



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Neuroquímica de la adquisición y  
consolidación de la memoria gustativa  
de aversión en la corteza insular y  
amígdala**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. KIOKO RUBÍ GUZMÁN RAMOS**

DIRECTOR DE TESIS

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO, D.F.

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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Federico Bermúdez Rattoni en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectos: 42657/A-1 y 60478 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) proyectos: IN220706 y IN216709.

Durante mis estudios en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas recibí la beca nacional del CONACYT (172746) y apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

Agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattoni su asesoría y apoyo a lo largo de mi estancia doctoral; especialmente agradezco su confianza e interés en mi desempeño profesional. Mi crecimiento académico ha sido en gran medida debido a sus consejos y a la oportunidad de trabajar en su grupo.

También agradezco a la Dra. Clorinda Arias Álvarez y al Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia, miembros de mi comité tutorial, por sus valiosos consejos durante mi doctorado.

Agradezco a los miembros del Jurado integrado por los Dres. Federico Bermúdez Rattoni, Miguel Pérez de la Mora, Ranier Gutiérrez Mendoza, Martha Lilia Escobar Rodríguez y Rosalinda Guevara Guzmán, por la revisión y los comentarios hechos a esta tesis.

Durante el desarrollo de mi proyecto doctoral se contó con el apoyo del Bioterio, la Unidad de Videoconferencia y de las técnicas académicas Israela Balderas y Perla Moreno, así como la invaluable ayuda de Oreste Carbajal.

Por último, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de crecer académica y personalmente.

# INDICE

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Aprendizaje y memoria.....	2
Memoria a corto y largo plazo .....	2
Consolidación.....	4
Reactivación y consolidación.....	6
<b>II. CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR     COMO MODELO DE ESTUDIO.....</b>	<b>8</b>
Neuroanatomía del aprendizaje del CAS	
<i>Procesamiento del estímulo gustativo.....</i>	9
<i>Procesamiento del estímulo visceral (malestar gástrico).....</i>	9
Corteza Insular.....	10
<i>Conexiones aferentes y eferentes.....</i>	11
Amígdala.....	12
<i>Grupo basolateral.....</i>	12
<i>Grupo Centro-medial.....</i>	14
<i>Conexiones intra-amigdalares.....</i>	14
<i>Aferencias y eferencias.....</i>	15
Eferencias.....	15
Aferencias.....	16
<b>III. ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
Sistemas de neurotransmisión involucrados en el aprendizaje gustativo.....	18
<i>Corteza insular</i>	
Sistema glutamatérgico.....	18
Sistema GABAérgico.....	19
Sistema noradrenérgico.....	19
Sistema dopaminérgico.....	20
<i>Amígdala</i>	21

Sistema glutamatérgico.....	21
Sistema GABAérgico.....	21
Sistema noradrenérgico.....	21
Sistema dopaminérgico.....	22
Interacción amígdala – corteza insular.....	22
Reactivación y consolidación del CAS.....	23
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>24</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>VI. OBJETIVO.....</b>	<b>25</b>
<b>VII. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
1. Animales.....	26
2. Implantación de cánulas guía.....	26
3. Microdiálisis en libre movimiento.....	26
4. Cuantificación de neurotransmisores por electroforesis capilar.....	28
4.1. Procedimiento de derivatización.....	29
4.2. Separación y detección.....	30
4.3. Cuantificación.....	30
5. Protocolo conductual para el condicionamiento de aversión al sabor..	31
6. Administración intracerebral de fármacos.....	31
7. Western blot.....	32
8. Histología.....	32
9. Análisis estadístico.....	33
<b>VIII. RESULTADOS</b>	
1. Caracterización de las señales relacionadas con el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado en la corteza insular.....	34
Receptores que participan en la corteza insular.....	38
2. Monitoreo de la liberación de neurotransmisores en la corteza insular durante la etapa postadquisición.....	43
Participación en la etapa postadquisición de los receptores NMDA y D1 en la consolidación de la memoria del CAS.....	47
Papel de PKA en la sinergia NMDA-D1.....	48
3. Participación de la amígdala en la reactivación neuroquímica de la corteza insular y la consolidación del CAS.....	50

4. Monitoreo de la liberación de neurotransmisores en la amígdala durante la etapa post-adquisición.....	52
Participación en la etapa post-adquisición de los receptores NMDA y $\beta$ -adrenérgicos en la consolidación del CAS.....	57
5. Inducción del CAS en ausencia de LiCl: Importancia de los receptores NMDA en la formación de la memoria.....	59

## IX. DISCUSIÓN

Señales relacionadas con el estímulo gustativo nuevo: Corteza insular.....	62
Señales relacionadas con el estímulo gustativo nuevo: Amígdala.....	64
Señales relacionadas con el estímulo visceral.....	65
Papel de la actividad post-adquisición en la consolidación de la memoria.....	66
Actividad post-adquisición en la corteza insular: Sinergia D1-NMDA.....	67
¿Cómo se produce la reactivación off-line en la amígdala y corteza insular?.....	68
Actividad post-adquisición en la amígdala: papel de los receptores NMDA y $\beta$ -adrenérgicos.....	69
¿Puede un sabor volverse aversivo en ausencia de malestar gástrico?.....	72

X. CONCLUSIONES.....	74
----------------------	----

XI. REFERENCIAS.....	77
----------------------	----

## ANEXO

*Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation*

## RESUMEN

La memoria permite a los organismos interactuar con el ambiente, adaptándose a los cambios que se le presenten mediante la eficiente adquisición, consolidación y evocación de información. Un modelo ampliamente utilizado para estudiar la memoria es el condicionamiento de aversión al sabor (CAS), en el cual un animal aprende a asociar el sabor de un alimento con consecuencias gástricas adversas. Esta experiencia dará como resultado una memoria de aversión que persiste por largo tiempo con el fin de salvaguardar la integridad del animal. Cada día se conoce más acerca de los mecanismos celulares que subyacen la adquisición y el establecimiento a largo plazo de esta tarea lo cual ha permitido comenzar a comprender los procesos que se llevan a cabo durante la formación de la memoria en general. En la presente tesis nos aproximamos al estudio de la formación de la memoria mediante el monitoreo de los cambios extracelulares de algunos neurotransmisores (glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), norepinefrina (NE) y dopamina (DA)). Mostramos que el estímulo gustativo nuevo se relaciona con un incremento en la DA extracelular en la corteza insular (CI), esta señal dopaminérgica actúa a través de los receptores D1 como parte del proceso de consolidación del CAS; mientras que la señal glutamatérgica actúa a través de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr), tanto en CI como en la amígdala, para señalar el malestar gástrico inducido por una inyección i.p. de LiCl. En la amígdala también participa la NE activando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos durante la estimulación visceral. Sin embargo también encontramos que existen cambios extracelulares en estas estructuras en etapas post-adquisición, las cuales están relacionadas con la consolidación de la memoria. En la CI existe una liberación concomitante de DA y glutamato, dependiente de amígdala, mientras que en esta estructura, existe un incremento de NE y glutamato en tiempos muy similares. Nuestros datos sugieren que dichas señales de reactivación actúan sinérgicamente en ambas estructuras modulando, en parte a través de PKA, la actividad de los NMDAr, la cual es necesaria para el proceso de estabilización del trazo tanto en CI como en amígdala. Con esta información, estudiamos el efecto de la activación exógena de los receptores NMDA en la CI y en la amígdala, sustituyendo tanto la señal glutamatérgica que se presenta con la inducción de malestar gástrico, como la señal post-adquisición. Con estas manipulaciones farmacológicas en amígdala, logramos inducir un CAS débil en ausencia de malestar gástrico, enfatizando así la importancia de la señal glutamatérgica post-adquisición. Podemos decir que nuestros datos apoyan la idea de que varias estructuras deben estar co-activas después de la estimulación que genera un trazo de memoria para contribuir, mediante la reactivación neuroquímica, a la estabilización progresiva de este trazo.



## ABSTRACT

Memory allows the interaction of the organisms with their environment by adaptation to several changes through effective acquisition, consolidation and retrieval of the information. A widely used model for the study of memory processes is conditioned taste aversion (CTA), in CTA learning paradigm animals learn to avoid certain taste that was paired with digestive malaise. This experience enables the animals to ensure its survival. Each day we know more about the cellular mechanisms beneath the acquisition and long term establishment of this task, moving toward a better understanding of the general memory process. In this thesis we approached to the study of memory formation processes by monitoring extracellular changes of some neurotransmitters (glutamate,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), norepinephrine (NE) and dopamine (DA)). We found that novel taste stimuli relates to an increment in extracellular DA in the insular cortex (IC), this dopaminergic signal take action through D1 receptors as part of CTA consolidation process; whereas the glutamatergic signal acts through N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr) in both the IC and the amygdala, to indicate the induction of gastric malaise by i.p. injection of LiCl. The gastric malaise is also related to an increase in amygdalar NE acting through  $\beta$ -adrenergic receptors. However, we also found extracellular changes in these structures in post-acquisition stages. For instance, within the IC a concomitant increment of DA and glutamate takes place in conditioned animals and these increments dependent on amygdalar activity. This latter structure also shows neurochemical reactivations of glutamate and NE that temporally match with those shown in the IC. Our data suggests that such reactivation signals act together modulating, in part through PKA, NMDAr activity which is necessary for memory trace stabilization in the IC and the amygdala. With this information, we studied the effect of exogenous activation of NMDAr in the IC and the amygdala, in substitution of the glutamatergic signal related to the malaise induction, as well as the post-acquisition glutamatergic signal. These pharmacological manipulations in the amygdala allowed us to induce a weak CTA memory without any gastric or visceral stimulation, stressing the importance of the glutamatergic signals in post-acquisition periods. We can say that our data support the idea that several structures co-activate after sensory stimulation that leads to trace memory formation to contribute through neurochemical reactivation to progressive memory trace stabilization

## ABREVIATURAS

ABL	amígdala basolateral
ABM	subdivisión basomedial de la amígdala
AC	adenilato ciclasa
ACe	amígdala central
ACeM	subdivisión centromedial de la amígdala
AI	corteza insular agranular
AL	subdivisión lateral
AMPA	a-amino-3-hidroxi-S-metil-4-isoxazol propionato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
APV	ácido DL-amino-5-fosfovalérico
AVT	área ventral tegmental
CaMKII	cinasa dependiente de Ca <sup>2++</sup> /calmodulina
CAS	condicionamiento de aversión al sabor
CBP	proteína de unión a CREB
CeC	subdivisión capsular de la ACe
Cel	subdivisión intermedia de la ACe
CeL	subdivisión lateral de la ACe
CeM	subdivisión medial de la ACe
CI	corteza insular
CPP	ácido 3-2-carboxipiperacina-4-il-propil-1-fosfónico
CRE	elemento responsivo a AMPc
CREB	proteínas de unión a CRE
DA	dopamina
DI	corteza insular disgranular
DV	dorsoventral
EC	estímulo condicionado
EC	electroforesis capilar
EI	estímulo incondicionado
EPSC	corrientes excitatorias post-sinápticas
FQ	3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído
GABA	ácido g-aminobutírico
GI	corteza insular granular
HL	hipotálamo lateral
IEGs	genes de expresión inmediata
L	lateral
LC	locus coeruleus
LCRA	líquido cefaloraquídeo artificial
LiCl	cloruro de litio
mca	arteria cerebral media

MCP	memoria a corto plazo
MECK	cromatografía electrocinética micelar
mGluRs	receptores metabotrópicos activados por glutamato
MLP	memoria a largo plazo
NE	norepinefrina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPBd	núcleo parabraquial dorsolateral
NPBe	núcleo parabraquial externo-lateral
NTSc	núcleo del tracto solitario central
NTSr	núcleo del tracto solitario rostral
PKA	cinasa dependiente de AMPc
PLP	potenciación a largo plazo
RC	respuesta condicionada
rhv	vena rinal
SDS	duodecil sulfato de sodio
SWS	sueño de ondas lentas
TTX	tetrodotoxina
VPL	tálamo ventroposterolateral
VPM	tálamo ventroposteromedial

# I. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de lo que sabemos es adquirido a través de la experiencia y mantenido a través de la memoria, desde nuestro nombre y las caras de nuestros familiares, hasta cómo tocar un instrumento. Como resultado, somos lo que somos en gran medida gracias a lo que aprendemos y recordamos. Sin embargo, la memoria no solo simboliza un registro personal de conocimientos, sino que también nos permite progresar, pensar y comportarnos de nuevas formas.

Mientras que la memoria es esencial para muchos de los aspectos positivos de la experiencia humana, también es cierto que varios problemas psicológicos y emocionales resultan, al menos en parte, de las memorias almacenadas. Estos problemas pueden desarrollarse a menudo como respuesta a experiencias tempranas durante la vida que influyen en la manera habitual de interactuar con el mundo (Kashdan *et al.* 2010). Así mismo, varios desordenes neurológicos y neuropsiquiátricos se relacionan con alteraciones en las habilidades cognitivas donde la pérdida de la memoria conlleva a la pérdida de la individualidad, de la historia personal y la pérdida de las relaciones interpersonales. El estrés post-traumático, el desorden de depresión mayor, el síndrome de Cushing (que se caracteriza por una sobre secreción de glucocorticoides) (Conrad 2008, Dere *et al.* 2010, Kashdan *et al.* 2010), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la de Alzheimer (Klempir *et al.* 2009, Leverenz *et al.* 2009, Nelson *et al.* 2009) son algunos ejemplos.

