través del espacio sináptico y se une a las moléculas receptoras de la membrana postsináptica (Kandel y Siegelbaum, 2000).

La sinapsis química es la forma principal en la cual las neuronas se comunican con otras en el sistema nervioso y requiere de los siguientes pasos:

1. La síntesis del neurotransmisor en la terminal presináptica.
 2. El almacenamiento del neurotransmisor en vesículas secretoras.
 3. Liberación regulada del neurotransmisor al espacio sináptico.
 4. Presencia de receptores específicos al neurotransmisor.
 5. Mecanismos para terminar la acción del neurotransmisor
- (Holz y Fisher, 2006).

Una vez liberados, los neurotransmisores se pueden acoplar a receptores que pertenecen a dos familias: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. La familia de receptores ionotrópicos está acoplada directamente con canales iónicos; estos receptores contienen dos dominios funcionales: un dominio extracelular al cual se une el neurotransmisor y otro que atraviesa la membrana, el cual forma un canal iónico (Purves et al., 2008).

Estos canales conducen iones específicos y se abren o se cierran en respuesta a la unión del neurotransmisor con el receptor (Siegelbaum y Koester, 2000).

Por otro lado, la familia de receptores metabotrópicos, es llamada así debido a que los receptores están asociados a procesos metabólicos intracelulares. Estos receptores no tienen canales iónicos como parte de su estructura; en cambio, esta familia de receptores está acoplada a proteínas G. Los receptores metabotrópicos son proteínas con un dominio extracelular al cual se acopla el neurotransmisor y un dominio intracelular que se encuentra unido a la proteína G, la cual se disocia e interactúa directamente con los canales iónicos o de forma indirecta al unirse a otras proteínas efectoras, como las enzimas (Purves et al., 2000).

1.6.1.1. GLUTAMATO

El glutamato (Glu) regula la mayoría de la neurotransmisión excitatoria en el SNC. Alrededor de un 90% de las neuronas cerebrales utilizan al glutamato como su neurotransmisor y aproximadamente del 80% - 90% de las sinapsis son glutamatérgicas (Hassel y Dingledine, 2006)

El Glu es un aminoácido esencial que no cruza la barrera hematoencefálica¹⁰ y por lo tanto debe ser sintetizado en las neuronas a partir de precursores locales (Purves et al., 2008). La formación del Glu forma parte del metabolismo de la glucosa y de los aminoácidos. Asimismo, el Glu se sintetiza a partir de la glutamina, liberada por las células gliales, la cual es recapturada por las neuronas, y una vez dentro, la glutamina se transforma en Glu mediante la glutaminasa. Además, el Glu es un precursor para el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glutamina (Hassel y Dingledine, 2006).

Una sinapsis glutamatérgica clásica es un punto de comunicación entre una terminal presináptica y una espina dendrítica postsináptica o en otra terminal nerviosa; dichas sinapsis son fácilmente reconocibles, ya que la membrana postsináptica parece más gruesa que la membrana presináptica (Hassel y Dingledine, 2006).

¹⁰ Barrera hematoencefálica: barrera semipermeable entre la sangre y el cerebro

Se han identificado tres clases de receptores ionotrópicos de glutamato, el receptor N – metil – D – aspartato (NMDA), el ácido α – amino – 3 – hidroxil – 5 – metil – 4 – isoxazol propiónico (AMPA) y el kainato (Hassel y Dingledine, 2006) (ver Figura 6), estos receptores glutamatérgicos tienen canales catiónicos no selectivos, permitiendo el flujo de Na^+ y K^+ y en algunos casos pequeñas cantidades de Ca^{2+} , sin embargo, los receptores NMDA permiten un mayor flujo de Ca^{2+} que actúa como segundo mensajero. Otra propiedad importante de los receptores NMDA es que el canal se encuentra bloqueado por el ion Mg^{2+} y por lo tanto se requiere que la membrana se despolarice para permitir la salida de este ión, además se necesita que se acople el Glu y un coagonista, la glicina, para la apertura del canal (Purves et al., 2008).

Asimismo, se han descrito ocho receptores metabotrópicos, llamados mGluR1 – mGluR8, los cuales han sido agrupados en tres clases funcionales considerando los mecanismos de transducción (Hassel y Dingledine, 2006); el grupo I (mGlu1 y 5) incrementa inositol trifosfato y diacilglicerol; grupo II (mGlu2 y 3) y grupo III (mGlu4, 6, 7 y 8) modulan AMPc.

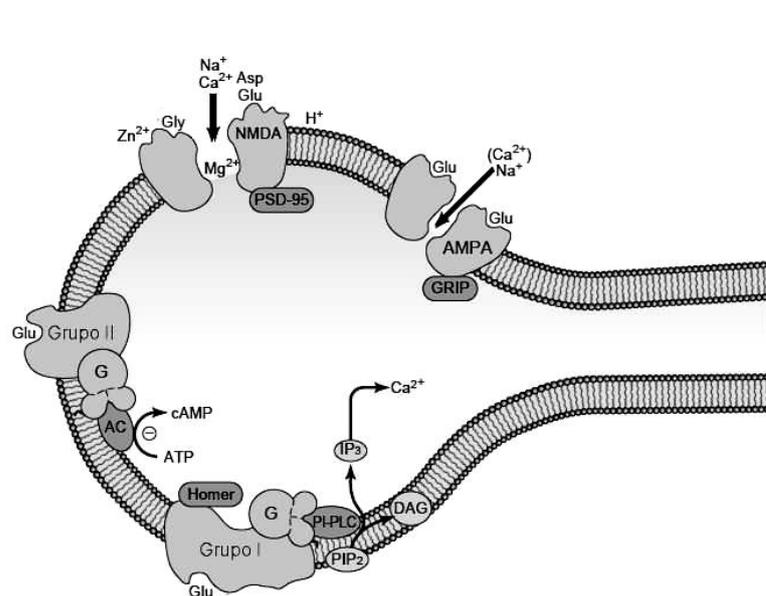


Figura 6. Representación esquemática de los receptores de Glu. Se muestran dos receptores ionotrópicos, NMDA y AMPA; así como los receptores metabotrópicos del grupo I y II. Glicina (Gly); aspartato (Asp); proteína G (G); adenilato ciclasa (AC); adenosin trifosfato (ATP); adenosin monofosfato cíclico (cAMP) Fosfolipasa C (PI-PLC); fosfatidil-inositol bifosfato (PIP_2); Diacil-glicerol (DAG); Inositol trifosfato (IP_3); proteína de interacción con el receptor a glutamato (GRIP) (Modificado de Hassel y Dingledine, 2006).

Se ha demostrado que las neuronas glutamatérgicas de la ABL participan en el CAS, ya que la inyección de antagonistas de los receptores NMDA,

inmediatamente después del EC, como MK-801¹¹(Tucci et al., 1998), o D – APV¹² (Yasoshima et al., 2000), logra una atenuación del CAS. Asimismo la inyección en ABL, posterior a la presentación del EC, de un antagonista de los receptores AMPA (CNQX¹³) (Yasoshima et al., 2000), ocasiona un déficit en el CAS, mientras que la inyección de Glu en el mismo núcleo, después de la ingestión del EC, induce al rechazo del sabor (Tucci et al., 1998) y mejora el CAS cuando la intensidad del estímulo visceral es baja (Miranda et al., 2002; Ferreira et al., 2005).

También se ha reconocido el papel de los mGluR de la amígdala en el CAS. Masugi y cols. (1999) observaron que ratones knock – out¹⁴ de mGluR7 son incapaces de asociar el sabor con el malestar gástrico, además la inyección en la ABL de un antagonista de los mGluR, (S) - MCPG¹⁵, posterior a la ingestión del estímulo gustativo, atenúa el CAS (Yasoshima et al., 2000). Sin embargo, si se inyecta un antagonista a mGluR5, MTEP¹⁶, 20 minutos antes de la presentación del EC en la ABL, no se presenta ningún déficit en el CAS (Simonyi et al., 2009)

De acuerdo a los datos presentados, se ha sugerido que la señalización glutamatérgica en la amígdala no juega un papel importante en el proceso inicial del señalamiento gustativo, pero parece ser indispensable para procesar el estímulo visceral. Esto se demostró mediante la técnica de microdiálisis en libre movimiento, en la cual se observó que durante la presentación del estímulo gustativo no existe un aumento en la liberación glutamatérgica en la amígdala; sin embargo existe un aumento considerable de Glu ante la presentación del estímulo visceral y este aumento depende de la intensidad del estímulo (Miranda et al., 2002).

¹¹ MK – 801: Dizocilpina, antagonista no competitivo de los receptores NMDA

¹² D-APV: 2 – amino – 5- fosfonopentanoato; fármaco competitivo que bloquea los receptores NMDA

¹³ CNQX: 6 – ciano – 7 – nitro – quinoxalina – 2, 3 – diona; antagonista de los receptores AMPA/kainato.

¹⁴ Knock out: Técnica utilizada para bloquear la expresión de un gen.

¹⁵ (S) –MCPG: (S) – α – metil – 4 – carboxyfenilglicina; antagonista no selectivo de los mGluR grupos I/II

¹⁶ MTEP: 3 – ((2 – metil – 1, 3 – tiazol – 4 – il) etinil) piridina) hidrócloro; antagonista no competitivo de mGlu5

1.6.1.2. GABA

El ácido γ -aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso. Se sabe que un tercio de las sinapsis en el cerebro usa GABA como su neurotransmisor inhibitorio; y se encuentra frecuentemente en interneuronas (Purves et al., 2008).

Como se mencionó en la sección anterior, el Glu es precursor de la síntesis de GABA, esto se lleva a cabo por la acción de la descarboxilasa de ácido glutámico y su metabolismo se debe a la GABA – transaminasa obteniendo como residuo succinato (Olsen y Betz, 2006).

Las sinapsis inhibitorias que utilizan GABA como su transmisor pueden exhibir tres tipos de receptores postsinápticos, llamados GABA_A, GABA_B y GABA_C; los GABA_A y GABA_C son receptores ionotrópicos, mientras los GABA_B son metabotrópicos (Purves et al., 2008).

La unión de GABA con los receptores GABA_A y GABA_C abre un canal de Cl⁻ acoplado al receptor ocasionando una hiperpolarización, dificultando así, el potencial de acción. Por otro lado los receptores GABA_B pueden mediar la inhibición presináptica y postsináptica a través de varios sistemas efectores, algunos permiten la activación de canales de K⁺, otros regulan la producción de segundos mensajeros. (Olsen y Betz, 2006). Finalmente, los receptores metabotrópicos GABA_B incrementan AMPc y estimulan la apertura de canales de K⁺ (verFigura 7).

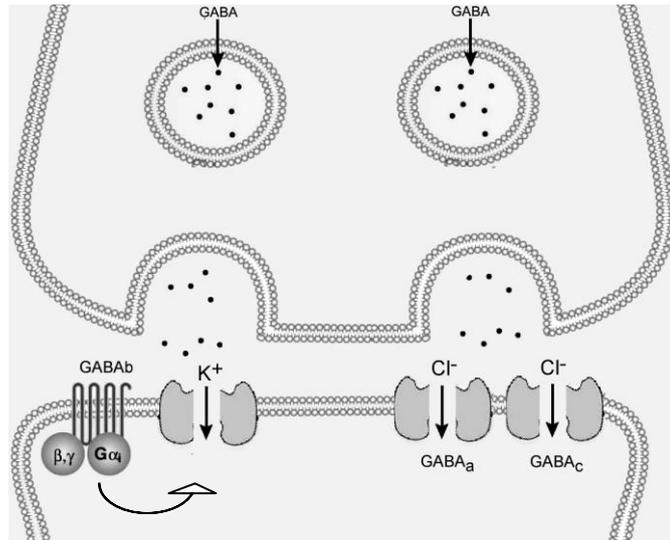


Figura 7. Esquema de los receptores GABAérgicos. Se muestra el receptor metabotrópico GABAb y los dos receptores ionotrópicos. GABA_a y GABA_c (Modificado de Cell Signaling, 2009).

No existen trabajos donde se ha estudiado la participación del sistema GABAérgico en la amígdala durante la adquisición del CAS.

1.6.1.3. CATECOLAMINAS: DOPAMINA Y NORADRENALINA.

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que pertenece al grupo de las aminas biogénicas, las cuales regulan varias funciones cerebrales y que también se encuentran presentes en el sistema nervioso periférico. En particular, la dopamina se ha visto involucrada en procesos motivacionales, coordinación motora, recompensa y reforzamiento (Purves et al., 2008).

La síntesis de DA se da a partir del aminoácido tirosina, la tirosina hidroxilasa la convierte en 3,4 – dihidroxi – l – fenilalanina, a su vez transformada en DA mediante la enzima DOPA descarboxilasa. Finalmente la DA se degrada mediante las enzimas monoaminoxidasa y la catecol – O – metiltransferasa (Kuhar et al., 2006).

Existen 5 subtipos de receptores dopaminérgicos, estos receptores se encuentran principalmente en el cerebro, aunque también se han descrito en el músculo liso y glándulas suprarrenales. Estos receptores son metabotrópicos y se han dividido en dos grupos de acuerdo a su tipo de señalización, los tipo D₁ incluyen a los receptores D₁ y D₅, los cuales, incrementan AMPc y la activación

de la PKA mediante la estimulación de AC; y los tipo D₂ que incluyen a D₂, D₃ y D₄, e inhiben a la AC (Kuhar et al., 2006). (Figura 8; pp. 32.)

En general, se ha encontrado que los cuerpos celulares que contienen a la DA están agrupados y los axones de estas células proyectan a varias áreas, las cuales, se cree que tienen diferentes efectos dentro del sistema nervioso central (Kuhar et al., 2006). Se han descrito cuatro sistemas dopaminérgicos principales en el cerebro:

- a) El sistema nigro – estriado, donde los cuerpos celulares se encuentran localizados en la sustancia negra y sus axones proyectan hacia los núcleos caudado y putamen.
- b) El sistema mesolímbico se origina en el área tegmental ventral y envía sus axones hacia el núcleo NAc, la amígdala e hipocampo
- c) El sistema mesocortical, también se origina en el área tegmental ventral y envía sus axones hacia la corteza prefrontal.
- d) El sistema tuberoinfundibular, con fibras relativamente cortas que nacen en el hipotálamo y terminan en la hipófisis y la eminencia media (Brailowsky, 1998).

La noradrenalina (NA), también llamada norepinefrina, es un neurotransmisor involucrado en el sueño, atención, ingesta de alimentos y la memoria (Purves et al., 2008).

La síntesis de NA se da a partir de DA, donde la dopamina β – hidroxilasa la transforma en NA (Kuhar et al., 2006). Al igual que la dopamina, la NA es degradada por las enzimas monoamino oxidasa y la catecol – O – metiltransferasa (Purves et al., 2008).

Los receptores noradrenérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos periféricos así como en altas concentraciones en el cerebro. Actualmente se han descrito 9 receptores metabotrópicos adrenérgicos, y se han subclasificado en 3 familias, α₁, α₂ y β, esto basado en sus propiedades farmacológicas, secuencias de aminoácidos y mecanismos de señalización (Kuhar et al., 2006).

Los receptores α_1 - adrenérgicos incrementan la actividad de la fosfolipasa C y liberan diacilglicerol e inositol trifosfato; los receptores α_2 - adrenérgicos inhiben AC, llevando a una disminución en AMPc; finalmente los receptores β - adrenérgicos incrementan la actividad de AC (Kuhar et al., 2006).