A medida que las bases celulares y moleculares de la formación de la memoria se comprenden mejor, es posible conocer la causa de los déficits cognitivos y así desarrollar tratamientos que algún día no sólo alivien los síntomas, sino que prevengan la enfermedad o disminuyan su progresión. De esta forma, la investigación básica ha permitido generar conocimiento útil que ha ayudado a formar modelos y teorías que mejor expliquen su funcionamiento, acercándonos cada vez más a una descripción detallada de este proceso.

## APRENDIZAJE Y MEMORIA.

A través del aprendizaje, los organismos pueden hacerle frente a los retos creados por cambios en el medio ambiente (Chance 1999). El *aprendizaje* involucra la codificación de los estímulos para la adquisición de información o experiencias. La *memoria* es en gran medida un proceso molecular a través del cual se almacena y mantiene la representación de dichas experiencias en un estado que permita la evocación de la información y su influencia en el comportamiento (Rudy 2008).

Para su estudio y caracterización, el proceso mnemónico puede dividirse en tres etapas:

- 1) *Adquisición*: Durante esta etapa, los organismos obtienen información acerca de los estímulos a los cuales están expuestos durante su interacción con el medio ambiente; se considera que es la etapa de aprendizaje.
- 2) *Consolidación*: Se refiere al proceso de estabilización progresiva de la memoria cuyos mecanismos moleculares involucran la síntesis de proteínas necesarias para dicha estabilización (Dudai 2004).
- 3) *Evocación*: Recuperación voluntaria o espontánea de la información adquirida y almacenada.

Otra caracterización de la memoria se ha hecho de acuerdo a su duración.

## MEMORIA DE CORTO Y LARGO PLAZO

A finales del siglo XIX Hermann Ebbinghaus estudió por primera vez sistemáticamente el proceso mnemónico proporcionando información experimental que permitió clasificar la memoria de acuerdo a su duración. Llevó a cabo varios estudios en los cuales midió la retención de sílabas de tres letras sin sentido (consonante-vocal-consonante) para prevenir la influencia de significados

preexistentes. Ebbinghaus mostró que la información persiste por un tiempo limitado (varios minutos) y que con la repetición de la información ésta puede durar días. Posteriormente, en 1890 William James propuso que la memoria es una secuencia de procesos: una etapa inicial, que llamó “memoria primaria”, vista como la representación persistente de la información y la “memoria secundaria” que contiene el registro de experiencias que han permanecido y que pueden ser evocadas más tarde (Rudy 2008). De esta forma se generaron las raíces de la distinción moderna de estos tipos de memoria, una con una duración de minutos u horas “memoria de corto plazo” (MCP) y a aquellas que duran meses o años, la “memoria de largo plazo” (MLP).

A finales de los 60's se formularon varios modelos que describían el flujo de información durante la formación de la memoria, el más característico es el llamado modelo modal, propuesto por Atkinson y Shiffrin en 1968. Este modelo asume que la información es procesada por un rango de almacenes sensoriales y posteriormente pasa a un almacén de corto plazo de capacidad limitada donde es retenida a través de la repetición y mientras más tiempo dicha información sea retenida, incrementa la probabilidad de que sea transferida al almacén a largo plazo cuya capacidad de almacenaje es mucho más amplio (Baddeley 1999).

Así como este modelo supone que el primer almacén es estrictamente necesario para que la información pase al segundo, se ha asumido que la MCP y la MLP son procesos seriales, sin embargo existe evidencia de que estos procesos pueden llevarse a cabo paralela e independientemente. Shallice y Warrington (1970) describieron el caso de un paciente, K.F., que sufrió una lesión en el hemisferio izquierdo del cerebro en un área cercana a la fisura de Silvio donde típicamente se localiza el control del lenguaje. El paciente duda un poco en su forma de hablar, sin embargo no presentaba afasia. Tenía gran dificultad en la repetición y su memoria inmediata estaba limitada al aprendizaje de dos o tres dígitos; además, una prueba de reconocimiento no verbal también indicó que tenía serios problemas con la memoria de trabajo<sup>1</sup>; sin embargo, reportaron que su memoria a largo plazo del mismo material parecía normal (Baddeley 1999).

---

<sup>1</sup> Retención temporal de información para realizar una acción prospectiva o resolver un problema en el corto plazo. Baddeley, A. (1999) *Human memory, theory and practice*. Psychology Press, East Sussex, UK.

Adicionalmente, Izquierdo y colaboradores reportaron que la administración de bloqueadores o agonistas de varios sistemas de neurotransmisión en la corteza entorrinal y el hipocampo dorsal afectan la formación de la MCP sin alterar la MLP (Izquierdo *et al.* 1998a). En conjunto, esta evidencia indica que la MCP no es un paso necesario hacia la MLP y que podrían ser procesos que se llevan a cabo separadamente.

A pesar de las diferencias en estos modelos, en ambos se reconoce que la MCP decae relativamente rápido y es transitoria, mientras que la MLP decae a una velocidad menor y permanece días, meses o incluso toda la vida “estabilizándose” a través de la consolidación.

## CONSOLIDACIÓN

Dos investigadores alemanes, George Müller y Alfons Pilzecker reportaron que la formación de una memoria estable es interrumpida si se expone a nuevos estímulos poco después de la adquisición inicial. Esto llevó a la noción de que las memorias son lábiles en su etapa inicial y se estabilizan a través del tiempo, proceso llamado *consolidación* (Lechner *et al.* 1999). Estudios extensivos han confirmado que las memorias recientemente formadas son susceptibles a una variedad de manipulaciones post-adquisición como choques electroconvulsivos (McGaugh & Alpern 1966) e inhibidores de síntesis de proteínas (Dudai 2004). Los efectos de dichas manipulaciones disminuyen conforme incrementa el intervalo de tiempo entre la adquisición y la intervención.

El término “consolidación” se refiere a dos tipos de procesos: uno es conocido como consolidación celular, que se lleva a cabo dentro de los primeros minutos u horas después de la adquisición y se refiere a los eventos bioquímicos y moleculares que se producen en los circuitos neuronales que codifican la representación interna de la experiencia (trazo de memoria); incluyendo cambios en las vías de señalización y alteración en la síntesis de proteínas que produzcan los cambios más duraderos en las sinápsis. El otro tipo de consolidación toma semanas, meses o años para completarse y se cree que involucra cambios en las interacciones entre los circuitos neuronales o sistemas que codifican la memoria,

modificando la fuerza del trazo. A este tipo de proceso se le llama consolidación de sistemas (Dudai 2004).

Para comprender los mecanismos de la formación de la memoria a corto y largo plazo es necesario describir en términos celulares y moleculares los mecanismos empleados en la adquisición de la información y los pasos que permiten la retención y persistencia de la memoria.

El modelo estándar de la consolidación celular propone que el mantenimiento de la memoria de corto plazo involucra el tráfico de nuevos receptores y posiblemente otras proteínas en la membrana sináptica y cambios en la asociación de los receptores con el citoesqueleto para potenciar ciertas cascadas de señalización celular, así como modificaciones post-traduccionales de las proteínas sinápticas; mientras que la formación de la memoria a largo plazo requiere de la activación de factores de transcripción, modulación de la expresión de genes en las sinapsis y el cuerpo celular, reorganización de proteínas sinápticas, incluyendo receptores membranales y elementos del citoesqueleto, que en conjunto participan en la remodelación sináptica que se asume “estabiliza” el trazo de memoria. De acuerdo con esto la construcción de una memoria a largo plazo requiere de componentes moleculares diferentes o adicionales a los que requiere la memoria corto plazo donde los procesos de transcripción y traducción juegan un papel crítico. Particularmente la modulación de la expresión génica por el elemento responsivo a adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (CRE, por sus siglas en inglés) parece jugar un papel importante en la consolidación de la memoria. Esto ha sido descrito en modelos neuronales de plasticidad así como en experimentos conductuales (Benito & Barco 2010). Un ejemplo prominente es la cascada de AMPC que involucra la activación de la cinasa dependiente de AMPC (PKA, por sus siglas en inglés), la cual fosforila y activa isoformas de proteínas de unión a CRE (CREBs). CREB modula la expresión de genes regulados por CRE, incluyendo genes de expresión inmediata (IEGs) como factores de transcripción que, a su vez, regula la expresión de otros genes. Otros IEGs incluyen moléculas de adhesión celular y enzimas que controlan la degradación de proteínas intracelulares y extracelulares; otros factores de la familia CREB son críticos para varias funciones importantes del sistema nervioso central, como neurogénesis,



supervivencia neuronal y neuroprotección (Benito & Barco 2010, Carlezon *et al.* 2005, Persengiev & Green 2003, Silva *et al.* 1998).

Los procesos de síntesis neuronal que correlacionan con la consolidación y se requieren para la misma son multifásicos e involucran el reclutamiento concertado de mecanismos celulares y sinápticos. Se ha propuesto que las sinapsis activadas durante el aprendizaje son de alguna forma marcadas posiblemente por modificaciones post-traduccionales de las proteínas sinápticas o la reorganización de dichas proteínas (Frey & Morris 1997). Esto resulta en una nueva configuración sináptica, la cual por si misma podría atraer otras proteínas de la célula. Adicionalmente las proteínas sintetizadas en la sinapsis podrían fortalecer el marcaje de la misma y enviar un mensaje retrógrado para informar al núcleo acerca del cambio (Casadio *et al.* 1999).

## **REACTIVACIÓN Y CONSOLIDACIÓN**

Como parte del proceso de consolidación y para que los cambios sinápticos perduren, se ha propuesto que el trazo de memoria debe reactivarse. La teoría de la reactivación del trazo establece que existen patrones de actividad en los ensambles neuronales expresados durante una experiencia que deben ser reactivados espontáneamente durante subsecuentes periodos de inactividad conductual y los componentes del trazo de memoria que se encuentran distribuidos deben reactivarse concurrentemente en sitios corticales relevantes (Hoffman & McNaughton 2002). De acuerdo a esto, la consolidación de la memoria depende de la reactivación y reorganización de la información recientemente adquirida. Tras la codificación inicial de una experiencia sensorial, una serie de alteraciones moleculares, celulares y a nivel de sistemas se llevan a cabo de manera automática y fuera de la conciencia; dichos eventos estabilizan la representación inicial de la memoria, convirtiéndolo en un trazo de memoria de larga duración (Stickgold 2005).

Algunas teorías de la consolidación proponen que durante el sueño se orquestan patrones de reactivación en las estructuras neocorticales y otras estructuras del lóbulo temporal medial, como el hipocampo principalmente durante

el sueño de ondas lentas (SWS) (Sutherland & McNaughton 2000, Qin *et al.* 1997). Se ha observado que la tasa de disparo de aquellas células hipocampales que estuvieron activas durante la exploración de un ambiente, incrementa durante la subsecuente etapa de sueño, particularmente durante el SWS (Pavlides & Winson 1989, Wilson & McNaughton 1994). Sin embargo, existe también evidencia de que la información es mantenida y procesada durante periodos de vigilia subsecuentes al entrenamiento. Registros neuronales simultáneos en la corteza de macacos, *i.e.* corteza parietal posterior, corteza motora y cortezas somatosensorial y dorsal prefrontal revelaron que las células en estas cuatro áreas presentan incremento en los disparos neuronales después de la adquisición de una tarea y esas neuronas tenían la tendencia a co-activarse en paralelo (Deyama *et al.* 2008). Aunque no se ha distinguido una diferencia funcional entre las reactivaciones de los trazos de memoria en las etapas de vigilia y sueño, se piensa que estos procesos post-adquisición tienen como objetivo mantener, fortalecer y consolidar la información (Peigneux *et al.* 2006).

## II. **CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR COMO MODELO DE ESTUDIO**

La existencia de un organismo depende de su habilidad para mantener la homeostasis intrínseca en un mundo cambiante. La puerta para la introducción de energía y otros metabolitos necesarios para la supervivencia del organismo y para la evitación de sustratos venenosos, es el sentido del gusto.

Para consumir las sustancias necesarias y benéficas y evitar aquellas que resultan dañinas y puedan causar malestar, el organismo utiliza en gran medida el sentido del gusto y etiqueta a las sustancias como apetecibles o repulsivas. Sin embargo, la reacción del organismo a una sustancia específica está determinada por la combinación de respuestas automáticas desarrolladas durante la evolución y mecanismos de aprendizaje que son plásticos y pueden modificar el valor percibido de la comida o el alimento de acuerdo a la experiencia del individuo

Los animales, incluyendo los humanos, pueden reaccionar a varios sabores empleando dos estrategias: programación genética (preferencia por los sabores dulces, repulsión por los sabores amargos), y complejos mecanismos de aprendizaje que involucran la participación de varias estructuras del cerebro anterior (Rosenblum 2008).

El paradigma de aprendizaje gustativo más estudiado es el condicionamiento de aversión al sabor (CAS), en el cual el animal aprende a evitar un sabor previamente asociado con malestar gástrico (García 1955). En este aprendizaje asociativo el sabor nuevo es el estímulo condicionado (EC); la inducción de malestar gástrico es el estímulo incondicionado (EI) y la acción de eludir el sabor es la respuesta condicionada (RC).

El CAS presenta varias características como modelo experimental que facilitan el estudio de los procesos asociativos: Puede establecerse un CAS fuerte al aparear una sola vez el sabor con el malestar, lo que facilita la correlación entre los eventos moleculares y la memoria. También es posible formar el CAS aún cuando hayan pasado varias horas entre la exposición al sabor y la llegada del malestar, lo

que permite la separación temporal de los mecanismos de adquisición de la información acerca del sabor y los mecanismos de asociación de esa información con la información visceral (Yamamoto *et al.* 1998, Welzl *et al.* 2001, Naor & Dudai 1996). Otra ventaja es que se conocen las vías neurales que intervienen en el procesamiento de los estímulos gustativo y visceral.

## **NEUROANATOMÍA DEL APRENDIZAJE DEL CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR.**

### *Procesamiento del estímulo gustativo.*

Como se puede observar en la figura 1, en la codificación del estímulo gustativo el núcleo del tracto solitario rostral recibe aferencias gustativas primarias de la lengua vía dos nervios craneales, el facial (VII) y el glossofaríngeo (IX) con contribución del nervio vago (X) que inervan la lengua y la cara. Posteriormente la información gustativa llega al núcleo parabraquial dorsolateral en el cerebro medio, esta estructura tiene proyecciones hacia el hipotálamo lateral, stria terminalis y amígdala central y basolateral y hacia la parte parvocelular del núcleo talámico ventral posteromedial (VPMpc), éste proyecta hacia la corteza insular anterior (CI) donde se encuentra la corteza gustativa (corteza insular agranular) (Bermudez-Rattoni 2004).

### *Procesamiento del estímulo visceral (malestar gástrico).*

Respecto al estímulo visceral, el núcleo del tracto solitario caudal recibe proyecciones de las ramas hepáticas del nervio vago, que son sensibles a irritación gástrica, y del área postrema, que es sensible a toxinas presentes en la sangre; las proyecciones del núcleo del tracto solitario llegan al núcleo parabraquial externo lateral, la amígdala central y el núcleo hipotalámico paraventricular. De la porción lateral del núcleo parabraquial existen proyecciones a la parte ventral posterolateral del tálamo, que junto con la amígdala central presenta eferencias hacia la CI en su porción caudodorsal, (Fig. 1) (Bermudez-Rattoni 2004).

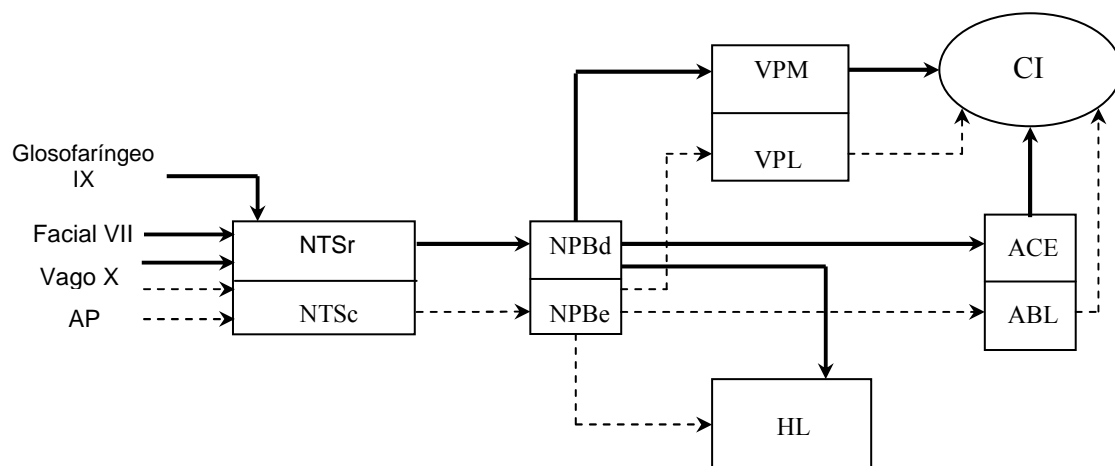


Fig. 1. Resumen de las vías de procesamiento del estímulo gustativo (flechas continuas) y del estímulo visceral (flechas discontinuas). Ver texto, NTSr = núcleo del tracto solitario rostral, NTSc = núcleo del tracto solitario central, NPBd = núcleo parabraquial dorsolateral, NPBe = núcleo parabraquial externo lateral, VPM = tálamo ventral posteromedial, VPL = tálamo ventral posterolateral, HL = hipotálamo lateral, ABL = amígdala basolateral, ACE = amígdala central, CI = corteza insular. Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004.

## CORTEZA INSULAR

La CI de la rata se encuentra situada en la intersección de la arteria cerebral media y el surco rinal. Dorsalmente está limitada por corteza somatosensorial y ventralmente por el mismo surco rinal. Citoarquitectónicamente pueden distinguirse de manera dorsoventral tres regiones, corteza granular, disgranular y agranular. La corteza granular está caracterizada por poseer una capa de células granulares (capa IV) bien desarrollada y la densidad de esta capa es resaltada por la relativamente escasa capa V directamente sobre ella. La capa III contiene células piramidales y es casi del doble de la lamina IV. La corteza disgranular se distingue por la desaparición de la lámina IV; las capas II y III son fácilmente discernibles como entidades separadas y la corteza agranular se sitúa en el labio dorsal del surco rinal, extendiéndose en sus profundidades. Es más delgada que la región disgranular y posee una banda intermedia más delgada que contiene pequeñas células piramidales (Braun *et al.* 1972, Kosar *et al.* 1986). Estudios anatómicos y electrofisiológicos indican que la región disgranular anterior de la CI está

relacionada con la modalidad gustativa, mientras que la zona granular es un área cortical viscerosensorial (Kosar et al. 1986) (ver fig. 2)

La CI está involucrada en reacciones viscerales, regulación cardiovascular y estrés (Alves et al. 2010, Yasui et al. 1991); también está involucrada en nocicepción (Hanamori et al. 1998, Ohara et al. 2003) y procesos de aprendizaje y memoria bajo diferentes modelos de estudio, como son prevención pasiva (Bermudez-Rattoni & McGaugh 1991), laberinto acuático de Morris (Gutierrez et al. 1999), reconocimiento de objetos (Bermudez-Rattoni et al. 2005) y CAS (Bermudez-Rattoni 2004, Bures J 1998).

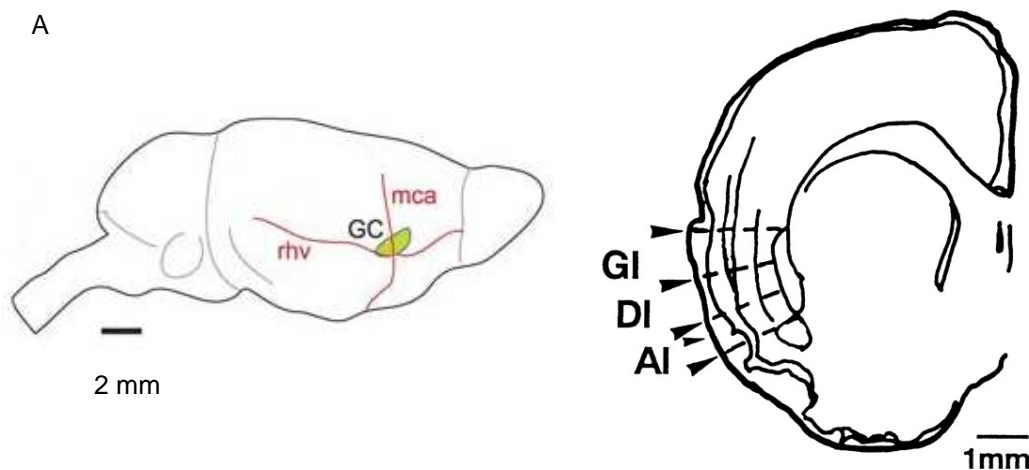


Fig. 2. (A) Localización de la corteza gustativa (GC) dentro de la corteza insular de la rata en la confluencia de la vena rinal (rhv) y la arteria cerebral media (mca) (Modificado de Acolla et al. 2007). (B) Corte coronal señalando la región granular (GI), disgranular (DI) y agranular (AI) de la corteza insular (Modificado de (Ogawa et al. 2000)

## CONEXIONES AFERENTES Y EFERENTES

La CI recibe proyecciones de acetilcolina y GABA (ácido  $\gamma$ -amino-butírico) del núcleo basalis magnocelularis; recibe proyecciones glutamatérgicas del sistema límbico incluyendo la amígdala y el núcleo mediodorsal del tálamo y de la corteza prefrontal (Bermudez-Rattoni et al. 1991), así como proyecciones noradrenérgicas de un núcleo del área dorsorostral del puente, el *locus coeruleus* (LC), que es la principal fuente de norepinefrina del sistema nervioso central (Saper 1982). También recibe aferencias dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT) (Jasmin et al. 2004, Ohara et al. 2003). Específicamente, la región agranular recibe

proyecciones talámicas del núcleo medial mediodorsal (Ray & Price 1992) mientras que las zonas disgranular y granular reciben proyecciones del núcleo paraventricular (Moga *et al.* 1995).

Por otra parte, algunas de estas conexiones parecen ser recíprocas dado que se han reportado eferencias de la CI hacia el núcleo del tracto solitario, núcleo parabraquial, así como al núcleo gustativo-visceral (medial ventrobasal) y al núcleo mediodorsal del mismo; así como proyecciones hacia la corteza prefrontal (Krushel & van der Kooy 1988, Saper 1982).

## **AMÍGDALA**

La amígdala se localiza en la porción medial del lóbulo temporal, y está comprendida por alrededor de 13 núcleos y estructuras tipo corteza. Varias de estas estructuras se han agrupado en subnúcleos de acuerdo a sus diferencias citoarquitectónicas, histoquímicas y de conectividad (Pape & Pare 2010, Sah *et al.* 2003). Se pueden distinguir tres grupos de núcleos, 1) basolateral, 2) centromedial, y 3) el grupo superficial o tipo corteza, que incluye el núcleo cortical y núcleos del tracto olfatorio lateral (figura 3). En este trabajo nos enfocaremos a los dos primeros grupos.

### **GRUPO BASOLATERAL (ABL)**

Comprende el núcleo lateral (AL), núcleo basolateral (ABL) y el núcleo basomedial, también llamado núcleo accesorio (ABM). El AL se encuentra localizado dorsalmente en la amígdala donde colinda con el núcleo basal centralmente. Se encuentra rodeado lateralmente por la cápsula interna y medialmente por el núcleo central (Sah *et al.* 2003). Morfológicamente la composición neuronal de la ABL es similar a la de la corteza cerebral, excepto por el hecho de que las neuronas se encuentran azarosamente orientadas. Así como en la corteza, la ABL contiene dos clases de neuronas; el grupo dominante (~80%) consiste en células glutamatérgicas con árboles dendríticos multipolares y axones proyectando hacia otros núcleos amigdalinos y otras estructuras del cerebro. La

segunda clase de neuronas consiste en células GABAérgicas locales con axones cortos y dendritas espinosas (Pape & Pare 2010).