Figura 8.

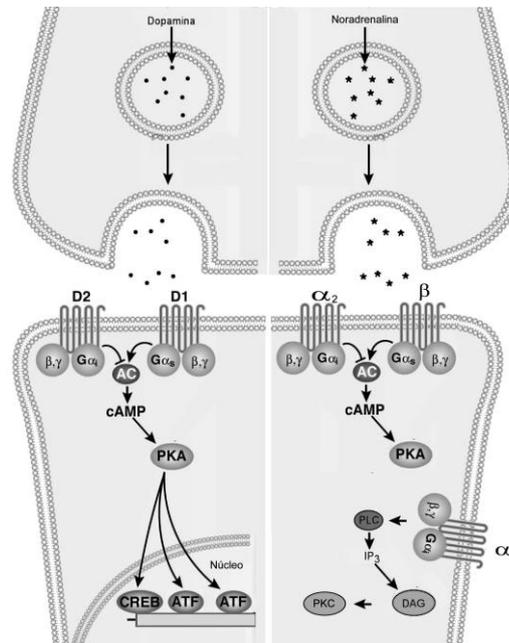


Figura 8. Esquema de los receptores a catecolaminas. Izquierda: Familia de receptores dopaminérgicos D1 y D2; adenilato ciclasa (AC); adenosin monofosfato cíclico (cAMP); proteína cinasa A (PKA); factor de transcripción dependiente de cAMP (CREB); factores de transcripción (ATF). Derecha: Receptores adrenérgicos; fosfolipasa C (PLC); Inositol trifosfato (IP₃); diacil-glicerol (DAG); proteína cinasa C (PKC) (Modificado de Cell Signaling, 2009)

En el SNC, se ha podido determinar la distribución de proyecciones y cuerpos celulares con contenido noradrenérgico. Seis grupos de neuronas están agrupadas en la médula oblongada, puente y mesencéfalo (Kuhar et al., 2006). Las principales proyecciones noradrenérgicas nacen de dos sitios principales del tallo cerebral: el locus coeruleus y al área tegmental lateral (Brailowsky, 1998).

Se ha visto que la lesión selectiva de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas en la ABL, mediante la inyección de 6 – OHDA¹⁷, atenúa el CAS (Borsini y Rolls, 1984), sin embargo, también existen datos donde no existe efecto sobre la adquisición del mismo (Fernández – Ruiz et al., 1993)

¹⁷ 6 – OHDA: 6 – hidroxidopamina; toxina selectiva a neuronas catecolaminérgicas.

Inyecciones de NA, abarcando varios núcleos de la amígdala, inmediatamente después de la inyección intraperitoneal de apomorfina¹⁸ utilizada como EI, no ocasiona ningún déficit en el CAS (Ellis y Kesner, 1981).

Además, se describió que el bloqueo de los receptores β – adrenérgicos en la ABL, 30 minutos después del EC y justo antes del EI mediante la infusión de propranolol¹⁹, afecta la adquisición del CAS (Miranda et al., 2003). No obstante, el bloqueo de los β – adrenérgicos antes del EC no tiene efecto alguno sobre el CAS (Miranda et al., 2008).

Los datos presentados anteriormente se han obtenido a partir de la manipulación farmacológica durante el periodo de adquisición, sin embargo, se ha sugerido que durante el periodo de tiempo requerido para la consolidación de la memoria existe una reactivación del trazo mnémico, donde los patrones de actividad neuronal expresados a partir de la experiencia deben ser reactivados espontáneamente durante periodos subsecuentes de inactividad conductual (Hoffman y McNaughton, 2002).

1.7. LA REACTIVACIÓN OFFLINE²⁰ PARTICIPA EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA.

Se ha observado un incremento en la actividad de las células hipocampales, mientras el organismo duerme, después de que éste se encontraba explorando un ambiente (Wilson y McNaughton, 1994). Además, los patrones de actividad neuronal reflejan el orden en el cual las células se fueron activando mientras el animal exploraba (Skaggs y McNaughton, 1996).

Dentro de las evidencias que apoyan la reactivación de los trazos de memoria como parte del proceso de consolidación se encuentran aquellas que evalúan patrones de actividad cerebral post - adquisición durante el sueño (Stickgold, 2005; Gais y Born, 2004; Rasch y Born, 2007). El sueño se encuentra dividido en sueño de ondas lentas²¹ y sueño de movimientos

¹⁸ Apomorfina: Agonista dopaminérgico y que inyectado intraperitonealmente ocasiona malestar gástrico

¹⁹ Propranolol: Antagonista β -adrenérgico.

²⁰ Offline: activación neuronal espontánea producida sin estimulación del ambiente externo.

²¹ Sueño de ondas lentas: Sueño caracterizado por actividad cerebral sincronizada la cual ocurre en las etapas más profundas del sueño.

oculares rápidos²² (Stickgold, 2005), dichas etapas intervienen de forma distinta en la consolidación. Durante el sueño de ondas lentas se ha visto la reactivación del trazo mnémico y durante el sueño de movimientos oculares rápidos existen eventos transcripcionales y cambios estructurales en la sinapsis (Ribeiro y Nicolelis, 2004).

Sin embargo, la reactivación neuronal no se restringe únicamente al sueño y se ha descrito que existe una reactivación de forma secuencial en la neocorteza de primates muy parecida a la que se vio mientras el primate ejecutaba una tarea; dicha reactivación fue observada en los períodos de descanso entre ensayos (Hoffman y McNaughton, 2002). Además, se ha reportado que los animales que fueron expuestos a un laberinto muestran una reactivación de las células hipocampales, esta reactivación fue vista en animales despiertos que fueron colocados en el mismo ambiente o diferentes ambientes (Karlson y Frank, 2009). En humanos despiertos también se ha observado, mediante resonancia magnética funcional, que existe la reactivación de zonas cerebrales particulares a la tarea aprendida (Peigneux et al., 2006).

Otra forma de estudiar la reactivación offline es mediante la observación de los sistemas de neurotransmisión. En animales entrenados en la discriminación de olores, se ha registrado un aumento en la liberación de NA en la corteza prelímbica dos horas después a la adquisición de la tarea. Dicho aumento está relacionado con la consolidación de la memoria, ya que si se bloquean los receptores β - adrenérgicos, dos horas después de la adquisición, los animales tienen un mal desempeño en la discriminación (Tronel et al., 2004).

En la amígdala no se ha observado directamente la reactivación offline, no obstante, se ha visto que la amígdala presenta actividad theta y varios tipos de oscilaciones durante el sueño (Paré et al., 2002). La actividad theta se ha descrito en el hipocampo y está altamente correlacionada con el sueño de movimientos oculares rápidos y el aprendizaje (Carlson, 2007).

²² Sueño de movimientos oculares rápidos. Periodo de actividad cerebral desincronizada durante el sueño, caracterizada por movimientos oculares rápidos y parálisis muscular.

En cuanto al CAS, se ha visto que la inyección de TTX en la ABL 15 minutos y hasta hora y media después del pareamiento entre el estímulo visceral y gustativo, ocasiona un déficit de la tarea, el cual es inversamente proporcional al intervalo de tiempo entre la adquisición y la inyección intraamigdalár (Roldan y Bures, 1994). Existen varios datos que fortalecen la idea de que existe una reactivación del sistema glutamatérgico, por ejemplo, se ha observado que el bloqueo de los receptores NMDA en la CI, 30, 60 y hasta 120 min después del pareamiento, tiene como efecto una atenuación del CAS (Gutiérrez et al., 1999). Otro dato interesante es el reportado por Cui y cols., (2005) quienes eliminaron la expresión de la subunidad NR1 de los receptores NMDA en ratones después de la adquisición del CAS, los cuales mostraron un déficit en la retención de la tarea. Particularmente se ha visto que existe un aumento en la liberación de Glu y de DA en la CI alrededor de 44 minutos después de la adquisición del CAS (Guzmán – Ramos y Bermúdez – Rattoni, 2007); dicha actividad glutamatérgica es necesaria para la consolidación del CAS (Guzmán – Ramos et al., 2008).

A pesar de que los datos de reactivación offline en la tarea del CAS fueron obtenidos de la CI, algunos estudios sugieren que la reactivación offline pudiera relacionarse con la amígdala, ya que existen datos que muestran el establecimiento de la LTP en la CI después de la estimulación de la ABL (Escobar et al., 1997), dicha LTP puede ser bloqueada mediante la infusión de antagonistas de los receptores NMDA en la CI (Escobar et al., 1998). Además se ha reportado que la inyección de Glu en la ABL antes de la presentación del EI mejora el establecimiento del CAS, sin embargo, la inyección de APV en la CI inhibe el efecto del Glu (Ferreira et al., 2005). Por otra parte, la inducción de la LTP en la vía ABL - CI previa al CAS, mejora la retención de la tarea (Escobar y Bermúdez – Rattoni, 2000).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conforme a los datos presentados con anterioridad, la amígdala es una estructura cerebral donde convergen aferencias gustativas y viscerales y por lo tanto involucrada en el establecimiento del CAS. Sin embargo, la información que existe sobre la participación de los sistemas de neurotransmisión en esta

estructura durante la codificación de los estímulos en el CAS es escasa, ya que sólo se ha podido inferir su participación a partir del bloqueo farmacológico de algunos receptores.

Hasta ahora el neurotransmisor más estudiado en la amígdala durante el CAS ha sido el Glu, este sistema de neurotransmisión participa en la codificación del EI lo cual se confirmó al observar un aumento en la liberación de Glu en la amígdala ante el EI. Sin embargo el análisis de las muestras en este estudio se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia, (HPLC por sus siglas en inglés), la cual requiere de grandes volúmenes de muestra limitando la resolución temporal. También se ha inferido que la NA participa en la codificación del EI, por lo tanto es necesario dilucidar cómo el Glu y la NA se relacionan para señalar el EI en la amígdala.

A pesar de que la amígdala recibe aferencias gustativas, no se ha podido observar, mediante el bloqueo de diversos receptores, que la amígdala codifique el estímulo gustativo novedoso para la adquisición del CAS. Además existen pocos datos sobre la participación del sistema GABAérgico y dopaminérgico en la adquisición de esta tarea.

Asimismo, la reactivación offline parece estar involucrada en la consolidación de la memoria, pese a esto, la reactivación en la amígdala sólo ha sido observada mediante la liberación de NA dos horas después de la adquisición de una tarea de discriminación de olores. Sin embargo, existen datos que sugieren que la amígdala participa en la reactivación que se ha observado en la CI. Hasta el momento, se desconoce qué sistemas de neurotransmisión están involucrados durante la reactivación y su papel en la consolidación de la memoria aversiva al sabor.

4. OBJETIVO GENERAL.

Analizar los cambios en la liberación de glutamato, noradrenalina, dopamina y GABA durante la adquisición y post – adquisición del CAS dentro de la amígdala y estudiar la funcionalidad de estos cambios en la consolidación del CAS.

5. EXPERIMENTO 1.

Objetivo particular:

1. Monitorear a través de microdiálisis en libre movimiento la respuesta de liberación del sistema glutamatérgico, noradrenérgico, dopaminérgico y GABAérgico, ante la presentación del estímulo condicionado y el estímulo incondicionado durante la adquisición del CAS.
2. Monitorear a través de microdiálisis en libre movimiento la respuesta de liberación del sistema glutamatérgico, noradrenérgico, dopaminérgico y GABAérgico, durante la post – adquisición del CAS

Hipótesis:

- No existen cambios en la liberación de glutamato y/o noradrenalina en la amígdala ante la presentación del estímulo condicionado.
- Existe un cambio en la liberación de glutamato en la amígdala ante la presentación del estímulo incondicionado.
- Existe un cambio en la liberación de noradrenalina en la amígdala ante la presentación del estímulo incondicionado.
- Existe un cambio de glutamato en la amígdala durante el período de post – adquisición como posible sistema de reactivación offline.

5.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTO 1.

5.1.1. ANIMALES.

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., con un peso entre 260 – 300 gramos al momento de la cirugía. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y ciclo luz – oscuridad de 12/12. Todas las manipulaciones y procedimientos experimentales se realizaron en la fase de luz. Los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*, excepto cuando se indique lo contrario.

5.1.2. IMPLANTACIÓN UNILATERAL DE CÁNULA GUÍA EXPERIMENTO 1.

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina a una dosis de 84 mg/kg (Anesket, PiSA agropecuaria, México) y xilacina (Procin, PiSA agropecuaria, México) a una dosis de 0.4 mg/kg. Ya bajo anestesia, se les implantó una cánula guía (CMA, Suecia) en la amígdala de acuerdo a procedimientos estereotáxicos convencionales (AP = -2.8, L= -4.8, y DV= -7.5, con respecto a Bregma) (Paxinos y Watson, 1998), la cual fue fijada mediante un soporte de dos tornillos y cemento dental acrílico. Para evitar posibles infecciones, se aplicó una mezcla de antibiótico, antimicótico y yodo. El tiempo de recuperación postquirúrgico fue de cinco días.

5.1.3. MICRODIÁLISIS²⁴

Pasada la recuperación quirúrgica, los animales fueron habituados a la cámara de microdiálisis (Bioanalytical System Inc., E.U.A.) durante 5 días por un período de hora y media al día.

El día de la adquisición del CAS se conectó la sonda de microdiálisis, con una membrana de 1mm de largo, (CMA, Suecia) al sistema de microinfusión (CMA, Suecia) el cual, perfundió solución Ringer (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 19 mM, Glucosa 3.3 mM) a una velocidad de 0.8µL/min. Una vez que la sonda fue insertada a la cánula guía, los primeros 60 minutos de dializado fueron descartados, y después las muestras fueron recolectadas cada 5 minutos (4.5 µL/muestra) en tubos eppendorf de 200 µL que contenían 0.5 µL de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25 mM, Na₂EDTA 0.27 mM, ácido acético 0.1 M). Las primeras tres muestras fueron utilizadas como línea basal y a partir de la cuarta se comenzó la exposición de los estímulos para la adquisición del CAS. El monitoreo duró 1 hora con 45 minutos (21 muestras).

²⁴ Microdiálisis: Técnica utilizada para recolectar sustancias químicas del fluido extracelular; el principio de la microdiálisis se basa en la difusión.

Las muestras fueron congeladas inmediatamente para ser analizadas posteriormente por electroforesis capilar micelar (MECK por sus siglas en inglés).

5.1.4. PROTOCOLO CONDUCTUAL EXPERIMENTO 1.

Los animales fueron privados de agua por 24 horas a partir del sexto día de la implantación de cánula. Durante los siguientes 5 días, mientras se habituaban en la cámara de microdiálisis, se les proporcionó 10 mL de agua durante 15 minutos, a través de una probeta graduada y un tapón de corcho horadado con una boquilla metálica que funcionó como bebedero. Al finalizar la habituación, se les dio un segundo consumo de 20 mL de agua por la tarde para evitar la deshidratación.