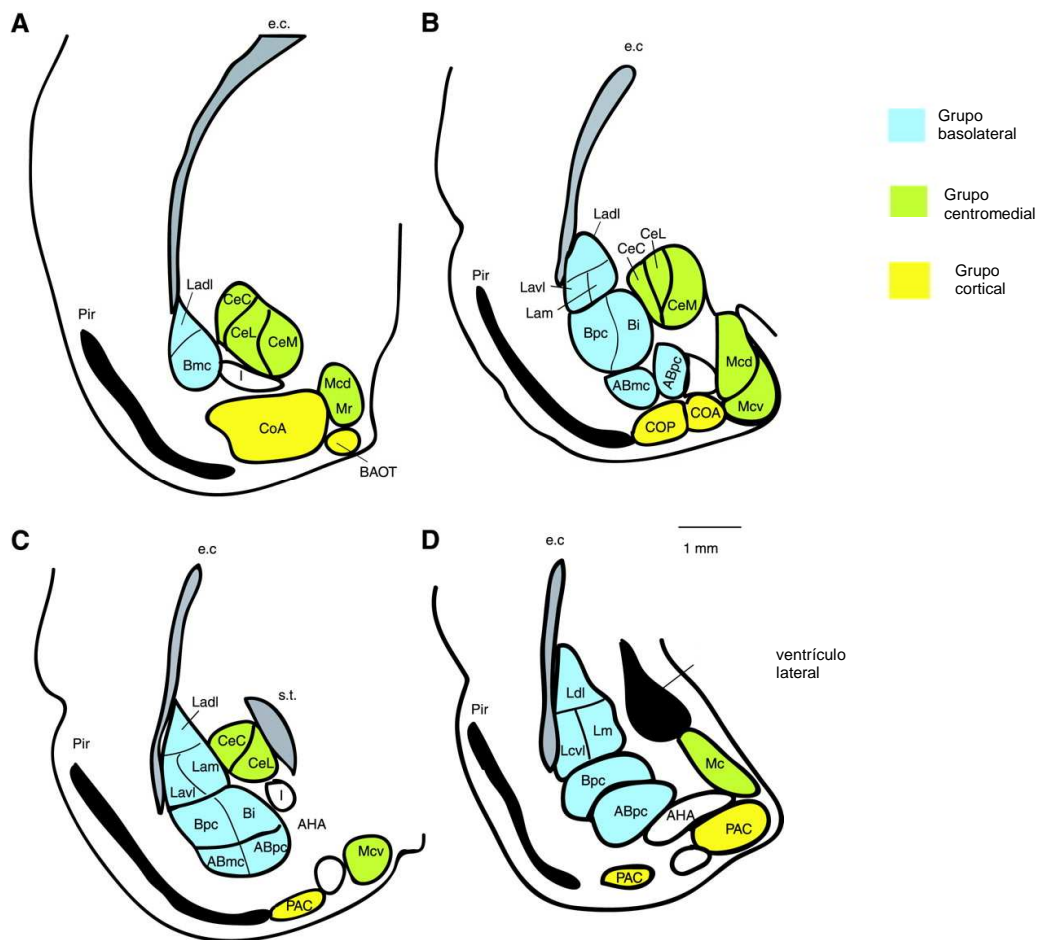


Fig. 3. Secciones coronales donde se muestran los núcleos del complejo amigdalino de la rata rostrocaudalmente de A a D. Las áreas en azul pertenecen al grupo basolateral, en verde está el grupo centromedial y en amarillo el grupo cortical. De acuerdo a la nomenclatura usada por Sah y colaboradores (2003) ABmc, subdivisión accesoria basal magnocelular; ABpc, subdivisión accesoria basal parvicelular; Bpc, subdivisión basal; e.c., cápsula externa; Ladi, amígdala dorsolateral; Lam, lateral amígdala medial; Lavi, amígdala ventrolateral; Mcd, amígdala medial dorsal; Mcv, amígdala medial ventral; Mr, amígdala medial rostral; Pir, corteza piriforme; s.t., stria terminalis; AHA, área amígdala-hipocampal; PAC, corteza periamigdalóide; CoA, CoP, núcleos corticales anterior y posterior; BAOT, tracto olfatorio accesorio.



## **GRUPO CENTRO-MEDIAL (ACe)**

Consiste en dos núcleos: el núcleo medial (ACeM), que se encuentra cerca de la superficie colindando con el tracto óptico y comienza al nivel del núcleo del tracto olfatorio lateral extendiéndose caudalmente; y el núcleo central (ACe) que tiene cuatro subdivisiones, la subdivisión capsular (CeC), la lateral (CeL), la intermedia (CeI) y la medial (CeM). El núcleo central se localiza dorsomedialmente en la parte rostral de la amígdala, bordeado lateralmente por el complejo basolateral, dorsalmente por el globus pallidus y medialmente por la stria terminalis.

En este núcleo de la amígdala se encuentran células morfológicamente similares a aquellas halladas en el estriado, siendo principalmente GABAérgicas e indistinguibles de las neuronas medianas espinosas, de hecho la ACe contiene pocas interneuronas GABAérgicas, siendo la mayoría neuronas eferentes. (Pape & Pare 2010, Sah et al. 2003).

## **CONEXIONES INTRA-AMIGDALARES**

Varios estudios de marcaje retrógrado han revelado que los núcleos de la amígdala poseen una extensa conectividad intra e internuclear; indicando que hay un amplio procesamiento local de la información que entra a la amígdala antes de que genere una respuesta apropiada. Dentro de la ABL existen importantes proyecciones glutamatérgicas, particularmente del núcleo AL hacia el núcleo ABM (Jolkkonen & Pitkanen 1998, Pitkanen *et al.* 1995). Dentro de este núcleo la proyección más grande se dirige hacia la parte medial del ACe (Sah et al. 2003).

El núcleo ACe, cuyas proyecciones constituyen una importante eferencia de la amígdala, recibe proyecciones de la AL en las subdivisiones medial y capsular. Sin embargo, no se han reportado proyecciones recíprocas del ACe hacia ABL (Pape & Pare 2010).

## AFERENCIAS Y EFERENCIAS

La amígdala forma conexiones con una gran diversidad de estructuras incluyendo la corteza, el estriado, algunos núcleos talámicos e hipotalámicos, así como núcleos del tallo cerebral (Amaral DG 1992). Como resultado, la amígdala puede influir en una amplia variedad de procesos desde control autónomo, dolor, estrés, ansiedad, miedo y deseo o preferencia; hasta la neuromodulación de la formación de la memoria (de la Mora *et al.* 2010, McGaugh 2004, McGaugh *et al.* 2002, Shin & Liberzon 2010).

### EFERENCIAS

Diferentes núcleos de la amígdala proyectan hacia diferentes clases de estructuras en el sistema nervioso central. El complejo ABL tiene una proyección sustancial al sistema de memoria del lóbulo temporomedial con aferencias al hipocampo y corteza peririnal (Pitkanen 2000). Existe una importante proyección glutamatérgica de LA al núcleo accumbens, la corteza prefrontal, tálamo e hipotálamo lateral.

Las proyecciones hacia la corteza prefrontal, la corteza insular y rinal<sup>2</sup> y el estriado provienen de la ABL y no de la ACe; por el contrario, ABL prácticamente no tiene proyecciones hacia el tallo cerebral, mientras que la ACe envía importantes proyecciones hacia esta región del cerebro, las cuales están involucradas en generar la respuesta conductual y autónoma del miedo caracterizadas por el congelamiento, sobresalto, liberación de hormonas del estrés y cambios en la presión sanguínea y ritmo cardiaco (Pitkanen 2000, Sah *et al.* 2003). Dichas proyecciones se dirigen a grupos celulares colinérgicos y noradrenérgicos situados en la confluencia del puente y el mesencéfalo, así como hacia células dopaminérgicas en el área ventral tegmental y substantia nigra pars compacta (Kaufling *et al.* 2009, Pape & Pare 2010); al núcleo parabraquial, que está involucrado en vías nociceptivas; y hacia el núcleo del tracto solitario, que se conecta con el sistema vagal.

---

<sup>2</sup> Esto es cierto para especies como gato, rata, ratón y conejo. En primates, existe una gran expansión de proyecciones corticales de áreas sensoriales y motoras, así como cortezas asociativas Amaral DG, P. J., Pitkanen A, Carmichael ST (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental disfunction*, (J. Aggleton ed.), pp. 1-66. Wiley-Liss, Inc., New York, EUA.

## AFERENCIAS

La amígdala recibe información de todas las modalidades sensoriales, dependiendo de la modalidad, la información puede provenir del tálamo, la corteza o rutas subcorticales más directas, La mayor parte de las proyecciones corticales se originan en áreas de asociación y polimodales; paralelamente a la naturaleza tipo corteza de la ABL y a las propiedades tipo estriado de la ACe, las aferencias corticales hacia la ABL y ACe se originan de las capas III y V, respectivamente (Pape & Pare 2010). Particularmente áreas corticales gustativas y viscerales en la corteza insular anterior y posterior proveen de importantes proyecciones a la LA, al núcleo ABM y al ACe (Sah et al. 2003).

De igual forma existen varias fuentes de información polimodal sensorial a la amígdala, estas incluyen corteza prefrontal, cuya proyección llega principalmente al núcleo ABM; así como cortezas peririnal y entorinal e hipocampo, estructuras con las cuales tiene proyecciones recíprocas. El núcleo central es el objetivo principal de las proyecciones provenientes del cerebro medio y el puente (Pitkanen 2000).

La amígdala recibe innervación dopaminérgica de la substantia nigra pars compacta, del área ventral tegmental y la extensión caudal de la substantia nigra. Por otra parte, la innervación noradrenérgica proviene en su mayoría del locus coeruleus (LC) y alrededor del 15% proviene de grupos celulares caudales al LC (Fallon 1992).

### III. ANTECEDENTES

Se sabe que la integridad funcional de la CI es importante para la adquisición, consolidación y evocación de la memoria gustativa de aversión (Bermudez-Rattoni *et al.* 1991, Escobar & Bermudez-Rattoni 2000), como lo demuestran trabajos donde se causan lesiones electrolíticas o excitotóxicas de esta estructura afectando estas etapas de la memoria (Cubero *et al.* 1999, Nerad *et al.* 1996). De igual manera, la formación del CAS se ve afectada si se inactiva temporalmente la función de la CI por medio de un bloqueador de los canales de sodio sensibles a voltaje, la tetrodotoxina (TTX) antes de la adquisición de la tarea, (Gallo *et al.* 1992).

En el caso de la amígdala, la forma irregular de los núcleos que la componen ha dificultado realizar lesiones circunscritas, de manera que los resultados conductuales varían de acuerdo a los protocolos empleados (Reilly & Bornovalova 2005). Sin embargo se ha descrito que lesiones excitotóxicas de la ABL, pero no de ACe atenúan la formación del CAS (Morris *et al.* 1999, St Andre & Reilly 2007, Yamamoto & Fujimoto 1991). También se ha reportado que las lesiones electrolíticas de ABL, pero no de la ACe y/o de la AM, afectan la adquisición del CAS (Aggleton *et al.* 1981, Rollins *et al.* 2001). Además, la inactivación temporal, mediante la administración de TTX antes de la inducción del malestar gástrico afecta la formación del CAS (Gallo *et al.* 1992, Roldan & Bures 1994).

Lo anterior indica que la actividad de estas estructuras es necesaria para el procesamiento de la información que integrará el trazo de memoria, sin embargo es necesario conocer también algunos estudios que han evaluado los sistemas de neurotransmisión que están participando.

## SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN INVOLUCRADOS EN EL APRENDIZAJE GUSTATIVO

La información de las propiedades químicas y físicas de los sabores llega a la CI y a la amígdala a través de diferentes neurotransmisores. Como vimos antes, ambas estructuras reciben aferencias dopaminérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas y gabaérgicas; así que revisaremos en esta sección algunos estudios acerca de la participación de estos sistemas de neurotransmisión en la formación de la memoria gustativa de aversión.

### CORTEZA INSULAR

*Sistema glutamatérgico.* El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos y actúa a través de dos tipos de receptores. Los receptores ionotrópicos, que son permeables a cationes y producen cambios celulares rápidamente, comprenden a los AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), los NMDA (N-metil-D-aspartato) y los kainato. Los receptores metabotrópicos activados por glutamato (mGluRs) están acoplados a proteínas G y tienen un efecto más lento en las neuronas.

La administración de un antagonista competitivo de los receptores tipo NMDA (NMDAr), el ácido DL-2-amino-5-fosfovalérico (APV) antes de la inducción del malestar gástrico, evita la formación del CAS (Rosenblum *et al.* 1997). Además, estudios de liberación de glutamato en la CI indican que un estímulo gustativo nuevo no produce cambios significativos en la concentración extracelular de glutamato, sin embargo, tras la inducción del malestar gástrico por medio de la administración de cloruro de litio (LiCl) vía intraperitoneal se observa un incremento significativo de glutamato extracelular en esta estructura (Miranda *et al.* 2002). Ésto nos habla del papel del glutamato como parte de la señalización del malestar gástrico, que es uno de los estímulos necesarios para la formación de la memoria gustativa de aversión. Interesantemente, la administración de APV antes del condicionamiento afecta la memoria a largo plazo, pero no la de corto plazo, indicando que la actividad de NMDA en la CI es crucial para la consolidación de esta tarea (Ferreira *et al.* 2002).

*Sistema gabaérgico.* GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de los mamíferos. Los receptores GABA<sub>A</sub> son canales de cloro que pueden bloquearse selectivamente con bicuculina y son modulados por esteroides, barbituratos y benzodiazepinas. Los receptores GABA<sub>C</sub> también son canales de cloro, pero su agonista natural es un orden de magnitud más potente que en los GABA<sub>A</sub> y no son bloqueados por bicuculina. GABA también activa receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi, o que causa la inhibición de la adenilato ciclasa, así como el decremento en la conductancia de Ca<sup>2+</sup> y un incremento en la conductancia de K<sup>+</sup> (Chebib & Johnston 1999).

Algunos estudios indican que los fármacos que modulan los receptores GABA A, como las benzodiazepinas que facilitan la apertura de los canales de cloro en respuesta a la activación de estos receptores tienen efectos negativos sobre la memoria en varios tipos de aprendizajes aversivos (Renault 1986, Cole, 1995). Particularmente se ha reportado que alteran la evocación (Roache & Zabik 1986, Yasoshima & Yamamoto 2005), y algunos aspectos de la extinción del CAS (Delamater & Treit 1988). Dado que la administración de los fármacos fue hecha antes de la prueba de aversión, no se sabe si el sistema GABAérgico está involucrado en los mecanismos de formación de la memoria y no sólo de su expresión.

Respecto a los receptores GABA B, un modelo de mutación puntual en la isoforma GABA B<sub>1</sub>, mostró que estos receptores también están involucrados tanto en la adquisición como en la extinción del CAS (Jacobson *et al.* 2006); sin embargo esta mutación no fue delimitada a alguna región, así que no se conoce su contribución específica en la CI.

*Sistema noradrenérgico.* La norepinefrina (NE) actúa a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs ( $\beta$ -adrenérgicos), Gq ( $\alpha$ -adrenérgicos 1) y Gi ( $\alpha$ -adrenérgicos 2); a través de los cuales ejerce sus efectos moduladores. En el sistema nervioso central, la NE está involucrada en varios procesos fisiológicos como regulación de los ciclos de sueño-vigilia, atención, ansiedad y aprendizaje y memoria (Robbins 1995). Respecto a este último se piensa que el sistema

noradrenérgico participa en la adquisición y consolidación de la memoria de eventos emocionales o aversivos (Murchison *et al.* 2004) por lo que puede estar implicada en cambios plásticos en la función sináptica a largo plazo (Robbins 1995).

Los estudios realizados hasta el momento para determinar el papel del sistema noradrenérgico cortical en la formación de la memoria gustativa son escasos, se ha descrito que este sistema de neurotransmisión responde a la presentación de un estímulo gustativo nuevo ya que las neuronas del LC se activan con la exposición a estímulos desconocidos (Robbins 1995). Particularmente en el aprendizaje gustativo de aversión, se ha visto que al lesionar la CI antes de la adquisición del CAS con la neurotoxina catecolaminérgica 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la formación del CAS se ve afectada (Fernandez-Ruiz *et al.* 1993). Dado que estas manipulaciones farmacológicas se han hecho previas a la adquisición, no permiten discernir sobre qué etapa de la formación de la memoria está participando la señal noradrenérgica en la CI ni si interviene en el procesamiento de la información gustativa o visceral.

*Sistema dopaminérgico.* Se han caracterizado cinco subtipos de receptores, del D1 al D5, los cuales se clasifican en dos familias. Los tipo D1 están acoplados a proteínas Gs e incluye a los receptores D1 y D5; y los D2, acoplados a proteínas Gi, donde se incluyen los receptores D2, D3 y D4. El estudio del papel de la dopamina en el aprendizaje y la memoria ha proporcionado múltiples evidencias con respecto a la adquisición de tareas asociativas; las neuronas dopaminérgicas del VTA se activan mientras se aprenden estas tareas (Schultz 2000, Waelti *et al.* 2001, Young *et al.* 2005) y hay un incremento en la liberación de dopamina en la corteza prefrontal y estriado (Feenstra *et al.* 1999, Wilkinson *et al.* 1998). Como se comentó antes, la lesión con 6-OHDA en CI afecta la adquisición del CAS, lo que incluye también efectos sobre la transmisión dopaminérgica, no sólo noradrenérgica, mostrando así indicios de la posible intervención de dopamina en este aprendizaje asociativo.

## AMÍGDALA

*Sistema glutamatérgico.* Se ha demostrado que la amígdala participa en la señalización del malestar gástrico a través del glutamato, ya que la administración de LiCl i.p. produce un incremento de ese neurotransmisor en la ABL (Miranda et al. 2002) y la inyección intra-amigdalár de glutamato, solo o con una dosis baja de LiCl, después de la exposición a un sabor nuevo, produce CAS (Miranda et al. 2002, Tucci et al. 1998). Además, la inyección de antagonistas de los NMDAR antes de la inducción del malestar gástrico, atenúa la formación del CAS (Tucci et al. 1998, Yasoshima et al. 2000). También se logra este efecto cuando se administra CNQX, un antagonista de los receptores AMPA, después de la presentación del sabor (Yasoshima et al. 2000).

También existe evidencia de la participación de los mGluRs en la amígdala durante la formación del CAS. La inyección en la ABL de un antagonista de los mGluR I y II, después de la exposición al estímulo gustativo, atenúa el CAS. Sin embargo, la administración de un antagonista a mGluR5 en la ABL, previo a la presentación del estímulo gustativo no tiene efecto en la prueba a largo plazo del CAS, pero la extinción de éste es más lenta (Simonyi et al. 2009).

*Sistema gabaérgico.* Algunos trabajos han tratado de describir los efectos de la administración intra-amigdalár de agonistas de los receptores GABA A en la expresión del CAS. Dado que este núcleo tiene altos niveles de expresión de receptores GABA A (McDonald & Betette 2001), este puede ser el locus del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas en la adquisición y evocación de las memorias de aversión (Makkar et al. 2010). Particularmente, la administración de midazolam en la ABL antes de la prueba a largo plazo, afecta la evocación del CAS (Yasoshima & Yamamoto 2005). La administración de otro agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, muscimol, en la ABL inmediatamente después de la primera extinción del CAS provocó que esta tarea no se extinguiera por dos semanas. Sin embargo, la administración de un antagonista no tuvo efecto (Akirav 2007).

*Sistema noradrenérgico.* Existe amplia evidencia de la participación de este sistema de neurotransmisión en la adquisición y consolidación de memorias con



contenido emocional (McGaugh 2004, McGaugh et al. 2002). En el caso de la formación de la memoria del CAS se sabe que infusiones de propranolol, un antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, afecta el CAS cuando se administra antes de la inyección i.p. de LiCl (Miranda et al. 2003), sin embargo cuando es administrado antes de la adquisición del CAS, éste no se ve afectado (Miranda et al. 2008). Esto indica que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos participan en el procesamiento del estímulo visceral, pero no en el del estímulo gustativo durante la formación del CAS.

*Sistema dopaminérgico.* La ABL se ha visto implicada en tareas de condicionamiento apetitivo y aversivo (Davis 1992, de la Mora et al. 2010, Everitt et al. 2003, McGaugh 2004). Particularmente se ha visto que la proyección dopaminérgica hacia la ABL está involucrada en algunos aspectos del aprendizaje asociativo (de la Mora et al. 2010, Guarraci et al. 2000, Guarraci et al. 1999). Sin embargo, en lo que respecta a su participación en la formación del CAS, existe muy poca información. La lesión catecolaminérgica con 6-OHDA en la amígdala atenúa el CAS (Borsini & Rolls 1984); sin embargo, también existen datos donde el mismo tratamiento no tiene el mismo efecto sobre la adquisición de esta tarea (Fernandez-Ruiz et al. 1993).

## **INTERACCIÓN AMÍGDALA-CORTEZA INSULAR EN LA FORMACIÓN DEL CAS**

Como se mencionó antes, la amígdala y la corteza insular tienen proyecciones recíprocas (Pitkanen 2000, Price 2003). Existen datos que sugieren que la proyección de la ABL hacia la corteza gustativa es importante para el establecimiento de la memoria gustativa de aversión. La estimulación tetánica de la ABL induce potenciación a largo plazo (PLP) en la CI, incrementando significativamente la respuesta neuronal a estimulación de baja frecuencia (Escobar et al. 1998, Jones et al. 1999). La inducción de la PLP en la proyección ABL-CI antes de la adquisición del CAS, favorece la retención de esta tarea (Escobar & Bermudez-Rattoni 2000). Además se ha demostrado que esta potenciación es dependiente de la actividad de los NMDAr en la CI, ya que la administración intracortical de un antagonista competitivo de estos receptores, el CPP (ácido 3-2-

carboxipiperacina-4-il-propil-1-fosfónico) y APV afectan tanto la formación del CAS como la PLP de la vía ABL-CI. En contraste, el bloqueo de los mGluRs no tuvo estos efectos (Escobar *et al.* 2002). Se ha reportado también que la inyección de glutamato en la ABL antes de la inducción del malestar gástrico mejora la formación del CAS; sin embargo, la inyección de APV en la CI inhibe este efecto (Ferreira *et al.* 2005). Esto sugiere que la interacción entre estas estructuras a través del sistema glutamatérgico podría constituir un mecanismo mediante el cual el trazo de memoria del CAS es establecido.

## REACTIVACIÓN Y CONSOLIDACIÓN DEL CAS

Existe evidencia de que la actividad post-adquisición (reactivación) favorece la estabilización a largo plazo de la información aprendida. En el caso del CAS, el bloqueo de los NMDAr en la CI, 30, 60 o 120 minutos después del protocolo de condicionamiento afecta la consolidación de esta tarea (Gutierrez *et al.* 1999). Cui y colaboradores (2005) reportaron estudios hechos en ratones knock-out para NR1, característica que puede ser reversible, inducible y específico para estructuras del cerebro anterior, de manera que es posible eliminar la presencia de los NMDAr (cuya subunidad básica es la NR1) en cualquier etapa de la formación de la memoria. En estos estudios, eliminaron los NMDAr durante una semana después de la adquisición del CAS y evaluando la MLP encontraron una significativa disminución en la aversión. Esto sugiere que hay una prolongada actividad glutamatérgica/NMDA durante la etapa post-adquisición que interviene en la formación de la MLP del CAS.

Respecto a la participación de la amígdala, 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 la atenuación del CAS; dicha atenuación es inversamente proporcional al intervalo de tiempo entre la adquisición y la inyección intra-amigdalara (Roldan & Bures 1994). También se ha reportado un incremento en las respuestas neuronales de la ABL 30 minutos después del condicionamiento (Yamamoto & Fujimoto 1991). A pesar de que es la única información disponible que sugiere que la amígdala es necesaria en etapas post-adquisición para la consolidación del CAS, la interacción con la CI indica que la actividad de estas estructuras podría estar relacionada con el proceso de consolidación del CAS.

## IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia indica que la corteza insular y la amígdala son estructuras clave para la adquisición y consolidación de la memoria del CAS. Sin embargo, es escasa la información sobre la participación de los sistemas de neurotransmisión antes mencionados en la señalización y representación de los estímulos condicionado e incondicionado para la formación y estabilización del trazo de memoria del CAS, ya que sólo se ha podido inferir su participación a partir del bloqueo farmacológico de algunos receptores.

Se ha propuesto que tras la estimulación que genera el trazo de memoria, existe una reactivación del mismo en ausencia de estimulación externa y que contribuye a la estabilización progresiva y almacenamiento de la información. Hasta el momento, este proceso no se ha estudiado en términos de liberación de neurotransmisores y se desconoce qué sistemas de neurotransmisión están involucrados en la reactivación de las vías bioquímicas que mantienen los niveles de proteína que sustentan los cambios plásticos a largo plazo

Por lo tanto, el estudio de las señales de neurotransmisión que intervienen tanto en la etapa de adquisición de la memoria como en el proceso de consolidación en la CI y en la amígdala permitiría comprender los mecanismos de la formación del trazo de memoria gustativa de aversión

## **V. HIPÓTESIS**

En la CI y la amígdala habrá cambios en la liberación de neurotransmisores relacionados a la representación de los estímulos gustativo y visceral durante la formación de la memoria gustativa de aversión. Tras la asociación de los estímulos, estas estructuras continuarán participando en la estabilización de la memoria del CAS mediante la reactivación neuroquímica.

## **VI. OBJETIVO**

Estudiar la participación de los sistemas glutamatérgico, gabaérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en las etapas de adquisición y consolidación de la memoria gustativa de aversión en la CI y la amígdala, así como estudiar cómo la interacción de estas estructuras contribuye a la estabilización del trazo de memoria.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar los cambios extracelulares de glutamato, GABA, norepinefrina y dopamina en la CI y la amígdala de rata mediante la técnica de microdiálisis en libre movimiento durante la adquisición y postadquisición del CAS.
- Estudiar el significado funcional de las señales de neurotransmisión caracterizadas y su participación en las diferentes etapas de la formación de la memoria mediante el bloqueo de algunos de los receptores de los sistemas antes mencionados.
- Determinar si la interacción entre amígdala y CI en la etapa post-adquisición es necesaria para la consolidación del CAS, así como analizar los sistemas de neurotransmisión involucrados en este proceso.

## VII. METODOLOGÍA

### 1. *Animales.*

Se emplearon ratas Wistar machos de 90 días de nacidas y 270 - 300 g de peso al momento de la cirugía, fueron colocadas en cajas individuales bajo un ciclo de 12 horas luz/obscuridad con alimento y agua *ad libitum* excepto en los procedimientos experimentales (ver más adelante).

### 2. *Implantación de cánulas guía.*

Los animales fueron anestesiados con 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 vía intraperitoneal. El lugar de implantación de la cánula guía (CMA 12 guide cannula) se determinó de acuerdo a coordenadas obtenidas del atlas Paxinos y Watson (Paxinos 1998). Para la CI, con respecto a Bregma: AP = +1.2 mm, L = + 5 mm y DV = - 4.5 mm; para la amígdala: AP = -2.8 mm, L = - 4.8 mm y DV = - 7.5 mm. Tras la implantación de la guía cánula, ésta se sujetó al cráneo con acrílico dental y dos tornillos. Para los experimentos de administración intracerebral, se implantaron cánulas bilaterales de acero inoxidable de 23G dirigidas a CI o amígdala.