El día de la adquisición se les suministró los siguientes estímulos dependiendo del grupo:

- Sacarina – LiCl, 10 mL de sacarina 0.1% (Sigma – Aldrich, MO) y pasados 15 minutos se inyectó i.p. LiCl 0.4M (Baker, NJ) en una dosis de 7.5 mL/kg (SAC/LiCl, n=6).
- Sacarina – NaCl, 10 mL de sacarina 0.1% y pasados 15 minutos se inyectó i.p. NaCl 0.4M en una dosis de 7.5 mL/kg (Baker, NJ) (SAC/NaCl, n=6).
- Condicionamiento retrógrado, se inyectó i.p. LiCl 0.4M, dosis 7.5 mL/kg y pasados 15 minutos se proporcionó 10 mL de sacarina 0.1% (Retrógrado, n=6).

Durante los dos siguientes días al condicionamiento se les proporcionó 30 mL de agua por día.

La prueba se realizó 72 horas después del condicionamiento, con la presentación de 30 mL de sacarina 0.1% durante 15 minutos dentro de la cámara de microdiálisis y se registró el consumo.

La sacarina fue utilizada como sabor novedoso (EC) y el LiCl como inductor de malestar gástrico (EI); además se ha visto que la inyección i.p. de NaCl no funciona como EI.

5.1.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS

El análisis se realizó mediante electroforesis capilar micelar por detección de fluorescencia inducida por láser, para lo cual se requería de un proceso de derivatización.

5.1.6. DERIVATIZACIÓN²⁵.

El procedimiento de derivatización consistió en lo siguiente: se secaron al vacío alícuotas de 10 μL de FQ²⁶ ((3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído, Molecular Probes Invitrogen, E.U.A.) 10 mM. Una vez secas, se agregaron 2 μL de KCN 25 mM, 4.5 μL de la muestra y 1 μL de estándar interno²⁷ (O-metil-L-treonina 7.5 mM), la mezcla se hizo reaccionar en la oscuridad por 15 min a 65 °C en un baño termostatzado.

5.1.7. MECK²⁸.

El amortiguador de corrida empleado para la separación de los neurotransmisores de interés contenía boratos 35 mM, duodecil sulfato de sodio (SDS) 25 mM, β -ciclodextrinas 5 mM 17% de metanol grado HPLC, pH final 9.6. La inyección fue hecha hidrodinamicamente aplicando 0.5 psi de presión durante 5 s en el contenedor de la muestra para llenar una porción del capilar (sílica fundida, 75 μm de diámetro interno y 50 cm de largo) y la separación se hizo aplicando 25 kV. Para la detección de los compuestos se empleó detección de fluorescencia inducida por láser con un láser de ionización de argón con luz a 488 nm (Beckman Coulter P/ACE MDQ Glycoprotein system).

Cada neurotransmisor fue identificado en el electroferograma comparando el patrón de migración con otro electroferograma, donde cada neurotransmisor se encontraba resaltado, para su identificación; los picos obtenidos fueron corregidos relacionando el área bajo la curva de la muestra con el área bajo la

²⁵ Derivatización: Modificación de los analitos que permite la unión de un grupo fluorescente la cual incrementa la selectividad de detección y su sensibilidad.

²⁶ FQ: Grupo fluorescente que reaccione específicamente con aminas primarias y que forma conjugados que pueden ser analizados por métodos electroforéticos. El FQ se excita a 480nm.

²⁷ Estándar interno: Aminoácido no presente en la recolección de la muestra pero que fue añadido con fines de referencia.

²⁸ MECK: técnica analítica instrumental de separación la cual permite la identificación y cuantificación de los analitos; la separación es mediante el uso de micelas en un amortiguador de separación.

curva del estándar interno. Los datos fueron analizados mediante el software Karat System Gold. Todos los resultados se obtienen en concentración del analito y se convirtieron en porcentaje de línea basal de liberación (%LB= concentración*100/media de las tres primeras muestras).

5.1.8. HISTOLOGÍA EXPERIMENTO 1.

Para comprobar la correcta implantación de la cánula se realizó el siguiente análisis histológico: Un día después de la prueba conductual, los animales fueron inyectados i.p. con una sobredosis de pentobarbital sódico, y perfundidos transcardialmente con una solución salina 0.9%. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en una solución de paraformaldehído 4% en buffer fosfatos (0.15M, pH7.5). Los cerebros se dejaron en paraformaldehído durante un periodo de 24 horas y después fueron colocados en sacarosa al 10, 20, o 30% (24 horas por cada concentración).

Se hicieron cortes coronales de 40µm de grosor alrededor de la cánula y se tiñeron con violeta de cresilo. Los cortes fueron examinados microscópicamente para determinar la localización de la cánula.

5.1.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIMENTO 1.

Se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* de Fisher para analizar los cambios en el porcentaje de liberación con respecto al grupo y al tiempo. Un valor de $p < 0.05$ y un aumento por arriba del 150% fue considerado como estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron hechos con Statview v4.57 (Abacus Concepts Inc., E.U.A.)

Para analizar las diferencias en el consumo de sacarina 0.1% durante el día de la prueba entre los diferentes grupos, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, teniendo una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa

6. RESULTADOS EXPERIMENTO 1.

6.1. HISTOLOGÍA EXPERIMENTO 1.

Después del análisis histológico se descartaron los datos de 3 ratas de un análisis posterior debido a la incorrecta implantación de la cánula, los grupos

quedaron de la siguiente forma: SAC/LiCl, n=6; SAC/NaCl, n=5; Retrógrado, n=4. La figura 9 muestra un corte coronal donde se observa la ubicación de la cánula guía.

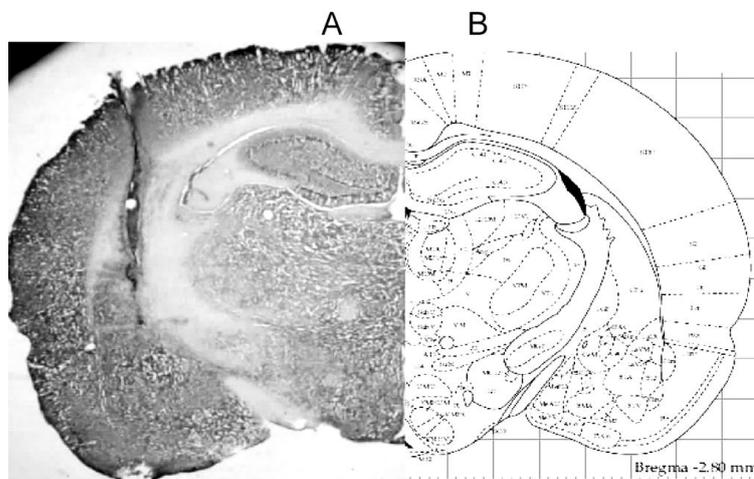


Figura 9. A) Corte coronal que muestra la ubicación de la cánula guía en la amígdala, el tejido fue teñido con violeta de cresilo. B) Esquema representativo de la ubicación de la amígdala tomado del atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 1998)

6.2. LIBERACIÓN DE GLUTAMATO DURANTE LA ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN.

Los resultados indicaron que existe una diferencia significativa en la liberación de Glu entre los grupos ($F_{(2,266)}=9.701$, $p<0.0001$) y entre el tiempo de monitoreo ($F_{(18,264)}=2.771$, $p=0.0002$). En el análisis *post hoc* se observó que existen diferencias en la concentración extracelular de Glu entre los grupos SAC/NaCl y SAC/LiCl ($p<0.0001$) y entre el Retrógrado y SAC/NaCl ($p=0.005$), pero no así entre el SAC/LiCl y el Retrógrado. Además, el análisis permitió diferenciar los tiempos en que existían cambios en la concentración de Glu en la amígdala durante el monitoreo ante la presentación de los estímulos: para el grupo SAC/NaCl no se observaron cambios significativos con respecto a la línea basal; el grupo SAC/LiCl muestra cambios significativos en la liberación de Glu durante el monitoreo con respecto a línea basal ($F_{(18,89)}=3.255$, $p=0.0001$). El análisis *post hoc* demostró que los cambios fueron a los 45 minutos del monitoreo ante la inyección i.p de LiCl 0.4M ($p<0.0001$) y 40 minutos después de la asociación EC-EI ($p=0.0004$). En el grupo Retrógrado también se observan cambios significativos en la liberación de Glu durante el

monitoreo ($F_{(18,86)}=0.0006$), el cambio se registró a los 20 minutos del monitoreo ante la inyección i.p. de LiCl 0.4M ($p<0.0001$).

Anteriormente se mencionó que existen diferencias en la liberación de Glu durante el monitoreo, estas diferencias son dependientes del grupo ($F_{(36,266)}=2.469$, $p<0.0001$). Cabe recordar que se obtuvieron los tiempos donde se observaron cambios en la liberación para cada grupo y se compararon contra los demás grupos, los tiempos analizados del monitoreo fueron 20, 45 y 85 minutos.

Existen diferencias en la liberación de Glu a los 20 minutos del monitoreo entre los grupos ($F_{(2,14)}=5.501$, $p=0.0173$), en el análisis *post hoc* se observó que no existen diferencias entre el grupo SAC/NaCl y SAC/LiCl pero existen diferencias entre SAC/NaCl y Retrórgrado ($p=0.0141$) y entre SAC/LiCl y Retrórgrado ($p=0.0118$). Al minuto 45 existen diferencias significativas en la liberación de Glu entre los grupos ($F_{(2,14)}=5.438$, $p=0.0179$), en el análisis *post hoc* se observó que no existen diferencias entre el grupo SAC/NaCl y Retrórgrado pero existen diferencias entre SAC/NaCl y SAC/LiCl ($p=0.0081$) y entre SAC/LiCl y Retrórgrado ($p=0.0186$). En el minuto 85 se registró una diferencia en la liberación de Glu entre los grupos, sin embargo ésta diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa ($F_{(2,13)}=3.551$, $p=0.0546$), no obstante se realizó el análisis *post hoc* y se observó que existe una diferencia significativa entre SAC/NaCl y SAC/LiCl ($p=0.0299$) y entre SAC/LiCl y Retrórgrado ($p=0.0435$) pero no existe diferencias entre SAC/NaCl y Retrórgrado.

Por lo tanto, no existe un aumento en la liberación extracelular de Glu ante la presentación del EC, sin embargo existen aumentos de Glu extracelular ante la inyección i.p de LiCl 0.4M; y 40 minutos después del pareamiento únicamente en el grupo condicionado Sac/LiCl (ver Figura 10).

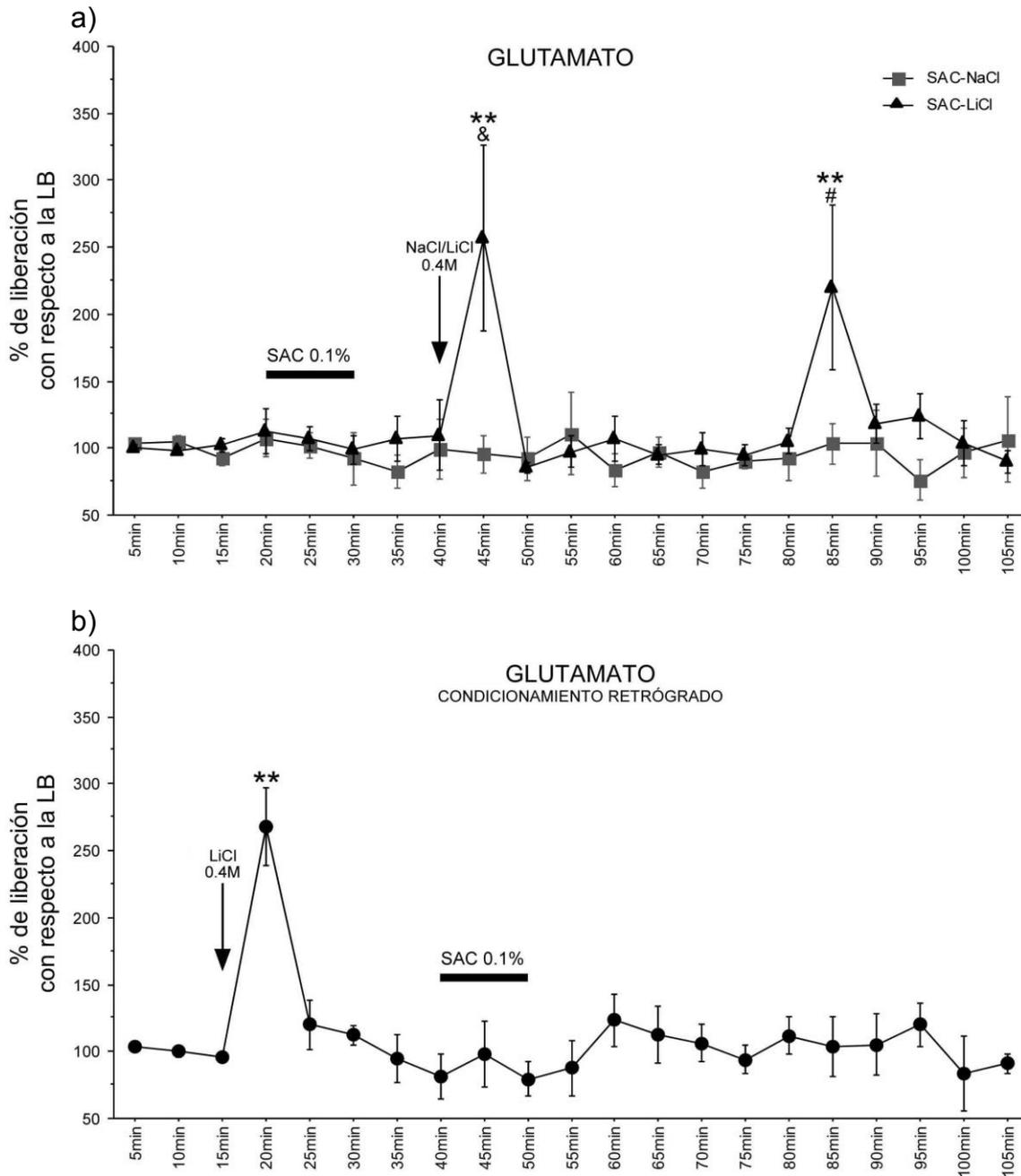


Figura 10. Cinética de liberación que muestra los cambios en porcentaje de glutamato extracelular ante la presentación del EC (Sacarina 0.1%) y del EI (NaCl 0.4M ó LiCl 0.4M). a) Sac/LiCl (n=6), Sac/NaCl (n=5) y b) condicionamiento retrógrado (n=4). La presentación del EC no aumenta el glutamato extracelular con respecto a la LB y se observa un incremento en la liberación de glutamato ante la presentación de LiCl como EI. Además en el grupo Sac/LiCl se observa un aumento de glutamato extracelular pasados 40 minutos después de la adquisición. Los datos se presentan como porcentaje de LB \pm error estándar. La barra negra indica el tiempo de exposición al EC y la flecha el momento de la inyección del EI. ** $p < 0.01$ con respecto a LB, & $p < 0.01$ entre grupos y # $p < 0.05$ entre grupos.