### 3. *Microdiálisis en libre movimiento.*

Después de la cirugía los animales se recuperaron en sus cajas individuales durante cinco días; transcurrido este tiempo fueron privados de agua por 24 horas y luego colocados individualmente por cinco días durante cinco horas (10:00 a.m. a 3:00 p.m.) dentro de la cámara de microdiálisis correspondiente (Bioanalytical systems, Inc., E.U.A.), donde se acostumbraron a beber 10 mL de agua de una probeta graduada en periodos de 15 minutos al día. Por la tarde, estando los animales en el bioterio, se les daba acceso a 20 mL más de agua para hidratarlas. Durante su estancia en la cámara de microdiálisis los animales fueron manipulados y habituados al contacto frecuente del experimentador.

La microdiálisis en libre movimiento permite monitorear la liberación extracelular de neurotransmisores en una estructura en particular; el principio de la

microdiálisis se basa en la difusión de las moléculas a través de poros de diámetro pequeño en una membrana semipermeable unida a una sonda constituida de dos tubos concéntricos; al tubo de entrada se conecta una bomba de perfusión que infunde líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  19 mM, Glucosa 3.3 mM), éste se equilibra con el fluido en el exterior por difusión en ambas direcciones, así el LCRA recuperado por la tubería de salida contiene los neurotransmisores que lograron atravesar la membrana; de manera que un análisis cuantitativo de las moléculas recolectadas en las fracciones de microdializado refleja su patrón de liberación temporal en el fluido extracelular (Orlowska-Majdak 2004, Ungerstedt 1991).

El día del procedimiento experimental la sonda de microdiálisis fue perfundida a una velocidad de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  por 30 min con LCRA filtrado (membrana de filtración de 0.20  $\mu\text{m}$ ) a temperatura ambiente con ayuda de una bomba (CMA/100 pump) conectada a través de tubería de propileno etileno fluorinado para eliminar el glicerol en el cual se conserva la membrana. Tras verificar la ausencia de burbujas en el sistema se disminuyó la velocidad de perfusión a 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se insertó en la rata la sonda (CMA 12) con una membrana de 3 mm de largo en el caso del monitoreo en CI y de 1 mm en el caso de la amígdala. Los primeros 90 minutos de recolección fueron descartados y después se recolectaron muestras cada 4 minutos recibiendo el microdializado en tubos eppendorf de 200  $\mu\text{L}$  que contenían 1  $\mu\text{L}$  de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.27 mM, ácido acético 0.1 M), las fracciones fueron inmediatamente guardadas en el ultracongelador a - 80 °C hasta el momento del análisis.

Para establecer la línea basal de liberación (LB) se recolectaron tres fracciones (a una velocidad de perfusión de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  para CI y 0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$  para la amígdala) tras la cuales se presentó el estímulo correspondiente o se inició el protocolo de condicionamiento monitoreando durante 32 ó 100 minutos dependiendo del experimento, los cuales se detallarán más adelante.

#### 4. Cuantificación de neurotransmisores por electroforesis capilar.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica instrumental de separación, la cual permite la identificación y cuantificación de los analitos una vez separados al acoplarse al detector adecuado. La separación en EC se basa en la migración de especies cargadas que se encuentran disueltas o suspendidas en una solución electrolítica dentro de un tubo capilar de diámetro muy pequeño al aplicar un voltaje, (fig. 4) (Landers 1997).

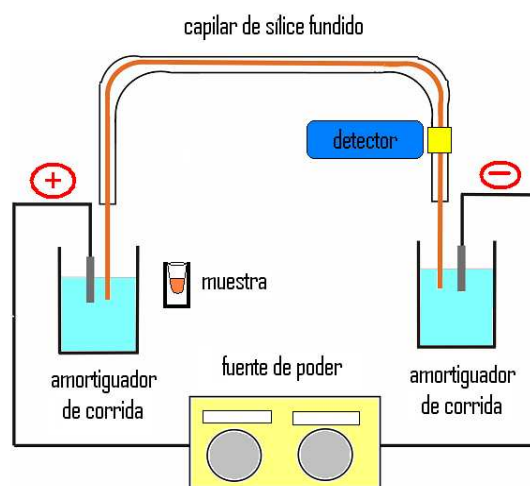


Fig. 4. Esquema de la instrumentación básica de un equipo de electroforesis capilar. Los extremos del capilar se encuentran dentro de una solución amortiguadora junto con electrodos conectados a una fuente de poder; la muestra es inyectada mediante presión en el capilar al sustituir temporalmente uno de los amortiguadores por el contenedor de la muestra. Al aplicar voltaje se lleva a cabo la separación de los analitos que serán detectados al pasar por una ventana en el capilar.

Dada la complejidad de la muestra biológica en cuanto al gran número de moléculas que pueden estar presentes fue necesario emplear un método que permitiera separar, identificar y cuantificar simultáneamente los niveles de GABA glutamato, dopamina y norepinefrina presentes en el microdializado. Puesto que una de las grandes ventajas de emplear EC como herramienta para el análisis es que se requiere un volumen pequeño de muestra comparado con los 20 o 30  $\mu\text{L}$  requeridos para el análisis por HPLC, se buscó mejorar la resolución temporal del patrón de liberación de las moléculas de interés al disminuir el tiempo de recolección de las fracciones hasta donde el método analítico lo permitiera, es decir, hasta recolectar el volumen mínimo de microdializado necesario para poder cuantificar los neurotransmisores antes mencionados. La respuesta a la detección

de los compuestos se traduce en un pico dentro de una gráfica llamada electroferograma.

#### 4.1 Procedimiento de derivatización.

Debido a que se requería una alta sensibilidad, el mejor sistema de detección a nuestro alcance era la detección por fluorescencia inducida por láser (DFIL), la cual se basa en hacer reaccionar las moléculas de interés con un compuesto fluorogénico adecuado para las condiciones instrumentales de análisis, es decir, que el producto de la reacción de derivatización<sup>1</sup> tenga una longitud de onda máxima de excitación ( $\lambda_{\max}$  exc) acorde a la de excitación del láser de ionización de argón.

El compuesto fluorogénico elegido fue el FQ, (3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído), Molecular Probes Invitrogen, E.U.A.) que reacciona en presencia de cianuro con el grupo amino primario de las moléculas presentes en la muestra lo que permite derivatizar al mismo tiempo catecolaminas y aminoácidos.

Los productos son moléculas hidrofóbicas insolubles en agua y con movilidades muy similares, por lo que fue necesario aplicar una modalidad de electroforesis capilar conocida como cromatografía electrocinética micelar (MEKC, por sus siglas en inglés, Micellar Electrokinetic Chromatography) que se basa tanto en principios cromatográficos como electroforéticos y con la cual se pueden separar conjuntamente compuestos iónicos y neutros en función de sus movilidades electroforéticas y su partición entre una fase móvil y otra semiestacionaria compuesta por micelas.

Existen en la literatura varias referencias en las cuales se emplea el FQ para la detección de proteínas, péptidos y aminoácidos en diferentes tipos de muestras (Asermely *et al.* 1997, Liu *et al.* 1990, Liu *et al.* 1991), sin embargo son escasas las referencias que indican el uso del FQ para el análisis de aminoácidos y catecolaminas simultáneamente en muestras de microdializado (Chen *et al.* 2001). Por este motivo fue necesario buscar las condiciones óptimas de reacción para

---

<sup>1</sup> La derivatización es una reacción que modifica la estructura de los compuestos a analizar para hacerlos susceptibles a cierto tipo de detección, en este caso DFIL.



analizar pequeños volúmenes de muestra sin diluir mucho su contenido de neurotransmisores durante el tratamiento. El procedimiento de derivatización consistió en lo siguiente: Alícuotas de 10  $\mu$ L de FQ 10 mM (100 nmol) fueron secadas al vacío (el reactivo se encontraba disuelto en metanol); se agregaron 2  $\mu$ L de KCN 25 mM, los 5  $\mu$ L presentes en el tubo eppendorf de recolección (4  $\mu$ L de microdializado y 1  $\mu$ L de mezcla antioxidante) y 1  $\mu$ L de estándar interno (*O*-metil-*L*-treonina 7.5 mM), la mezcla se hizo reaccionar en la obscuridad por 15 min a 65 °C en un baño termostatzado, inmediatamente después se colocaron los tubos en hielo para detener la reacción.

#### 4.2 Separación y detección.

Como se mencionó antes, se aplicó la modalidad de MEKC para separar los compuestos derivatizados; ésta involucra la adición de un surfactante en el amortiguador de corrida para la formación de micelas que constituyen la fase semiestacionaria por la cual tienen afinidad los productos de la reacción de derivatización. La separación se realizó en un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ Glycoprotein system.

El amortiguador de corrida empleado para la separación de los neurotransmisores de interés contenía boratos 35mM, duodecil sulfato de sodio (SDS) 25 mM,  $\beta$ -ciclodextrinas 5 mM 10% de metanol grado HPLC, pH final 9.6. La inyección fue hecha hidrodinámicamente aplicando 0.5 psi de presión durante 5 s en el contenedor de la muestra para llenar una porción del capilar (sílica fundida, 75  $\mu$ m de diámetro interno y 50 cm de largo) y la separación se hizo aplicando una corriente de 25 kV. Para la detección de los compuestos se empleó DFIL con un láser de ionización de argón con luz a 488 nm (Beckman Coulter).

#### 4.3 Cuantificación.

Al obtener las condiciones adecuadas de análisis para cuantificar glutamato y norepinefrina en los microdializados se utilizó una curva patrón de 6 puntos para cada compuesto de interés. Tanto a los estándares como a las muestras se les añadió un estándar interno (*O*-metil-*L*-treonina 7.5 mM), un aminoácido que no se

encuentra naturalmente en la muestra y que sirve como referencia para corregir variabilidad en la inyección de la muestra y en la reacción de derivatización; el área bajo la curva de los picos generados en el electroferograma fue interpolada para obtener la concentración correspondiente.

5. *Protocolo conductual para de condicionamiento de aversión al sabor.*

Cinco días después de la implantación de cánulas guía los animales fueron privados de agua por 24 hrs y durante los siguientes cinco días se les permitió beber agua durante 15 min en la mañana y de nuevo 4.5 hrs después para realizar la prueba a corto y largo plazo cuando se requiera. Este protocolo para evaluar la MCP y la MLP en los mismos animales ha probado ser útil, ya que la exposición al estímulo gustativo durante la evocación de la MCP no interfiere con la respuesta de aversión en la MLP (Ferreira et al. 2002). El volumen de agua ingerido fue registrado y el promedio de dicho consumo se consideró la línea basal. Para la adquisición del CAS las ratas fueron expuestas a una solución de sacarina sódica al 0.1% durante 15 min y 15 min después de les administró una inyección i.p. de LiCl 0.4M (7.5 mL/kg). La MCP se evaluó 4.5 hrs después de la adquisición al exponer de nuevo a las ratas a la solución de sacarina durante 15 min y la MLP se evaluó a las 72 hrs. Los datos son presentados como porcentaje de consumo durante la adquisición ( $\%ADQUISICIÓN = \text{mL de sacarina consumidos durante la prueba} * 100/\text{mL de sacarina consumidos durante la adquisición}$ ).

6. *Administración intracerebral de fármacos*

Todos los fármacos fueron disueltos en solución salina (0.9%), la administración de realizó a través de agujas dentales que sobresalían 1.5 mm de las cánula guía. Las agujas se conectaron por medio de tubería de polietileno dos jeringas Hamilton de 10 uL; un volumen total de 1 uL por hemisferio fue administrado a una velocidad de 0.5 uL/min con una bomba de microinfusión (Carnegie Medicine, Estocolmo, Suiza). Después de las microinfusiones, las agujas se dejaron un minuto para permitir la difusión del fármaco en el tejido.

## 7. *Western blot*

40 µg de proteína de homogenado de CI fueron hervidas durante 5 minutos en amortiguador Laemmli 1:1. Posteriormente se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%; la electroforesis se llevó a cabo a 100V durante dos horas en un amortiguador compuesto por Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 0.1%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) a 25 V por 45 min en un amortiguador de transferencia con los mismos componentes que el de corrida pero con 20% de metanol. Esta membrana se incubó una hora en amortiguador TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%, pH 7.5) con 5% de albúmina sérica bovina. Para detectar la subunidad NR1 del receptor NMDA, la membrana fue incubada 12 horas a 4°C con un anticuerpo policlonal hecho en conejo (1:1000, Millipore) anti-fosfo-NR1(Ser897) y con un anticuerpo monoclonal hecho en ratón (1:1000, Millipore) anti-NR1. La membrana se lavó durante 7 minutos 4 veces en TBS-T y se incubaron por una hora con un anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (anti-ratón y anti-conejo hechos en cabra (Zymed), 1:20,000). La membrana volvió a lavarse con TBS-T. Después se incubó con sustrato quimioluminiscente HRP (Immobilion Western, Millipore) y la señal se expuso a una placa radiográfica. La inmunoreactividad se cuantificó densitométricamente con el software ImageJ 1.31

## 8. *Histología*

Un día después de finalizar el experimento de microdiálisis los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos transcardialmente con solución salina isotónica para retirar la sangre del cerebro, el cual fue retirado y colocado en una solución de paraformaldehído al 4 %, posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa al 2% y conservados a 4 °C hasta ser cortados en secciones coronales de 50 µm de grosor a través de las áreas circundantes a la inserción de la sonda. Por último los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo para observar con el microscopio si la localización de la membrana era correcta.

9. *Análisis estadístico.*

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Para el análisis estadístico se empleó una ANOVA de dos vías con la prueba post-hoc de Fisher o una t de Student no pareada, dependiendo del experimento; un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa StatView versión 4.5.

## VIII. RESULTADOS

### 1. Caracterización de las señales relacionadas con el estímulo gustativo y el visceral en la CI.

#### *ESTÍMULO GUSTATIVO (EC)*

Como estímulo gustativo nuevo se empleó una solución de sacarina sódica al 0.1% (SAC, n=6), que constituye un sabor apetecible, por lo que la respuesta de liberación se comparó con la exposición a un sabor naturalmente repulsivo como es la quinina (clorhidrato de quinina 0.005%, QUIN n= 5). Como grupo control se monitorearon los niveles extracelulares de los neurotransmisores de interés durante la exposición de agua (H<sub>2</sub>O, n=5).

Para los aminoácidos monitoreados, glutamato y GABA, las concentraciones basales promedio fueron  $0.978 \pm 0.32 \mu\text{M}$  y  $0.012 \pm 0.008 \mu\text{M}$ , respectivamente. No se observan diferencias significativas entre el grupo control que bebió agua y los grupos expuestos a los sabores nuevos (sacarina y quinina); es decir, la exposición a un estímulo gustativo no genera cambios significativos en la liberación de GABA y glutamato en CI dentro de los 15 min de exposición (fig. 5A, 5B). Sin embargo, se observan cambios de liberación en las catecolaminas (concentraciones basales para dopamina  $2 \pm 0.7 \text{ nM}$  y para norepinefrina  $5 \pm 0.3 \text{ nM}$ ). Se puede apreciar en la gráfica de liberación de norepinefrina (NE) (Fig. 5C) que en las fracciones correspondientes a los minutos 16 y 20 hay una diferencia significativa entre los grupos durante la presentación del sabor nuevo, que no se presenta en el grupo H<sub>2</sub>O ( $p$ 's  $<0.05$  vs fracciones basales). Respecto a la liberación de dopamina (DA) (Fig. 5D) existe una diferencia significativa entre grupos ( $F_{7,93} = 6.247$ ,  $p < 0.01$ ) y entre fracciones ( $F_{2,97} = 8.686$ ,  $p < 0.01$ ). Tanto en el grupo expuesto a la sacarina, como a la quinina, existe un incremento significativo de DA ( $p$ 's  $< 0.01$  vs. Fracciones basales) que no aparece en el grupo expuesto al agua; evidenciando así que en el procesamiento de un estímulo gustativo nuevo están involucradas señales noradrenérgicas y dopaminérgicas en CI.

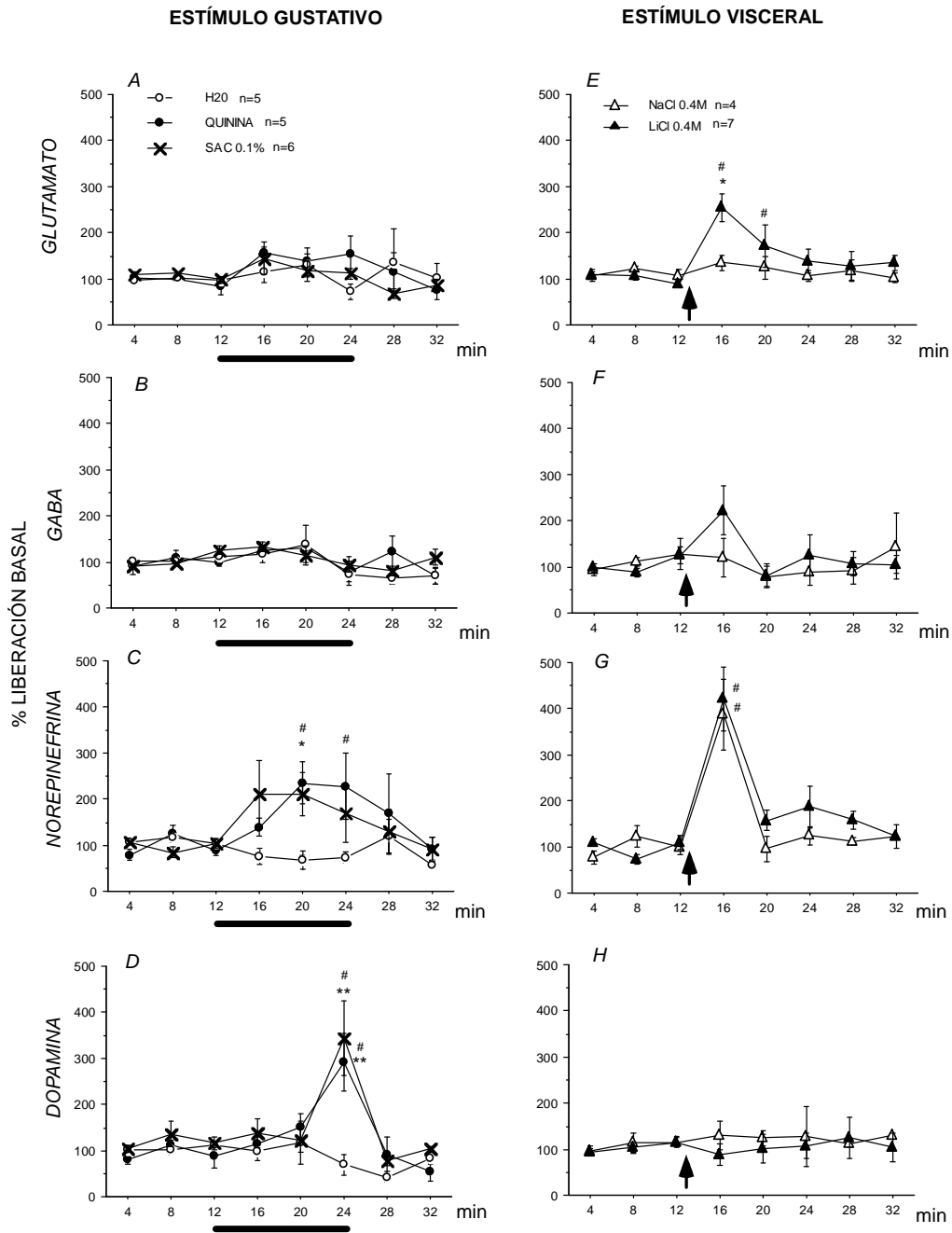
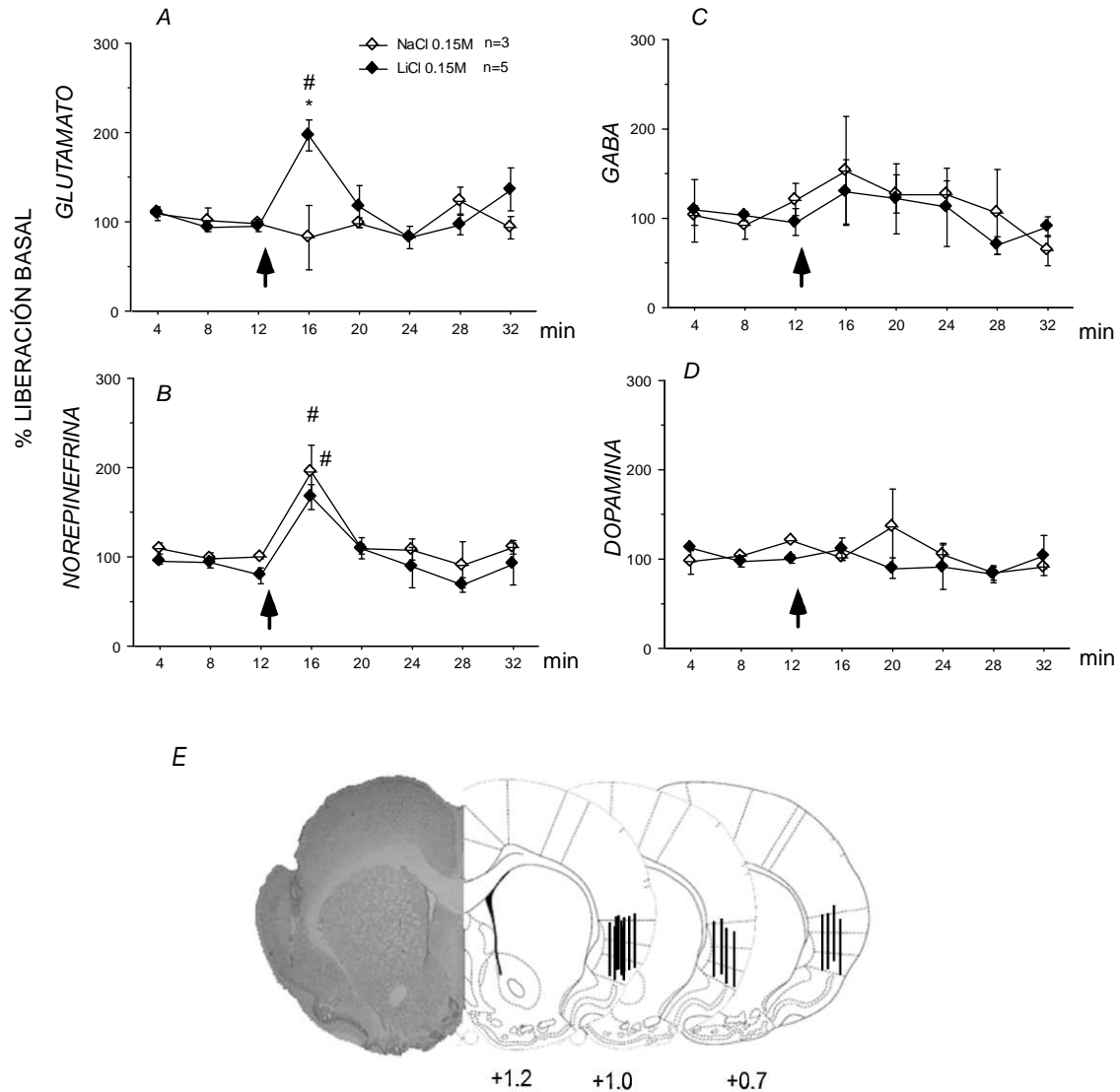


Fig. 5. *Un estímulo gustativo nuevo incrementa la liberación de dopamina y norepinefrina en la CI; mientras que la inducción del malestar gástrico incrementa la liberación de glutamato y norepinefrina.* Liberación de GABA, glutamato, norepinefrina y dopamina en corteza insular durante la exposición al estímulo gustativo (Sacarina 0.1%, quinina 0.005% o agua, indicado por la barra negra, A-D) y al malestar gástrico (inducido con LiCl 0.4M i.p, indicado con la flecha) o NaCl 0.4M que no induce tal malestar (E-H). Fracciones de 4 $\mu$ L; las tres primeras constituyen la liberación basal. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ES. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  vs. la misma fracción del grupo control y #  $p < 0.05$  vs. fracciones basales.

## ESTÍMULO VISCERAL (EI)

La inducción del malestar gástrico se realiza mediante la inyección intraperitoneal de LiCl 0.4M (n=7) (7.5 mL/kg), de manera que se evaluaron los cambios extracelulares relacionados con este estímulo y como grupo control se inyectó una solución de NaCl 0.4M (n=4). En el caso del glutamato hubo diferencias significativas entre grupos ( $F_{1,55} = 4.169$ ,  $p < 0.05$ ) y entre fracciones ( $F_{7,55} = 3.130$ ,  $p < 0.01$ ), ya que tras la inyección de LiCl 0.4 M se observa un incremento de casi el 300% de la liberación basal que no se presentó en el grupo de NaCl 0.4 M ( $p < 0.05$ ) (Fig, 5E). Esto sugiere que la respuesta glutamatérgica en CI es debida al inductor de malestar gástrico específicamente puesto que la solución de sodio, que no induce tal malestar, no produce un incremento a pesar de ser hipertónica e irritante. En el caso de la NE, existen cambios significativos entre las fracciones ( $F_{7,60} = 14.741$ ,  $p < 0.01$ ), pero no entre los grupos; como podemos observar en la figura 5G, la liberación de NE incrementa en ambos grupos. Lo que indica que la respuesta noradrenérgica debida a la inyección de LiCl no es específica y puede deberse a otros factores que se discutirán más adelante.

La intensidad del malestar gástrico varía con la concentración de LiCl lo cual repercute en la fuerza del CAS, de modo que se monitoreó la liberación de los neurotransmisores de interés administrando una solución de LiCl de menor concentración para observar un efecto de dosis-respuesta en la liberación de glutamato y NE. Se inyectó una solución de LiCl 0.15M i.p. (7.5 mL/kg) (n= 5), cuya concentración también produce CAS al parearlo con sacarina y NaCl 0.15M (7.5 mL/kg) (n=3) como grupo control, al cual se administra una solución isotónica inocua que no produce CAS al parearla con el consumo de sacarina.