6.3. LIBERACIÓN DE NORADRENALINA DURANTE LA ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN.

Se registran cambios estadísticamente significativos en la liberación de NA en la amígdala entre los diferentes grupos ($F_{(2,262)}=4.718$, $p=0.0097$). El

análisis *post hoc* indicó que existen diferencias en el porcentaje extracelular de NA entre el grupo SAC/NaCl y SAC/LiCl ($p=0.0214$) y entre el grupo SAC/LiCl y Retrógrado ($p=0.0057$), pero no existen diferencias entre SAC/NaCl y Retrógrado. Además, durante el monitoreo se observan cambios en la liberación de NA en la amígdala con respecto a la línea base ($F_{(18,262)}=3.544$, $p<0.0001$). En el grupo SAC/NaCl se observan cambios durante el monitoreo ($F_{(18,91)}=2.084$, $p=0.0124$) y se registraron a los 45 ($p=0.0009$) y 50 ($p=0.0153$) minutos ante la inyección i.p. de NaCl 0.4M. Para el grupo SAC/LiCl también se observan cambios en el porcentaje extracelular de NA durante el monitoreo ($F_{(18,90)}=2.063$, $p=0.0136$): se registraron incrementos de NA al minuto 25 ($p=0.0009$) ante la presentación del EC, al minuto 45 ($p=0.0055$) ante la inyección i.p. de LiCl 0.4M y, finalmente, al minuto 85 ($p=0.0038$). De igual forma el monitoreo de NA extracelular del grupo Retrógrado muestra cambios ($F_{(18,81)}=2.355$, $p=0.0048$) en el minuto 20 ($p=0.0011$) ante la inyección i.p. de LiCl 0.4M y al minuto 45 ($p=0.0162$) ante la presentación de sacarina 0.1% .

Las diferencias en la liberación de NA durante el monitoreo, no dependen del grupo ($F_{(36,262)}=1.346$, $p=0.0992$). Sin embargo se realizó en análisis *post hoc* en los tiempos donde se registraron cambios para cada grupo y se compararon contra los demás grupos, los tiempos analizados del monitoreo fueron 20, 25, 45, 50, y 85 minutos.

No se observan diferencias en la NA extracelular a los 20 minutos del monitoreo entre los grupos ($F_{(2,15)}=2.273$, $p=0.1373$). Al minuto 25 tampoco se observan diferencias entre los grupos ($F_{(2,15)}=2.905$, $p=0.0859$), sin embargo existe diferencia significativa en la liberación de NA entre los grupos SAC/LiCl y Retrógrado ($p=0.0359$). En los minutos 45 y 50 no se observaron cambios en la liberación de NA ($F_{(2,15)}=0.490$, $p=0.6232$; y $F_{(2,14)}=2.273$, $p=0.1436$, respectivamente). En el minuto 85 no hay diferencias significativas entre los grupos en la NA extracelular ($F_{(2,14)}=2.819$, $p=0.0936$), sin embargo se observa una tendencia por lo cual se realizó en análisis *post hoc* que muestra que el grupo SAC/LiCl tiende a ser diferente del Retrógrado ($p=0.0505$) y de SAC/NaCl ($p=0.0747$).

Entonces, existen aumentos en los niveles de NA extracelular ante la presentación del EC, la inyección i.p. de NaCl 0.4M ó LiCl 0.4M y 40 minutos después del EI en el grupo SAC/LiCl, esta señal no alcanza a ser diferente de los demás grupos, sin embargo existe una tendencia a serlo (ver Figura 11).

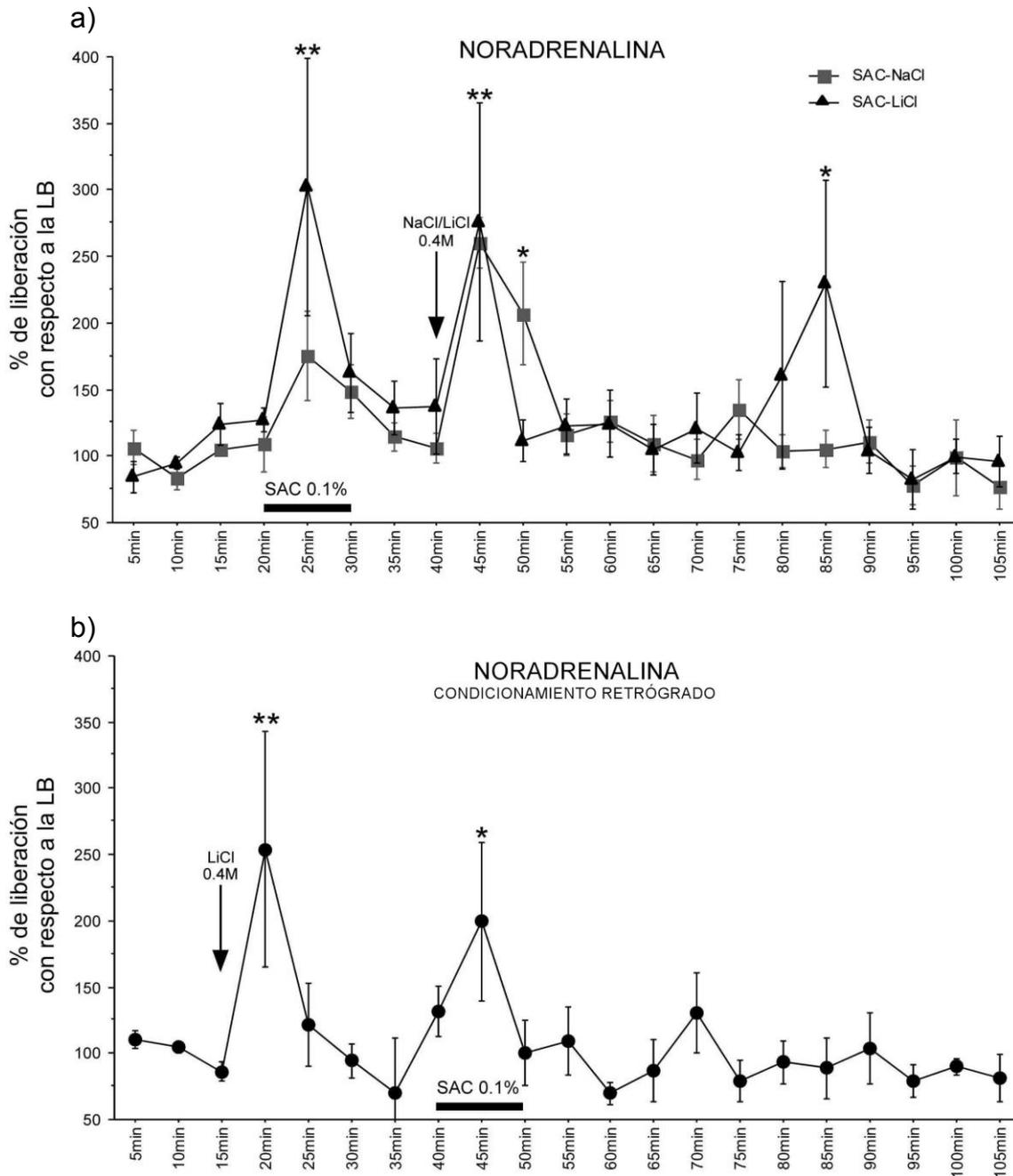


Figura 11. Cinética de liberación que muestra los cambios en porcentaje de noradrenalina extracelular ante la presentación del EC (Sacarina 0.1%) y del EI (NaCl 0.4M ó LiCl 0.4M). a) Sac/LiCl (n=6), Sac/NaCl (n=5) y b) condicionamiento retrógrado (n=4). La presentación del EC aumenta la liberación de noradrenalina extracelular con respecto a la LB y se observa un incremento en la liberación de noradrenalina ante la presentación de NaCl 0.4M o LiCl 0.4M como EI. Además en el grupo Sac/LiCl se observa una tendencia al aumento de noradrenalina extracelular pasados 40 minutos después de la adquisición. Los datos se presentan como porcentaje de LB \pm error estándar. La barra negra indica el tiempo de exposición al EC y la flecha el momento de la inyección del EI. **p<0.01 con respecto a LB, *p<0.05 con respecto a LB.

6.4. LIBERACIÓN DE DOPAMINA Y GABA DURANTE LA ADQUISICIÓN Y POST – ADQUISICIÓN.

Durante el monitoreo de GABA no se observaron cambios significativos en el porcentaje de liberación entre los grupos ($F_{(2,264)}=0.254$, $p=0.7761$) ni durante el monitoreo ($F_{(18,264)}=0.939$, $p=0.5320$). Tampoco se observaron cambios en los niveles extracelulares de DA entre los grupos ($F_{(2,262)}=2.632$, $p=0.0738$) ni durante el monitoreo ($F_{(18,264)}=0.976$, $p=0.4881$). Figuras 12 y 13.

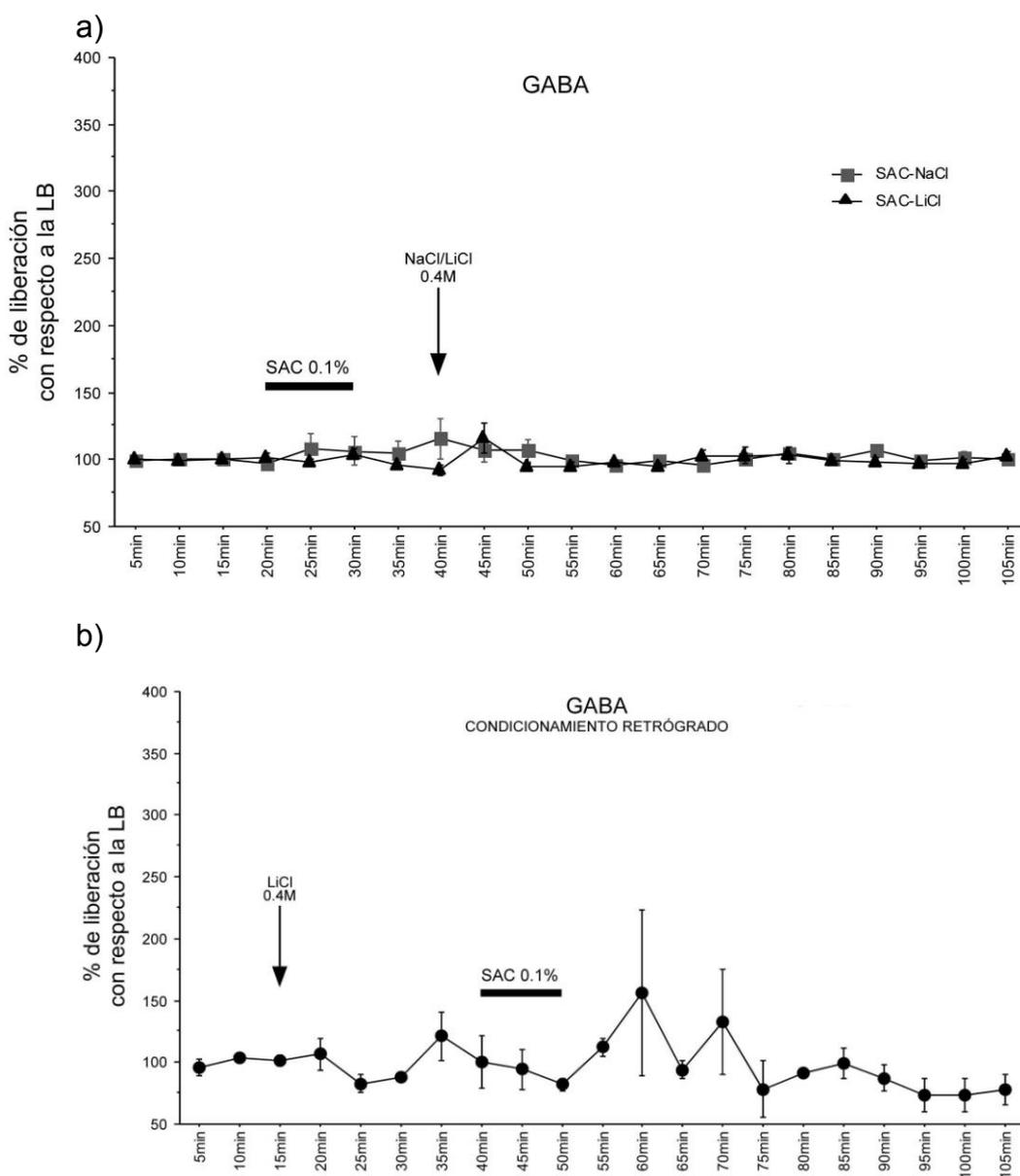


Figura 12. Cinética de liberación que muestra los cambios en porcentaje de GABA extracelular ante la presentación del EC (Sacarina 0.1%) y del EI (NaCl 0.4M ó LiCl 0.4M). a) Sac/LiCl (n=6), Sac/NaCl (n=5) y b) condicionamiento retrógrado (n=4). La presentación del EC no aumenta la liberación de GABA extracelular con respecto a la LB y tampoco se observa un incremento en la liberación de GABA ante la presentación de NaCl 0.4M o LiCl 0.4M como EI. Los datos se presentan como porcentaje de LB \pm error estándar. La barra negra indica el tiempo de exposición al EC y la flecha el momento de la inyección del EI.

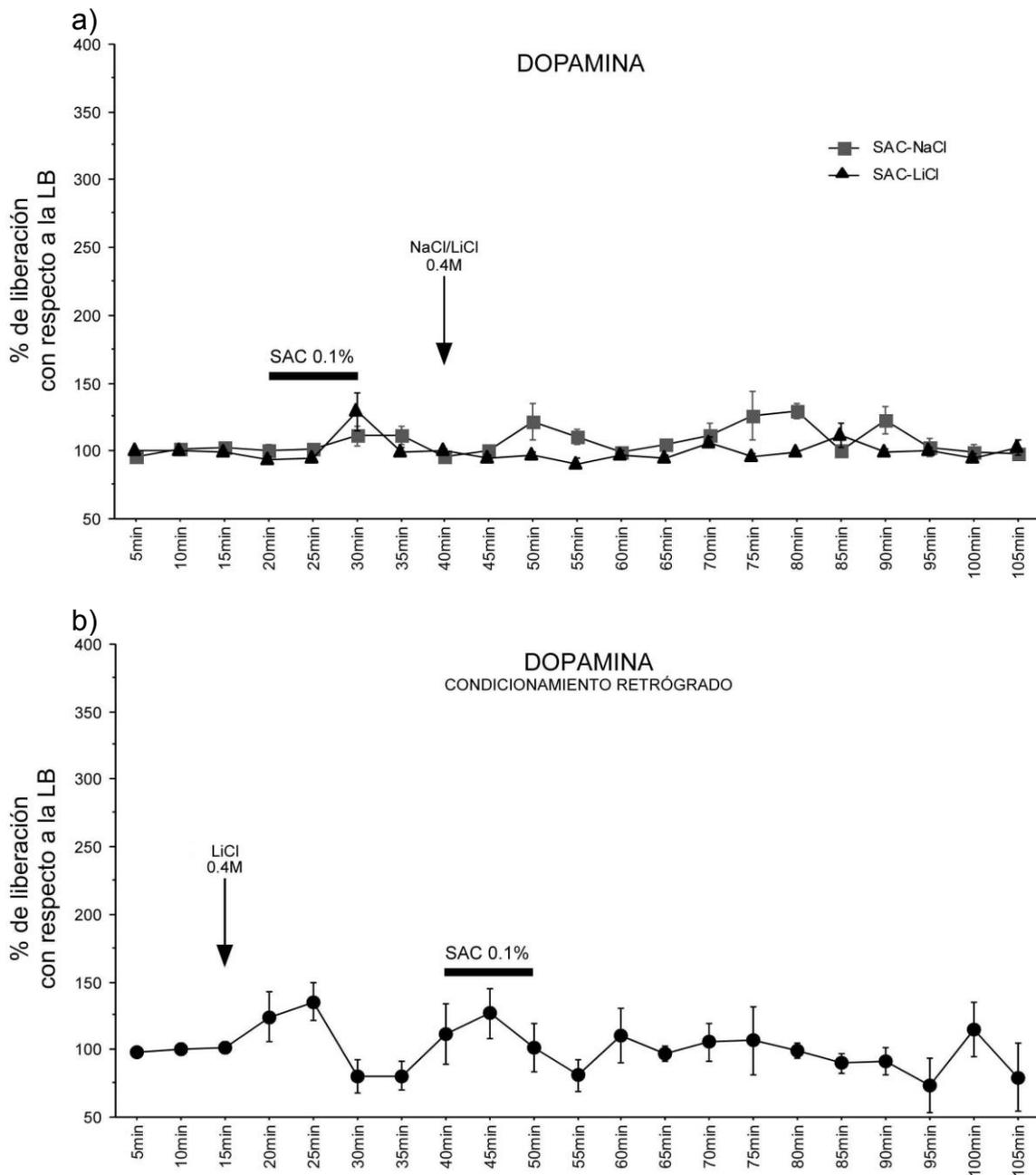


Figura 13. Cinética de liberación que muestra los cambios en porcentaje de dopamina extracelular ante la presentación del EC (Sacarina 0.1%) y del EI (NaCl 0.4M ó LiCl 0.4M). a) Sac/LiCl (n=6), Sac/NaCl (n=5) y b) condicionamiento retrógrado (n=4). La presentación del EC no aumenta la liberación de dopamina extracelular con respecto a la LB y tampoco se observa un incremento en la liberación de dopamina ante la presentación de NaCl 0.4M o LiCl 0.4M como EI. Los datos se presentan como porcentaje de LB \pm error estándar. La barra negra indica el tiempo de exposición al EC y la flecha el momento de la inyección del EI.

6.5. CONSUMO DE SACARINA DURANTE LA PRUEBA DE MLP EN GRUPOS CONDICIONADOS Y NO CONDICIONADOS.

Para evaluar la eficacia del condicionamiento aversivo al sabor entre los diferentes grupos, se presentó de nuevo el estímulo gustativo (sacarina 0.1%,

30 mL) durante 15 minutos en la cámara de microdialísis 72 horas después del día de la adquisición. Los resultados muestran que existe diferencias en el consumo de sacarina 0.1% el día la prueba ($F_{(2,11)}=12.288$, $p=0.0016$). El análisis *post hoc* mostró que existen diferencias entre el grupo Sac/LiCl con el Retrógrado ($p=0.0018$) y el SAC/NaCl ($p=0.011$).

Así que, el establecimiento del CAS mediante la presentación de Sac 0.1% seguida 15 minutos después por la inyección i.p. de LiCl 0.4 M es más efectivo que el condicionamiento hecho con NaCl, como EI, o el condicionamiento retrógrado (ver Figura 14).

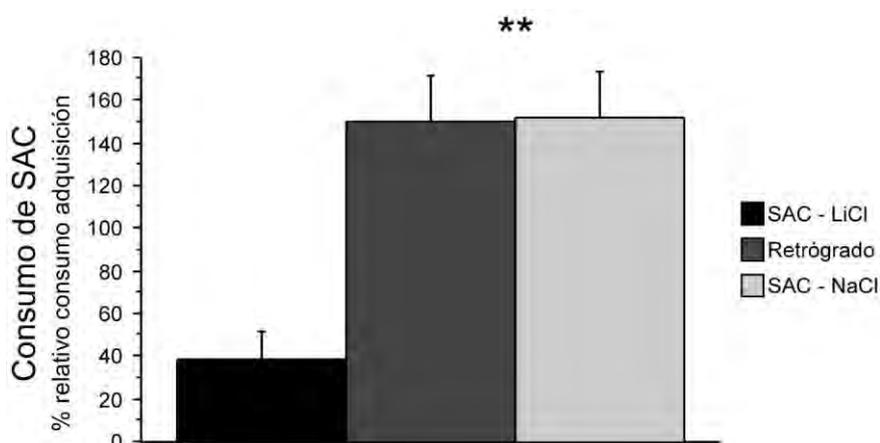


Figura 14. Consumo de sacarina como porcentaje relativo al consumo de sacarina durante la adquisición durante la prueba de MLP del CAS en animales condicionados y no condicionados. El grupo Sac/LiCl muestra un menor consumo el día de la prueba. Se muestra la media + error estándar. $**p<0.01$

7. EXPERIMENTOS 2 y 3.

7.1. EXPERIMENTO 2

7.1.1. Objetivo particular:

Observar el papel de la reactivación offline en la amígdala mediante la inactivación temporal por TTX después de la adquisición.

Hipótesis: La inactivación temporal de la amígdala durante la reactivación offline atenúa la consolidación del CAS.

7.2. EXPERIMENTO 3

7.2.1. Objetivos particulares:

Observar el papel del sistema noradrenérgico y glutamatérgico durante la reactivación offline en la amígdala mediante el bloqueo de receptores β -adrenérgicos o NMDA durante la post - adquisición.

Hipótesis: El bloqueo post - adquisición de los receptores β -adrenérgicos en la amígdala atenúa la consolidación del CAS.

Hipótesis: El bloqueo post - adquisición de los receptores NMDA en la amígdala atenúa la consolidación del CAS.

7.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTOS 2 Y 3.

7.3.1. ANIMALES

Se utilizaron 68 ratas macho de la cepa Wistar con las mismas características utilizadas para el experimento 1.

7.3.2. IMPLANTACIÓN BILATERAL DE CÁNULAS GUÍA EXPERIMENTOS 2 Y 3.

Como se describió en el experimento 1 de acuerdo a las siguientes coordenadas (AP= -2.8, L= \pm 4.8, y DV= -6.5, con respecto a Bregma) (Paxinos y Watson, 1998); se insertaron estiletos en las cánulas para evitar la obstrucción de las mismas.

7.3.3. PROTOCOLO CONDUCTUAL EXPERIMENTOS 2 Y 3.

Los animales fueron privados de agua por 24 horas a partir del sexto día de la implantación de cánulas. Durante los siguientes 5 días se les proporcionó por la mañana (9 – 10 am.) y por la tarde (4 – 5 pm.) 30 mL de agua durante 15 minutos, a través de una probeta graduada y un tapón de corcho horadado con una boquilla metálica que funcionó como bebedero, se registraron los consumos que sirvieron como línea base de consumo de agua.

El día de la adquisición, se les presentó 30 mL de sacarina 0.1% y 15 minutos después se les inyectó i.p. LiCl 0.4 M, 7.5 mL/kg. La MCP se evaluó a las 4 horas después del EI mediante la presentación de 30 mL de sacarina 0.1%. Durante los dos días siguientes se restableció el esquema de consumos utilizados para la línea base; la MLP se evaluó a las 72 hrs presentando 30 mL de sacarina 0.1%.

7.3.4. MICROINYECCIONES EXPERIMENTOS 2 Y 3.

Los animales fueron manipulados aproximadamente por tres minutos durante los días de registro de línea base. El día de la adquisición, se retiraron los estiletes y se insertaron los inyectores dentales que sobresalían 1.5mm por debajo de las cánulas guía, los cuales estaban conectados por medio de una tubería de polietileno a dos jeringas de microinyección de 10µL (Hamilton Co., E.U.A.) montadas en una bomba automática de microinfusión (Cole – Parmer, E.U.A.). El volumen inyectado fue de 1 µL por hemisferio a una velocidad de 0.5 µL/min, el tiempo de microinyección se encuentra especificado posteriormente. Los inyectores se dejaron un minuto más para permitir la difusión del fármaco.

7.3.4.1. MICROINYECCIÓN DE TTX

El día de la adquisición se microinyectó TTX²⁹ (10 ng/µl) disuelto en amortiguador fosfato salina 0.1 M pH 7.4 (TTX, n=7) (Sigma – Aldrich, MO) o amortiguador fosfato salina 0.1 M pH 7.4 (PBS, n=7) inmediatamente después del EI.

²⁹ TTX: Tetrodotoxina, bloqueador selectivo reversible de los canales de Na⁺.

7.3.4.2. MICROINYECCIÓN DE PROPRANOLOL O APV

El día de la adquisición se microinyectó Propranolol³⁰ (5 µg/µL) disuelto en solución salina 0.9% (PROP, n=19) (Sigma – Aldrich, MO), APV³¹ (10 ng/µL) disuelto en solución salina 0.9% (APV, n=17) (Tocris, E.U.A.) o solución salina 0.9% (SS, n=18) 30 minutos después del EI.

7.3.5. HISTOLOGÍA EXPERIMENTOS 2 Y 3

La metodología empleada fue la misma a la que se utilizó en el experimento 1.

7.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIMENTOS 2 Y 3.

Experimento 2: Se utilizó la prueba t de Student no pareada para comparar el consumo de sacarina 0.1% el día de la prueba entre el grupo microinyectado con el vehículo y el grupo inyectado con TTX, se utilizó como estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

Experimento 3: Para comparar las diferencias en el consumo de sacarina 0.1% durante la MCP y la MLP entre los diferentes grupos experimentales y entre la MCP y la MLP se utilizó una ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* de Fisher, teniendo una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS EXPERIMENTO 2.

8.1. HISTOLOGÍA EXPERIMENTO 2 y 3.

Se verificó la correcta implantación de las cánulas. La figura 15 muestra un corte coronal con la localización de la cánula. Se descartaron 6 animales de un análisis posterior debido a la incorrecta implantación de las cánulas. Los grupos quedaron de la siguiente forma: PBS, n=7; TTX, n=7; SS, n=16; APV, n=13 y PROP, n= 19.

³⁰ Propranolol: antagonista no selectivo de los receptores β – adrenérgicos.

³¹ APV: 2 – amino – 5- fosfonopentanoato, antagonista competitivo de los receptores NMDA.

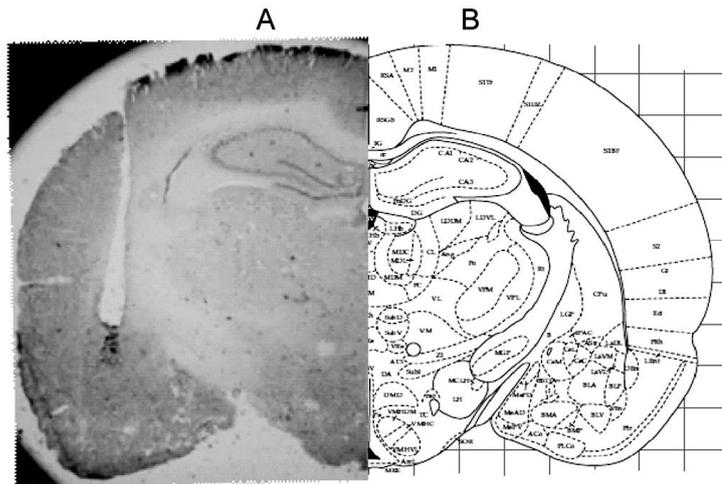


Figura 15. A) Corte coronal con la ubicación de la cánula guía, el tejido fue teñido con violeta de cresilo. B) Diagrama esquemático de la ubicación de la amígdala tomado del atlas esterotáxico (Paxinos y Watson, 1998)

8.2. BLOQUEO DE LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS MEDIANTE LA INACTIVACIÓN TEMPORAL DE LA AMÍGDALA DURANTE LA POST - ADQUISICIÓN

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el consumo de línea base; ni en el consumo de sacarina 0.1% el día de la adquisición.

Sin embargo, el día de la prueba se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el consumo de sacarina 0.1% (t de Student, $t = 2.502$, $p = 0.0265$). La figura 16 muestra el consumo de sacarina como porcentaje relativo al consumo en la adquisición.

La inyección de TTX 10 ng/μl en la amígdala inmediatamente después del El bloquea la consolidación del CAS.

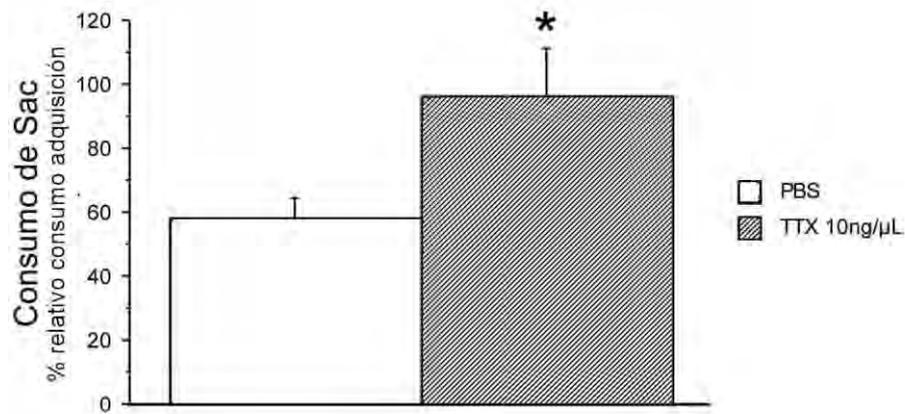


Figura 16. Consumo de sacarina en porcentaje relativo al consumo de sacarina en la adquisición durante la prueba del CAS en animales inyectados en la amígdala con PBS (n=7) o con TTX (n=7) inmediatamente después del EI. La inactivación temporal de la amígdala después de la adquisición bloquea la consolidación de la memoria aversiva al sabor. Se muestra la media + el error estándar. *p<.05

9. RESULTADOS EXPERIMENTO 3.

9.1. LA INFUSIÓN EN LA AMÍGDALA DE ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES β – ADRENERGICOS O NMDA DURANTE LA POST - ADQUISICION DEL CAS ATENÚA LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS.

El consumo de agua durante la línea base no muestra diferencias significativas entre los grupos; ni en el consumo de sacarina 0.1% el día de la adquisición.

Se observó una diferencia significativa en el consumo de sacarina 0.1% durante las pruebas entre los grupos ($F_{(2,90)} = 15.387$, $p < 0.0001$): SS y APV ($p < 0.0001$), SS y PROP ($p = 0.0077$), y APV con PROP ($p = 0.0020$). Además, el consumo de sacarina es diferente entre la MCP y la MLP ($F_{(1,90)} = 199.468$, $p < 0.0001$).

En un análisis posterior se encontró que existen diferencias significativas en el consumo de sacarina entre la MCP y la MLP de los grupos SS ($F_{(1,30)} = 30.556$, $p < 0.0001$), APV ($F_{(1,24)} = 85.541$, $p < 0.0001$) y PROP ($F_{(1,36)} = 79.649$, $p < 0.0001$). Sin embargo, no existen diferencias en el consumo de sacarina en la MCP entre los grupos ($F_{(2,45)} = 2.943$, $p = 0.0629$); pero sí hay diferencia en la MLP entre los grupos ($F_{(1,30)} = 15.498$, $p < 0.0001$), el análisis *post hoc* indicó que el grupo SS es diferente de APV ($p < 0.0001$) y de PROP ($p = 0.0026$), además APV difiere de PROP ($p = 0.0088$).

Por lo tanto, la infusión de propranolol 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o de APV 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en la amígdala 30 minutos después del EI no afecta la MCP pero bloquea la consolidación del CAS. La figura 17 muestra el consumo de sacarina durante la MCP y la MLP como porcentaje relativo al consumo de sacarina en la adquisición.

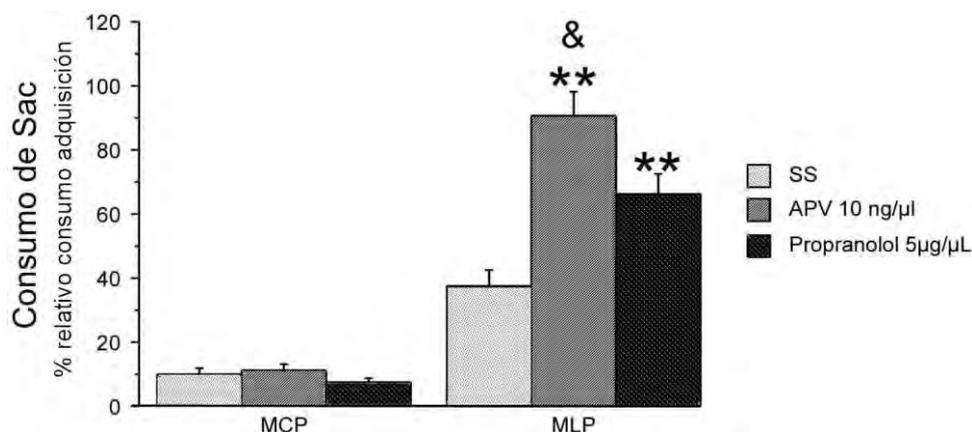


Figura 17. Consumo de sacarina durante la MCP y MLP como porcentaje relativo al consumo de sacarina en la adquisición del CAS en animales inyectados en la amígdala con SS (n=16) APV (n=13) o PROP (n=19) 30 minutos después del EI. La infusión de antagonistas β – adrenérgicos o NMDA en la amígdala 30 minutos después de la adquisición bloquea la consolidación de la memoria aversiva al sabor. Se muestra la media + error estándar. **p<0.01 comparado con SS, &p<0.01 comparado con PROP.

10. DISCUSIÓN.

El desarrollo de técnicas bioquímicas en investigación ha facilitado la descripción de cómo es que el cerebro codifica los diversos estímulos; el presente trabajo ha hecho uso de la microdiálisis y de la electroforesis capilar como dos herramientas muy importantes para recolectar y analizar, respectivamente, la liberación de diferentes neurotransmisores bajo las mismas condiciones ambientales y ante la estimulación, inducida por la presentación de estímulos gustativos o viscerales; además, la infusión intracerebral de fármacos que bloquean la participación de dichos neurotransmisores permiten dilucidar la función de cada neurotransmisor en la formación de la memoria aversiva al sabor.

10.1. CAMBIOS EN LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES DEBIDA A LA PRESENTACIÓN DEL ESTÍMULO GUSTATIVO NOVEDOSO.

Recientemente se ha reportado, a través de estudios de imagenología, que la presentación de estímulos novedosos ocasiona un incremento en la actividad de la amígdala en humanos (Blackford et al., 2010), otro dato que apoya la participación de la amígdala ante la novedad es el mostrado por Nachman y Ashe (1974) y más adelante por Borsini y Rolls (1984), los cuales lesionaron electrolíticamente de forma bilateral la ABL y observaron que estas lesiones ocasionan un incremento en el consumo de un sabor novedoso. Además se ha descrito con anterioridad que la amígdala muestra un incremento en su actividad ante la presentación de estímulos gustativos novedosos, esto se ha observado mediante electrofisiología (Fontanini et al., 2009; Nishijo et al., 1998) o con técnicas de inmunohistoquímica para *c – fos*³² (Yamamoto et al., 1997, Koh et al., 2003) en animales expuestos a sabores novedosos.

Aunado a esto, la novedad funciona como un agente psicológico estresante, pues animales que son expuestos a un ambiente novedoso muestran un incremento en la concentración de glucocorticoides en el plasma sanguíneo, dicho incremento se ha correlacionado con el estrés (Pfister, 1979). Cabe destacar que los glucocorticoides atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y se unen a sus receptores específicos en las neuronas noradrenérgicas del NTS, potenciando así la liberación de NA hacia la ABL (McGaugh y Roozendaal, 2002). La estimulación estresante como la inmovilización del organismo incrementa los niveles de NA en la amígdala (Morilak et al. 2005).

De acuerdo a los datos presentados en este trabajo, la presentación de estímulo gustativo novedoso ocasionó un incremento de NA en la amígdala. Sin embargo, este cambio en la liberación noradrenérgica podría estar relacionado con el estrés³³ que induce la exposición a estímulos novedosos y no así en la codificación del sabor. Asimismo, existen reportes de que la

³² *C – fos*: La expresión de esta proteína es utilizada como marcador de actividad celular.

³³ Estrés: Amenaza real o percibida hacia la homeostasis o bienestar de un organismo.

inyección de NA en la ABL seguida inmediatamente de la presentación de dos sabores, uno familiar y otro novedoso, ocasiona un incremento en la preferencia por el estímulo familiar, es decir, muestra una mayor respuesta neofóbica. (Borsini y Rolls, 1984), por el contrario la inyección intra-amigdalara de un antagonista a los receptores β -adrenérgicos produce una disminución en la neofobia (Rooszendaal y Cools, 1994). Estos datos favorecen la idea del papel de la NA como una señal estresante ante la novedad.

En cuanto al Glu se observó que no existe un aumento de liberación en la amígdala ante la presentación del estímulo gustativo, esto no difiere de resultados anteriores donde se monitoreó la liberación glutamatérgica en la ABL ante la presentación de sacarina 0.1% y tampoco se observa un aumento de Glu extracelular ante la presentación del EC (Miranda et al., 2002). Además, la neofobia no depende de los receptores NMDA (Figueroa – Guzmán y Reilly, 2008; Burns et al., 1994), también se ha visto que los ratones modificados genéticamente, y que no expresan al receptor mGluR7, pueden distinguir entre sabores (Masugi et al., 1999). De tal forma que se podría inferir que el Glu no participa en la codificación de los estímulos gustativos en la amígdala.

Durante la presentación del estímulo gustativo no se observó incremento alguno de DA extracelular en la amígdala, esto probablemente se debe a que el área ventral tegmental, la cual envía proyecciones dopaminérgicas hacia la amígdala y otras estructuras límbicas, no está involucrada en la evaluación del sabor (Yamamoto, 2006). Además, el bloqueo de los receptores D1 en la CI antes de la presentación del EC, no tiene efecto en el establecimiento del CAS (Guzmán – Ramos et al., 2008).

En cuanto a GABA, no existen datos que ayuden a comprender su papel en la codificación de estímulos gustativos o novedosos.

10.2. CAMBIOS EN LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES DEBIDA A LA PRESENTACIÓN DEL EI.

La inducción de malestar gástrico por la inyección i.p. de una solución hipertónica, ocasiona el aumento en la liberación noradrenérgica en la amígdala, dicho incremento es debido al estrés que ocasiona la estimulación

dolorosa, pues se ha descrito que la punción de la cola (Tanaka et al., 1991) y la aplicación de un choque eléctrico en las patas (Galvez et al., 1996; Quirarte et al., 1998) ocasiona un incremento en los niveles extracelulares de NA en la amígdala; la intensidad del estímulo está relacionado con la magnitud del incremento en la liberación noradrenérgica (Quirarte et al., 1998).

El aumento en la liberación de Glu ante la i.p. de LiCl es similar a lo reportado por Miranda y cols. (2002) quienes observaron que la inyección i.p. de LiCl 0.4M ocasiona un aumento en los niveles de Glu extracelular en la ABL en comparación de la inyección i.p. de LiCl 0.075M ó NaCl 0.15M. Sin embargo en ese trabajo se utilizó una concentración de NaCl isotónica y los cambios en los niveles de liberación pudieron ser debidos a la diferencia de concentración y por consiguiente una diferencia en la magnitud de la irritación del peritoneo; motivo por el cual, en el presente trabajo, se utilizó una concentración de NaCl igual a la de LiCl 0.4M para discernir si la diferencia de liberación era debida a la concentración o a la característica del estímulo. A la luz de los resultados se sugiere que el LiCl 0.4M se procesa de forma diferente en el SNC en comparación con el NaCl 0.4M, esto se observó no solo en el aumento en la liberación de Glu en la amígdala mediante el LiCl sino también en la incapacidad del NaCl por establecer el CAS. Anteriormente se había observado que el LiCl es capaz de producir náusea y vómito en pacientes que utilizaron el LiCl como terapia para la depresión (Vacaflor, 1979). Además se ha visto que el LiCl estimula al área postrema (Ritter et al., 1980), y la información proveniente del área postrema llega, después de un relevo en el NTS, al NPB, el cual también responde a la estimulación nociceptiva y proyecta a través de la vía parabraquiamigaloide la señal glutamatérgica (Tully et al., 2007).

Así que la irritación del peritoneo mediante la inyección de LiCl es codificada en la amígdala mediante dos señales: la noradrenérgica, que señala estrés ocasionado por el dolor y la de Glu que implica la toxicidad del estímulo. En cambio el estímulo de NaCl sólo contiene la señal noradrenérgica y por lo tanto es incapaz de establecer el CAS.

A pesar de que existen trabajos donde se reporta la liberación de DA en la amígdala en diferentes tareas donde se somete al organismo a estrés

(Yokoyama et al., 2005; Inglis y Moghaddam, 1999), no se ha podido determinar si la DA participa como ansiogénico o ansiolítico y únicamente se ha dilucidado que facilita al organismo a enfrentarse de mejor forma al ambiente estresante (Pérez de la Mora et al., 2009). De acuerdo al monitoreo hecho en este trabajo, no se observó cambios en los niveles de DA, esta discrepancia puede ser debida que el estímulo estresante fue diferente al utilizado en los trabajos antes mencionados.

10.3. LA REACTIVACIÓN OFFLINE DE LA AMÍGDALA ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS.

Desde hace mucho tiempo se ha sugerido que las memorias recién adquiridas necesitan de tiempo para consolidarse, y es común que dichas memorias sean sujetas a ser interferidas por estímulos distractores, lesiones, o toxinas, los cuales, van perdiendo su efectividad con el paso del tiempo (Dudai, 2004). La consolidación, como se mencionó anteriormente, es el proceso de estabilización de la memoria que se da después de la adquisición de una tarea.

La consolidación de la memoria se refiere a dos tipos de procesos. El primero se lleva a cabo a partir de minutos u horas después de la codificación de la tarea o de la práctica de una actividad y se conoce como consolidación celular, durante este proceso se dan cambios en la morfología de las neuronas para mejorar la comunicación entre éstas (Dudai, 2004)

El segundo proceso lleva semanas, meses e incluso años para que se lleve a cabo y se le conoce como consolidación de sistemas. En este proceso la información se extiende a otras estructuras del cerebro y al mismo tiempo elimina su dependencia a los circuitos involucrados en la adquisición de la tarea (Dudai, 2004).

Desde el postulado de Hebb se ha conceptualizado a la formación de la memoria como un proceso en el cual, la actividad neuronal reverberante en circuitos específicos promueve cambios duraderos en las sinapsis. A partir de esto, es ampliamente aceptado que el proceso de consolidación se basa en la reactivación de circuitos neuronales que participaron en la codificación de la información, promoviendo la distribución y organización gradual de las

representaciones mnémicas hacia sitios de almacenamiento de largo plazo (consolidación de sistemas) y de los cambios sinápticos duraderos necesarios para estabilizar las memorias (consolidación celular) (Diekelman y Born, 2010).

Hasta la fecha, existen un gran número de reportes donde se ha descrito que el sueño promueve la consolidación de la memoria (Stickgold, 2005); durante esta conducta se ha encontrado que los patrones de actividad neuronal que ocurren en el hipocampo durante la exploración de un ambiente novedoso o en tareas espaciales simples son reactivados en el mismo orden durante el sueño subsecuente, dicha reactivación se ha observado principalmente durante el sueño de ondas lentas (Diekelman y Born, 2010). No obstante, esta reactivación también ha sido observada mientras el organismo se encuentra despierto (Jadhav y Frank, 2009; Karlsson y Frank, 2009; Peigneux et al. 2006). Sin embargo, estos reportes no podían apoyar la idea de que la reactivación participe en la consolidación de la memoria, los únicos datos que favorecían esta causalidad son aquellos que privan a los organismos del sueño total o de algunas de las fases de sueño, observando un peor desempeño en la tarea que aprendieron (Stickgold, 2005; Diekelman y Born, 2010) no obstante el mal desempeño puede ser debido a la alteración de la excitabilidad neuronal y la comunicación sináptica en redes neuronales implicada en la cognición, además del estrés ocasionado por la privación de sueño (Longordo et al., 2009) .

Sin embargo, la reactivación neuronal no se restringe únicamente al sueño y se ha descrito que existe una reactivación en la neocorteza similar a la observada mientras el primate ejecutaba una tarea, dicha reactivación fue observada en los períodos de descanso entre ensayos (Hoffman y McNaughton, 2002). También se ha descrito que existen oleadas de síntesis proteica producto de un aprendizaje previo, se ha observado el incremento de la expresión de *Arc* (Montag – Sallaz, y Montag, 2003; Ramírez – Amaya et al., 2005), *mTOR* (Belelovsky et al., 2009), *BDNF*, *c-FOS* y *Zif268* (Bekinschtein et al., 2007); la expresión de estas proteínas se ha observado desde 2 horas (Belelovsky et al., 2009) hasta 12 horas (Bekinschtein et al., 2007) después de la adquisición. Al parecer, estos datos sugieren que la expresión de genes post adquisición es parte del proceso de consolidación de la memoria.

Por otra parte los datos que apoyan el papel de la reactivación como parte del proceso para la consolidación son los mostrados por Ego – Stengel y Wilson (2010), los cuales estimularon eléctricamente la región CA1 una hora después de la adquisición de una tarea espacial, dicha estimulación fue dada durante el sueño de ondas lentas, período en el cual existe reactivación de los circuitos involucrados en la adquisición de la tarea, ocasionando un déficit en el desempeño; y el mostrado por Guzmán-Ramos y cols. (2008) los cuales observaron el incremento de Glu en la CI 44 minutos después de la adquisición del CAS; el bloqueo de los receptores NMDA, durante esa reactivación, afecta la consolidación del CAS.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que existe una reactivación offline en la amígdala, mediante el incremento de Glu y de NA, pasados 40 minutos después de la adquisición del CAS, dicha reactivación es necesaria para la consolidación de la memoria gustativa de aversión, ya que la inactivación temporal de la amígdala durante el período de reactivación afecta la consolidación del CAS observándose en un pobre desempeño el día de la prueba. Dicho resultado demuestra que la reactivación es parte del proceso de la consolidación de la memoria de aversión al sabor. Cabe destacar que no fue posible averiguar si la inactivación temporal de la amígdala durante la post - adquisición afectaba a la MCP debido a que la inyección de TTX tenía efecto sobre la ingesta de líquidos.

Hasta el momento se posee más información sobre la consolidación sináptica, donde se ha establecido que para que esta se lleve a cabo es necesaria la expresión de genes involucrados en cambios estructurales que facilitan la transmisión de señales entre las neuronas, estos cambios ocurren tanto en la célula presináptica como en la célula postsináptica. Dichos cambios han permitido suponer que la plasticidad sináptica es la base la consolidación y el almacenaje de las memorias a largo plazo. Sin embargo, los cambios en las sinapsis requieren relativamente de poco tiempo sugiriendo que una vez que se ha puesto en marcha la expresión de genes para la consolidación la memoria, esta quedaría establecida en intervalos muy cortos de tiempo, no obstante se

ha observado que existen memorias que requieren de días, incluso semanas para que se consoliden (Wang et al., 2006).

Además, las proteínas que forman las sinapsis no son estáticas y tanto los receptores como otros componentes de la transmisión sináptica entran a un proceso de degradación, consecuentemente, ¿cómo podría ser posible que ante un circuito frecuentemente cambiante se pudiera establecer la memoria durante mucho tiempo? Asimismo, el tener como base de la consolidación a los cambios sinápticos no permite explicar cómo se promueve la distribución y organización gradual de las representaciones mnémicas hacia sitios de almacenamiento de largo plazo.

Dadas las reactivaciones observadas se ha propuesto una hipótesis llamada Reforzamiento de la sinapsis por reentrada, la cual postula que la consolidación de la memoria necesita de múltiples activaciones para reforzar los cambios sinápticos y para contrarrestar la degradación de las proteínas involucradas en las sinapsis. De forma más importante el reforzamiento de la sinapsis por reentrada sirve como mecanismo celular para transferir y convertir a las memorias recién adquiridas a la corteza para un almacenamiento por un mayor periodo de tiempo (Wang et al., 2006).

De acuerdo a la hipótesis anterior, la consolidación de la memoria requiere de la reactivación de los circuitos para fortalecer las sinapsis y además transferir la información hacia la corteza; conjuntamente se ha reportado que la consolidación de la memoria es dependiente de la reactivación de los receptores NMDA, ya que ratones que son modificados genéticamente para eliminar la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en el hipocampo, durante un intervalo prolongado post – adquisición, muestran dificultad en retener tareas dependientes de hipocampo (Shimizu et al., 2000); del mismo modo, la ausencia de expresión de NR1 en la corteza después de la adquisición del CAS atenúa la retención de la tarea (Cui et al., 2005); sin embargo estos tratamientos pueden afectar otros procesos donde se requiera la participación de los receptores NMDA, ya que el período durante el cual el organismo es inducido a no expresar dichos genes es muy largo, desde días (Shimizu et al. 2000) hasta semanas (Cui et al., 2005). Existen otros trabajos

donde la manipulación del sistema glutamatérgico (Ferreira et al., 2005; Gutiérrez et al., 1999) o del noradrenérgico (Tronel et al., 2004; Ferry y McGaugh, 1999; Ferry y McGaugh, 2008) en tiempos post – adquisición afecta la consolidación de la memoria; las manipulaciones farmacológicas fueron hechas en diferentes tiempos, por lo tanto, la explicación de estos efectos en la consolidación de la memoria no es muy clara.

Por el contrario, el bloqueo de receptores NMDA, hecho durante el período de reactivación, en la amígdala como en la CI (Guzmán – Ramos et al., 2008), permite hacer un bloqueo puntual de la reactivación glutamatérgica post – adquisición, favoreciendo la idea sobre su papel en la consolidación.

En el presente trabajo, el bloqueo de los receptores β – adrenérgicos durante la reactivación offline también atenúa la consolidación del CAS. Es importante destacar que la propuesta del reforzamiento sináptico por reentrada se basa en la participación de los receptores NMDA, no obstante los resultados obtenidos muestran asimismo la participación de los receptores β – adrenérgicos. Actualmente se sabe que la función del sistema noradrenérgico es la de facilitar la señal glutamatérgica (Harley, 2004) como se verá más adelante.

Cabe destacar que la reactivación observada en la CI (Guzmán – Ramos et al., 2008) se presenta 4 minutos después de lo observado en la amígdala, esta diferencia es debida a la velocidad de perfusión utilizada para la recolección de la muestra del dializado, para la CI se usó una velocidad de $1\mu\text{L}/\text{min}$ y en la amígdala se utilizó $0.8\mu\text{L}/\text{min}$ ocasionado por la diferencia en el tamaño de la membrana de microdiálisis. No obstante, es probable que la reactivación observada en la CI sea producto de la reactivación en la amígdala de acuerdo a las proyecciones descritas entre la amígdala y la CI (Escobar et al., 1998) y su interacción en el establecimiento del CAS (Escobar et al., 1998; Ferreira et al., 2005) y retención del CAS (Escobar y Bermúdez – Rattoni, 2000)

SINERGIA DE LOS RECEPTORES β – ADRENÉRGICOS/NMDA EN LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS.

El monitoreo durante la post - adquisición del CAS muestra la liberación conjunta de NA y de Glu en el grupo condicionado 40 minutos después de la adquisición del CAS, dichas señales son la encargadas de la consolidación del CAS ya que existe mucha información sobre la participación de la NA y del Glu en la consolidación de la memoria.

Hoy es bien sabido que el sistema noradrenérgico participa en la consolidación de la memoria (McGaugh, 2000; Sara, 2009), hay que recordar que los receptores β – adrenérgicos se encuentran acoplados a proteínas G que estimulan al AC, incrementando el nivel de AMPc, y a medida que el nivel de este segundo mensajero aumenta la PKA es activada, llevando a la fosforilación de varias proteínas incluyendo el CREB, dando como resultado final la expresión de varios genes (Mayford et al., 1995). Por otra parte, la liberación de Glu estimula a los receptores NMDA teniendo como consecuencia una entrada de Ca^{2+} , la presencia elevada de Ca^{2+} activa a la CaMKII. La activación de CaMKII fosforila a los receptores AMPA aumentando la entrada de Ca^{2+} , e incrementando aun más la participación de CaMKII, que tiene como sitio de acción al CREB, estimulando la expresión de genes y la subsecuente síntesis proteica (Miyamoto, 2006).

Si bien es cierto que las dos señales de neurotransmisión tienen por si solas la capacidad de modificar estructuralmente las sinapsis a través de síntesis de proteínas, también se ha reportado una interacción entre estos dos sistemas de neurotransmisión que favorece a la consolidación de la memoria; hoy se sabe que agonistas β – adrenérgicos tienen poco efecto en el potencial de membrana en reposo pero potencian de forma importante la excitabilidad sináptica mediada por los receptores NMDA (Gean et al., 1993; Huang et al., 1998).

El mecanismo por el cual el flujo de Ca^{2+} , a través de los receptores NMDA, es modulado por los receptores β – adrenérgicos es mediante la activación del AC, incrementando el nivel de AMPc, y la subsecuente activación

de la PKA (Huang et al., 1993). La PKA fosforila a los receptores en la subunidad NR1 de los receptores NMDA (Bird et al., 2005) y a DARPP-32, la cual al estar fosforilada se encarga de inhibir la desfosforilación de NR1 (Snyder et al., 1998), incrementando el paso de Ca^{2+} (Raman et al., 1996) y la activación de CaMKII.

Existe otra forma de interacción entre los receptores β – adrenérgicos y los receptores NMDA, ya que el aumento en la excitabilidad sináptica reportada por Gean y cols., (1993) también es debida a un incremento en la liberación de Glu en la terminales presinápticas (Herrero y Sánchez – Prieto, 1996; Huang et al., 1996; Huang y Hsu, 2006). La activación de los receptores β – adrenérgicos presinápticos ocasiona de igual manera un incremento en la actividad de la PKA, la cual fosforila a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, permitiendo una mayor entrada de Ca^{2+} a la terminal presináptica (Huang et al., 1996; Huang y Hsu, 2006). La entrada de Ca^{2+} en las terminales presinápticas está relacionada con la unión de las vesículas sinápticas con la membrana celular, liberando al neurotransmisor que contiene hacia el espacio sináptico (Pigino et al., 2006). Por lo tanto, el incremento de Ca^{2+} en las terminales presinápticas ocasiona un incremento en la liberación de Glu facilitando la comunicación sináptica.

Entonces, además de la reactivación glutamatérgica post – adquisición, existen al menos dos mecanismos de interacción entre la NA y el Glu que fortalecen la señal que echan a andar tanto los mecanismos de consolidación sináptica como los de consolidación de sistemas.

11. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

La presentación de un estímulo gustativo novedoso ocasiona un incremento en los niveles extracelulares de NA en la amígdala, posiblemente debido al estrés que supone la novedad.

La irritación del peritoneo mediante la inyección de NaCl 0.4M o de LiCl 0.4 ocasiona un aumento en los niveles extracelulares de NA en la amígdala debido al estrés que ocasiona la presentación de estímulos dolorosos.

Existe un aumento en la liberación de Glu en la amígdala, el cual señala la toxicidad del LiCl 0.4M como estímulo visceral aversivo.

La reactivación offline, dada por las señales de Glu y NA, es necesaria para la consolidación de la memoria aversiva al sabor.

Como parte del procesamiento de consolidación se requiere la reactivación de los receptores NMDA, esta reactivación está modulada por los receptores β – adrenérgicos.

12. REFERENCIAS

- Acolla, R., Bathellier, B., Petersen, C.H. & Carleton, A. (2007). Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *The Journal of Neuroscience*. 27 (6): 1396 – 1404.
- Aggleton, J.P., Petrides, M., & Iversen, S.D. (1981). Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversion learning by rats. *Physiology and Behavior*. 27: 397 – 400.
- Alheid, G.F., Olmos, J.S., & Beltramino, C.A. (1995). Amygdala and extended amygdala. En Paxinos, G. *The rat nervous system*. 2nd ed. Academic Press. San Diego.
- Anderson, J.R. (2001). *Aprendizaje y memoria*. McGraw – Hill. México.
- Andre, J, St., & Reilly, S. (2007) Effects of central and basolateral amygdala lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition. *Behavioral Neuroscience*. 121 (1): 90 – 99.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (2008). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53: 261 – 277.
- Belelovsky, K., Kaphzan, H., Elkobi, A., & Rosenblum, R. (2009). Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *The Journal of Neuroscience*. 29(23): 7424 – 7431.
- Bennett, E.L., Diamond, M.C., Krech, D., & Rosenzweig, M.R. (1964). Chemical and anatomical plasticity of the brain. *Science*. 146: 610 – 619.
- Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., & Diamond, M.C (1969). Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science*. 163: 825 – 826.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste – recognition memory. *Nature Reviews. Neuroscience*. 5: 209 – 217.
- Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies En Bures, J., Bermúdez – Rattoni, F., & Yamamoto, T. *Conditioned taste aversion. Memory of a special kind*. Oxford University Press. New York.
- Bermúdez-Rattoni, F., Quirarte, G.L. & Prado - Alcalá, R.A. (2001). Pavlov y sus perros. En Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, R. A. *Memoria: dónde reside y cómo se forma*. Trillas. México.
- Bird, G.C., Leanne, L., Han, J.S., Zou, X., Willis, W.D., & Neugebauer, V. (2005). Protein kinase A – dependent enhanced NMDA receptor function in pain – related synaptic plasticity in rat amygdala neurons. *Journal of Physiology*. 564(3): 907 – 921.
- Blackford, J.U., Buckholtz, J.W., Avery, S.N., & Zald, D.H. (2010). A unique role for the human amygdala in novelty detection. *NeuroImage*. 50(3): 1188 – 1193.
- Bliss, T.V., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*. 232(2): 331 – 356.
- Borsini, F., & Rolls, E.T. (1984). Role of noradrenaline and serotonin in the basolateral region of the amygdala in food preferences and learned taste aversions in the rat. *Physiology and Behavior*. 33: 37 – 43.

- Brailowski, S. (1998). Las sustancias de los sueños. Neuropsicofarmacología. La ciencia para todos. 130. Fondo de Cultura Económica. México .
- Bures, J. (1998a). Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA. En Bures, J., Bermúdez – Rattoni, F., & Yamamoto, T. Conditioned taste aversión. Memory of a special kind. Oxford University Press. New York.
- Bures, J. (1998b). The CTA paradigm: terminology, methods, and conventions. En Bures, J., Bermúdez – Rattoni, F., & Yamamoto, T. Conditioned taste aversión. Memory of a special kind. Oxford University Press. New York.
- Burns, L.H., Everitt, B.J., & Robbins, T.W. (1994). Antagonist AP5 impairs acquisition but not performance of discriminated approach to an appetitive CS. Behavioral and Neural Biology. 61: 242-250.
- Cammarota, M., Barros, D.M., Vianna, M.R., Bevilaqua, L.R., Coitinho, A., Szapiro, G., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., & Izquierdo, I. (2004). The transition from memory retrieval to extinction. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 76 (3): 573 – 582.
- Carew, T.J., Walters, E.T., & Kandel, E.R. (1981). Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *Aplysia Californica*. The Journal of Neuroscience. 1(12): 1426 – 1437.
- Carlson, N.R. (2007). Physiology of behavior. 9th ed. Pearson – Allyn and Bacon. Boston.
- Cell Signaling (2009, september). Dopamine signaling in Parkinson's disease. Revisado en marzo 2010 en http://www.cellsignal.com/reference/pathway/parkinsons_disease.html
- Cooper, S.J. (2005). Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 28: 851-874.
- Cui, Z., Lindl, K.A., Mei, B., Zhang, S., and Tsien, J.Z. (2005). Requirement of NMDA receptor reactivation for consolidation and storage of nondeclarative taste memory revealed by inducible NR1 knockout. European Journal of Neuroscience. 22: 755 – 763.
- Darwin, C. (1996). The origin of species. Oxford University Press. Oxford. Originally published in 1859.
- De la Cruz, V., Rodriguez – Ortiz, C.J., Balderas, I., & Bermudez – Rattoni, F. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive memories. European Journal of Neuroscience. 28: 1377 – 1381.
- Diekelman, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. Nature Reviews. Neuroscience. 11 (2): 114 – 126.
- Dopamine signaling in Parkinson's disease (2010, abril 16). Tomado de Cell Signaling Technology website: http://www.cellsignal.com/reference/pathway/parkinsons_disease.html.
- Dudai, Y. (1989). The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends. Oxford University Press. New York.
- Dudai, Y. (1996). Consolidation: fragility on the road to the engram. Neuron. 17: 367 – 370.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long – term memories: a question of persistence. Current Opinion in Neurobiology. 12: 211 – 216.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, How stable is the engram? Annual Reviews of Psychology. 55: 51-86.

- Ego-Stengel, V., & Wilson, M.A. (2010). Disruption of ripple – associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus*. 20 (1): 1 – 10.
- Ellis, M.E., & Kesner, R.P. (1981). Physostigmine and norepinephrine: effects of injection into the amígdala on taste associations. *Physiology and Behavior*. 27: 203 - 209.
- Escobar, M.L., & Bermúdez – Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*. 852: 208-212.
- Escobar, M.L., Alcocer, I., & Chao, V. (1998). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Research*. 812: 246-251.
- Escobar, M.L., Chao, V., & Bermúdez – Rattoni, F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*. 779: 314-319.
- Fernández, J., Miranda, M.I., Bermúdez-Rattoni, F., & Drucker – Colín, R. (1993). Effects of catecholaminergic depletion of the amígdala and insular cortex on the potentiated odor by taste aversión. *Behavioral and neural biology*. 60: 189 – 191.
- Fernández, J., & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Clasificación de la memoria. En Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, R. A. *Memoria: dónde reside y cómo se forma*. Trillas. México.
- Ferreira, G., Miranda, M.I., De la Cruz, V., Rodríguez – Ortiz, C.J., & Bermúdez – Rattoni, F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversión trough NMDA receptor activation in the insular cortex. *European Journal of Neuroscience*. 22: 2596 – 2604.
- Ferry, B., & McGaugh, J.L. (1999). Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post – training enhances retention in an inhibitory avoidance task.. *Learning and Memory*. 72(1): 8 – 12.
- Ferry, B., & McGaugh, J.L. (2008). Involvement of basolateral amygdala alpha2 – adrenoreceptors in modulating consolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning and Memory*. 14(4): 238 – 243.
- Figuroa-Guzmán, Y., & Reilly, S. (2008). NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Research*. 12(10):200 - 203.
- Fitzgerald, R.E., & Burton, M.J. (1983). Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. *Physiology and Behavior*. 30: 203 – 206.
- Flexner, L.B., Flexner, J.B., Roberts, R.B. & De la Haba, G. (1964). Loss of recent memory in mice as related to regional inhibition of cerebral protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science*. 52: 1165 – 1169.
- Fontanini, A., Grossman, S.E., Figuroa, J.A, & Katz, D.B. (2009). Distinct subtypes of basolateral amygdala taste neurons reflect palatability and reward. *The Journal of Neuroscience*. 29 (8): 2486 – 2495.
- Gais, S., & Born, J. (2004). Declarative memory consolidation: mechanisms acting during human sleep. *Learning and Memory*. 679 - 685.
- Gallo, M. Roldan, G., & Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*. 52: 91 – 97.

- Galvez, R., Mesches, M.H., & McGaugh, J.L. (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 66: 253-257.
- Garcia, J., Kimeldorf, D.J., and Koelling, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*. 122: 157 – 158.
- Gean, P., Huang, C., Lin, J., & Tsai, J. (1993). Sustained enhancement of NMDA receptor – mediated synaptic potential by isoproterenol in rat amygdalar slices. *Brain Research*. 594: 331 – 334.
- Gutiérrez, H., Hernández – Echegaray, V., Ramírez – Amaya, V., & Bermúdez – Rattoni, F. (1999). Blockade of N – methyl – D – aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*. 89(3): 751 – 758.
- Guzmán-Ramos, K.R., & Bermúdez – Rattoni, F. (2007). Dopamine and glutamate release response in the insular cortex during conditioned taste aversion learning. *Journal of Neurochemistry*. 102 (Suppl 1): 53.
- Guzmán-Ramos, K.R., Díaz-Medina, V., Bautista, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (2008). Off-line transient glutamatergic activity in the insular cortex is necessary for memory long term consolidation. Program No. 259.21. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.
- Harley, C.W. (2004). Norepinephrine and dopamine as learning signals. *Neural Plasticity*. 11 (3-4): 191 – 204.
- Hassel, B. & Dingledine, R. (2006). Glutamate. En Siegel, G.J. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 7th ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam.
- Hawkins, R.D., Kandel, E.R., & Bailey, C.H. (2006). Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. *Biological Bulletin*. 210: 174 – 191.
- Hebb, D.O. (1949) *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. J. Wiley. New York.
- Herrero, I., & Sánchez – Prieto, J. (1996). cAMP – dependent facilitation of glutamate release by β – adrenergic receptors in the cerebrocortical nerve terminals. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(48): 30554 – 30560.
- Hoffman, K.L., & McNaughton, B.L. (2002). Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. *Science*. 297: 2070- 2073.
- Holz, R.W., & Fisher, S.K. (2006). Synaptic transmission and cellular signaling: and overview. En Siegel, G.J. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 7th ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam.
- Huang, C., Hsu, K., & Gean, P. (1996). Isoproterenol potentiates synaptic transmission primarily by enhancing presynaptic calcium influx via P – and/or G – type calcium channels in the rat amygdala. *The Journal of Neuroscience*. 16(3): 1026 – 1033.
- Huang, C., Lin, C., & Gean, P. (1993). Enhancement of NMDA receptor – mediated synaptic potential by isoproterenols is blocked by Rp – adenosine 3', 5' - cyclic monophosphothioate. *Neuroscience Letters*. 161: 207 – 210.

Huang, C., Lin, C., & Gean, P. (1998). Potentiation of N-methyl-D-aspartate currents by isoproterenol in the acutely dissociated rat amygdalar neurons. *Neuroscience Letters*. 253: 9 – 12.

Huang, T., McDonough, C.B., & Abel, T. (2006). Compartmentalized PKA signaling events are required for synaptic tagging and capture during hippocampal late – phase long – term potentiation. *European Journal of Cell Biology*. 85: 635 – 642.

Inglis, F.M., & Moghaddam, B. (1999). Dopaminergic innervations of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*. 72: 1088 – 1094.

Jadhav, S.P., & Frank, L.M. (2009). Reactivating memories for consolidation. *Neuron*. 62 (6):745 – 746.

Kandel, E.R., & Schwartz, J.H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*. 218: 433 – 443.

Kandel, E.R., & Siegelbaum, S.A. (2000). Overview of synaptic transmission. En Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. *Principles of neural science*. 4th ed. McGraw Hill. New York.

Kandel, E.R., Kupfermann, I., & Iversen, S. (2000). Learning and memory. En Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. *Principles of neural science*. 4th ed. McGraw Hill. New York.

Karlson, M.P., & Frank, L.M. (2009). Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nature Neuroscience*. 12(7): 913 – 918.

Kesner, R.P., Berman, R.F., & Tardif, R. (1992). Place and taste aversion learning: Role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala. *Brain Research Bulletin*. 29: 345 – 353.

Kolb, B., Nonneman, A.J., & Abplanalp. (1977). Studies on the neural mechanisms of bait-shyness in rats. En Fitzgerald, R.E., and Burton, M.J. *Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex*. *Physiology and Behavior*. 30: 203 – 206.

Konorski, J. (1948). Conditioned reflexes and neuron organization. En Mackintosh, N.J. *Animal learning and cognition*. 2nd ed. Academic Press. San Diego.

Kuhar, M.J., Minneman, K., & Muly, E.C. (2006). Catecholamines. En Siegel, G.J. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 7th ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam.

Lashley, K.S. (1930). Basic neural mechanisms in behavior. *Psychological Review*. 37: 1 – 24.

Li, C.S., Cho Y.K., & Smith, D.V. (2004). Modulation of parabrachial taste neurons by electrical and chemical stimulation of the lateral hypothalamus and amygdala. *Journal of Neurophysiology*. 93: 1183 – 1196.

Longordo, F., Kopp, C., and Lüthi, A. (2009). Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function. *The European Journal of Neuroscience*. 29(9): 1810 – 1819.

Mackintosh, N.J. (1994). *Animal learning and cognition*. 2nd ed. Academic Press. San Diego.

Masugi M, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, Sansig G, van der Putten H, & Nakanishi S. (1999). Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *Journal of Neuroscience*. 19 (3): 955 – 963.

- Mayford, M., Abel, T., & Kandel, E.R. (1995). Transgenic approaches to cognition. *Current Opinion in Neurobiology*. 5(2): 141 – 148.
- Mazur, J.E. (2006). *Learning and behavior*. 6th. ed., Pearson - Prentice Hall. New Jersey.
- McDonald, A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*. 55: 257 – 332.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory. A century of consolidation. *Science*: 287. 248 – 287.
- McGaugh, J.L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*. 12: 205 – 210.
- Micheau, J., & Riedel, G. (1999). Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 534 – 548.
- Miranda, M.I., Ferreira, G., Rámirez – Lugo, L., & Bermúdez – Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amígdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99 (17): 11417 – 11422.
- Miranda, M.I., LaLumiere, R.T., Buen, T.V., Bermúdez – Rattoni, F., & McGaugh, J.L. (2003). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *European Journal of Neuroscience*. 18: 2605 – 2610.
- Miranda, M.I., Rodríguez – García, G., Reyes – López, J.V., Ferry, B., & Ferreira, G. (2008). Differential effects of β -adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory*. 90: 54 – 61.
- Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanisms of neuronal plasticity: Induction and maintenance of Long – Term Potentiation in the hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*. 100: 443 – 442.
- Montag – Sallaz, M., & Montag, D. (2003). Learning - induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learning & Memory*. 20:99 - 107.
- Morilak, D.A., Barrera, D., Echevarria, D.J., Garcia, A.S., Hernández, A., Ma, S., & Petre, C.O. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 29:1214 -1224.
- Nachman, M., & Ashe, J.H. (1974). Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions and sodium appetite in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 87 (4): 622 – 643.
- Nishijo, H., Uwano, T., Tamura, R., & Ono, T. (1998). Gustatory and multimodal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. *Journal of Neurophysiology*. 79: 21- 36.
- Paré, D., Collins, D.R., & Pelletier, J.G. (2002). Amygdala oscillations and the consolidations of emotional memories. *Trends in cognitive sciences*. 6(7): 306 - 314.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998) *The rat brain*. 4th. Ed. Academic Press. San Diego.
- Peigneux, P., Orban, P., Balteau, E., Degueldre, C., Luxen, A., Laureys S., v Maquet, P. (2006). Offline persistence of memory-related cerebral activity during active wakefulness. *Plos Biology*. 4(4): 647 – 658.

- Pérez de la Mora, M., Gallegos – Cari, A., Arizmendi – García, Y., Marcellino, D., and Fuxe, K. (2009). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*. 985: article in press.
- Pfister, H.P. (1979). The glucocorticosterone response to novelty as a psychological stressor. *Physiology and Behavior*. 23: 649 – 652.
- Pigino, G., Morfini, G., & Brady, S.T. (2006). Intracellular trafficking. En Siegel, G.J. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 7th ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam.
- Pitkänen, A., Jolkkonen, E., & Kemppainen, S. (2000). Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphology* 59 (1): 1 – 23.
- Prado - Alcalá, R., & Quirarte, G. (2007). La consolidación de la memoria, un siglo después. *Revisión en Neurociencia*. 45: 284 - 292.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A., McNamara, J.O., & White, L.E.. (2008). *Neuroscience*. 4th ed. Sianuer Associates. Massachusetts.
- Quirate, G.L., Galvez, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J.L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*. 808: 134 – 140.
- Raman, I.M., Tong, G., & Jahr, C.E. (1996). β – adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP – dependent protein kinase. *Neuron*. 16: 415 – 421.
- Ramírez – Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P.F., & Barnes, C.A. (2005). Spatial exploration - induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network - specific reactivation. *The Journal of Neuroscience*. 25(7): 1761 – 1768.
- Rasch, B., & Born J. (2007). Maintaining memories by reactivation. *Current Opinion in Neurobiology*. 17: 698 – 703.
- Reilly, S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversión. *Brain Research bulletin*. 48(3): 239 – 254.
- Reilly, S., & Bornovalova, M.A. (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: A critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 29: 1067 – 1088.
- Ribeiro, S., & Nicolelis, M.A. (2004). Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep. *Learning and Memory*. 686 – 696.
- Ritter, S., McGlone, J.J., & Kelley, K.W. (1980). Absence of lithium-induced taste aversion after area postrema lesion. *Brain Research*. 201: 501 – 506.
- Roberts, W.A. (1998). *Principles of animal cognition*. McGraw – Hill. New York.
- Roldan, G. & Bures, J. (1994). Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*. 65: 213 – 219.
- Rollins, B.L., Stines, S.G. McGuire, H.B., & King, B.M. (2001). Effects of amygdala lesions on body weight, conditions taste aversion, and neophobia. *Physiology and Behavior*. 72(5): 735 – 742.

- Roosendaal, B., & Cools, A.R. (1994). Influence of the noradrenergic state of the nucleus accumbens in basolateral amygdala mediated changes in neophobia of rats. *Behavioral Neuroscience* 108(6): 1107 - 1118.
- Rosenzweig, M. R., & Bennett, E.L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioral Brain Research*. 78: 57 – 65.
- Sah, P, Faber, E.S., López de Armentia, M. & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*. 83: 803 – 834.
- Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*. 7: 73 – 84.
- Sara, S.J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*. 10(3): 211 – 223.
- Schafe, G.E., & Bernstein, I.L. (1983). Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. *Brain Research*. 741: 109 -116.
- Shettleworth, S.J. (1994). Biological approaches to the study of learning. En Mackintosh, N.J. *Animal learning and cognition*. 2nd ed. Academic Press. San Diego.
- Siegelbaum & Koester. (2000). Ion channels. En Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. *Principles of neural science*. 4th ed. McGraw Hill. New York.
- Simonyi, A., Serfozo, P., Parker, K.E., Ramsey, A.K., & Schachtman, T.R. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 in conditioned taste aversion learning. *Neurobiology of Learning and Memory*. 92 (3): 460 - 463.
- Skaggs, W.E., & McNaughton, B.L. (1996) Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. *Science*. 271: 1870 – 1873.
- Snyder, G.L., Fienberg, A.E., Huganir, R.L., and Greengard, P. (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine – and – cAMP – regulated phosphoprotein (M_r 32 kDa)/protein phosphatase – 1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience*. 18(24): 10297 – 10303.
- Squire, L.R. (1987) *Memory and brain*. Oxford University Press. New York.
- Squire, L.R., and Zola, S.T. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Science*. 93: 13515 – 13522.
- Stickgold, R., and Walker, M. (2005). Memory consolidation and reconsolidation: What is the role of sleep. *Trends in Neurosciences*. 28(8): 407- 415.
- Tanaka, T, Yokoo, H., Mizoguchi, K., Yoshida, M., Tsuda, A., & Tanaka, M. (1991). Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. *Brain Research*. 554: 174-176.
- Tolman, E. C. (1922) A new formula for behaviorism. *Psychological Review*, 29: 44-53.
- Tronel, S., Feenstra, M.G. & Sara, S.J. (2004). Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learning and Memory*. 11: 453-458.

- Tucci, S., Rada, P., & Hernandez, L. (1998). Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Research*. 813: 44- 49.
- Tully, K., Li, Y., & Bolshakov, V.Y. (2007). Keeping in check painful synapses in central amygdala. *Neuron*. 56 (5): 880 – 892.
- Tulving, E. (2000). Introduction. En Gazzaniga, M.S. *The new cognitive neurosciences*. 2nd ed. MIT Press, Massachusetts.
- Vacaflor, L. Lithium side effects and toxicity: the clinical picture. En Ritter, S. et al., (1980). Absence of lithium-induced taste aversion after area postrema lesion. *Brain Research*. 201: 501-506.
- Valencia, V.M. (2008). El papel de la memoria según Aristóteles. Tesis de Licenciatura. Facultad de filosofía y letras. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wang, H., Hu, Y., & Tsien, J.Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*. 79: 123 – 135.
- Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H.P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioral Brain Research*. 125: 205 – 213.
- Wilson, M.A., & McNaughton, B.L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*. 265: 676 – 679.
- Yamamoto, T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology*. 69(4): 243 - 255.
- Yamamoto, T., Noritaka, S., Sakai, N., & Iwafune, A. (1997). Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neuroscience letters*. 226: 127 – 130.
- Yamamoto, T., Tsuyoshi, S., Noritaka, S., Yasunobu, Y., & Nobuyaki, S. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Research*. 65: 123 – 137.
- Yasoshima, Y., Morimoto, T., & Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expresión of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Research*. 869: 15 – 24.
- Yokoyama, M., Suzuki, E., Sato, T., Maruta, S., Watanabe, S., & Miyaoka, H. (2005). Amygdalic levels of dopamine and serotonin rise upon exposure to conditioned fear stress without elevation of glutamate. *Neuroscience Letters*. 379: 37 – 41.