**Fig. 6. La liberación de glutamato y norepinefrina en la CI depende de la dosis de LiCl.** Liberación de glutamato (A,C) y norepinefrina (B,D) en corteza insular al inducir malestar gástrico con LiCl 0.15 M, indicado con la flecha o NaCl 0.15 M. Fracciones de 4 $\mu$ L/4min; las tres primeras constituyen la liberación basal. \*  $p < 0.05$  comparado con la misma fracción del grupo control de NaCl y # $p < 0.05$  vs fracciones basales. (E) Micrografía representativa de la implantación de cánulas guía y la localización de las membranas de microdiálisis, los números indican la coordenada AP respecto a bregma.

La administración de LiCl 0.15 no provocó cambios significativos en la liberación de GABA ni de DA, sin embargo, como se observa en la figura 6, hay un incremento significativo de glutamato, que no se presenta con la inyección de NaCl ( $p < 0.05$ ), pero que es menor al dado por LiCl 0.4 M. De igual forma hay un incremento de NE tanto con la inyección de LiCl como con la de NaCl que alcanza concentraciones similares y no presenta diferencias significativas.



## Receptores que participan en la CI durante la exposición al EC y al EI.

Durante la presentación del estímulo gustativo nuevo se dan cambios en la liberación de DA y de NE en CI, y la inducción del malestar gástrico provoca cambios en los niveles de glutamato y de NE. ¿Estas señales están involucradas en la formación de la memoria gustativa de aversión?

Se sabe que la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 es necesaria en diferentes tipos de aprendizaje (Beninger *et al.* 1989, Izquierdo *et al.* 1998b) incluyendo los asociativos. También hay evidencia de que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos participan en aprendizajes asociativos especialmente con contenido emocional como los aversivos (Cahill *et al.* 1994, Miranda & McGaugh 2004, van Stegeren *et al.* 1998). Por otra parte se ha comprobado que la activación de los receptores tipo NMDA de glutamato es necesaria para la formación del CAS (Rosenblum *et al.* 1997, Ferreira *et al.* 2002) y para otros aprendizajes asociativos. Estas evidencias, junto con los resultados de los experimentos de microdiálisis se tomaron como base para evaluar la participación de las señales de liberación dentro de la CI en la formación de la memoria.

### EXPERIMENTO 1

Para evaluar el efecto de DA y NE sobre el procesamiento del sabor (EC) se inyectaron intracorticalmente los siguientes antagonistas 15 min antes de la exposición al estímulo gustativo durante el protocolo de condicionamiento de aversión al sabor: Propranolol (antagonista de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Miranda *et al.* 2003)), SCH23390 (antagonista de los receptores dopaminérgicos tipo D1, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Runyan & Dash 2004)). Para evaluar el efecto del glutamato y la NE en la señalización del malestar gástrico, se administraron APV, 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Ferreira *et al.* 2002) y Propranolol 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , antes de la inducción del malestar gástrico; 72 hrs. después se realizó la prueba de memoria a largo plazo. Los fármacos fueron de Sigma St. Louis MO disueltos en solución salina.

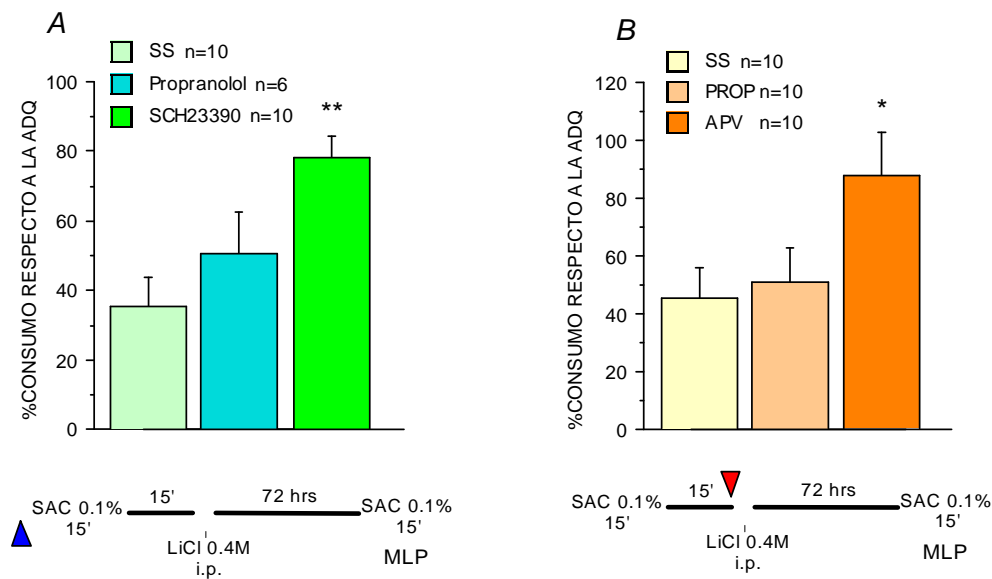


Fig. 7 **La consolidación del CAS se ve atenuada con el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 pre-adquisición y el bloqueo de los NMDAR antes de la inducción del malestar gástrico.** (A) Efectos a largo plazo de la inyección intracortical de SCH23390, bloqueador de los receptores D1 y propranolol, bloqueador de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, 15 min antes del protocolo de adquisición. (B) Efectos a largo plazo de la inyección intracortical de APV y propranolol inmediatamente antes de la administración i.p. de LiCl. Los resultados se expresan como % de consumo respecto a los mL consumidos durante la adquisición  $\pm$  ES. \*  $p < 0.05$  vs. vehículo.

No se encontraron diferencias significativas entre los consumos basales de agua ni durante la adquisición del condicionamiento. Sin embargo, se ven diferencias entre el grupo al cual se le inyectó vehículo el grupo al que se le administró el antagonista de D1/D5; pero no hay diferencias en la MLP en el grupo que recibió el propranolol ( $F_{2,20} = 4.687$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 7A). La administración de este  $\beta$ -bloqueador tampoco tuvo efecto sobre la memoria cuando se administró antes de la inducción del malestar gástrico, en contraste, el bloqueo de los NMDAR en este momento de la adquisición afectó la memoria del CAS ( $F_{2,12} = 2.436$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 7B).

Hasta este momento, empleando los bloqueadores de algunos receptores de los sistemas de neurotransmisión que estudiamos, se obtienen resultados diferenciales, donde destacan dos resultados interesantes: el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos no tiene efectos sobre la memoria de aversión, lo cual indica que la señal noradrenérgica descrita en la CI podría no estar contribuyendo a

la formación de la memoria, sino estar relacionada a otros factores que se discutirán más adelante. El otro resultado se refiere al efecto negativo sobre el CAS con el bloqueo de los receptores tipo D1, lo que da pie a la hipótesis de que la señal dopaminérgica en CI dada por el sabor nuevo es necesaria para la adquisición del CAS.

## EXPERIMENTO 2

Para evaluar si los receptores D1 participan en la adquisición o en la consolidación (o ambas fases) del CAS, se analizó el efecto del bloqueo de dichos receptores en la memoria a corto y largo plazo. Si el bloqueo de los receptores D1 afecta la adquisición de la memoria de aversión, al evaluar la memoria a corto plazo los animales no recordarán que la sacarina les causó malestar; de manera que se inyectó SCH23390, el bloqueador de los receptores D1, 15 minutos antes de la adquisición del CAS y se midió el consumo de sacarina después de 4 horas (MCP) y de nuevo a las 72 horas (MLP). Este protocolo ha demostrado ser válido para medir MCP y MLP en los mismos animales, sin que la medición a las 4 horas interfiera con la medición a las 72 horas (Ferreira et al. 2002).

La figura 8 muestra que no hay diferencias entre los grupos en el consumo de sacarina a corto plazo, es decir todas las ratas recuerdan que ese sabor tiene consecuencias negativas, por lo que lo rechazan; mientras que a largo plazo se puede ver que las ratas que recibieron SCH23390 no consolidaron este aprendizaje ( $t=-2.467$   $p<0.05$ ), es decir. También se puede ver en la figura 8 que la inyección de este bloqueador inmediatamente después del consumo de sacarina no tiene efecto a corto ni a largo plazo, lo que indica que la señal dopaminérgica que se da específicamente por el consumo del sabor nuevo es necesaria para la consolidación.

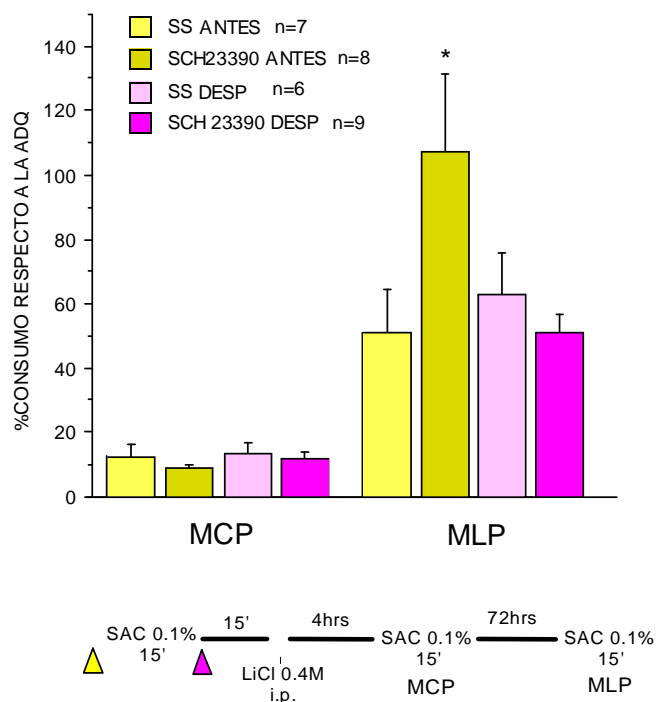


Fig. 8 **La actividad de los receptores D1 es necesaria durante la exposición al estímulo gustativo nuevo.** Efecto de la microinyección de SCH23390 en la corteza insular 15 min antes de la adquisición del CAS e inmediatamente después de la exposición a la sacarina en la memoria a corto (4 hrs.) y largo plazo (72 hrs.). El consumo de sacarina es expresado como porcentaje del consumo durante la adquisición  $\pm$  ES. \*  $p < 0.05$ .

### EXPERIMENTO 3

Dado que los receptores D1 en la CI intervienen específicamente en la consolidación del CAS, uno de los posibles mecanismos a través de los cuales podría dar lugar a cambios sinápticos más estables para formar la memoria a largo plazo, es la activación de PKA. Esta enzima puede ejercer cambios en la plasticidad sináptica a través de su efecto sobre el factor de transcripción CREB, inhibición de fosfatasa y cambios en la conductividad de canales iónicos (Dudman *et al.* 2003, Jay 2003, Skeberdis *et al.* 2006). Se sabe que la inhibición de la actividad de PKA afecta la consolidación de la memoria de varias tareas (Bernabeu *et al.* 1997a, Bernabeu *et al.* 1997b, Quevedo *et al.* 2004, Schafe *et al.* 1999), de manera que en el caso del CAS podría participar en la estabilización de la memoria mediante su actividad en la CI.

Para evaluar lo anterior, se administró un inhibidor específico de PKA, Rp-adenosina 3-,5- cíclica monofosfotioato trietilamina (Rp-cAMPS) 15 min antes de la adquisición del CAS y se realizó la prueba de memoria a corto y largo plazo. Como se observa en la figura 9, la inhibición de PKA en la CI no afecta la adquisición del CAS, ya que no se ven efectos en la MCP; sin embargo, en la prueba de MLP la aversión al sabor se ve atenuada y hay diferencias significativas contra el grupo al cuales e le administró vehículo ( $t=2.378$ ,  $p<0.05$ ).

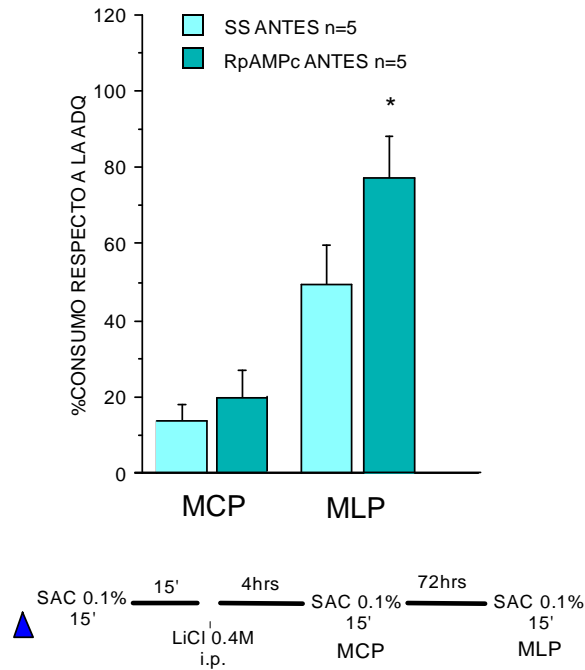
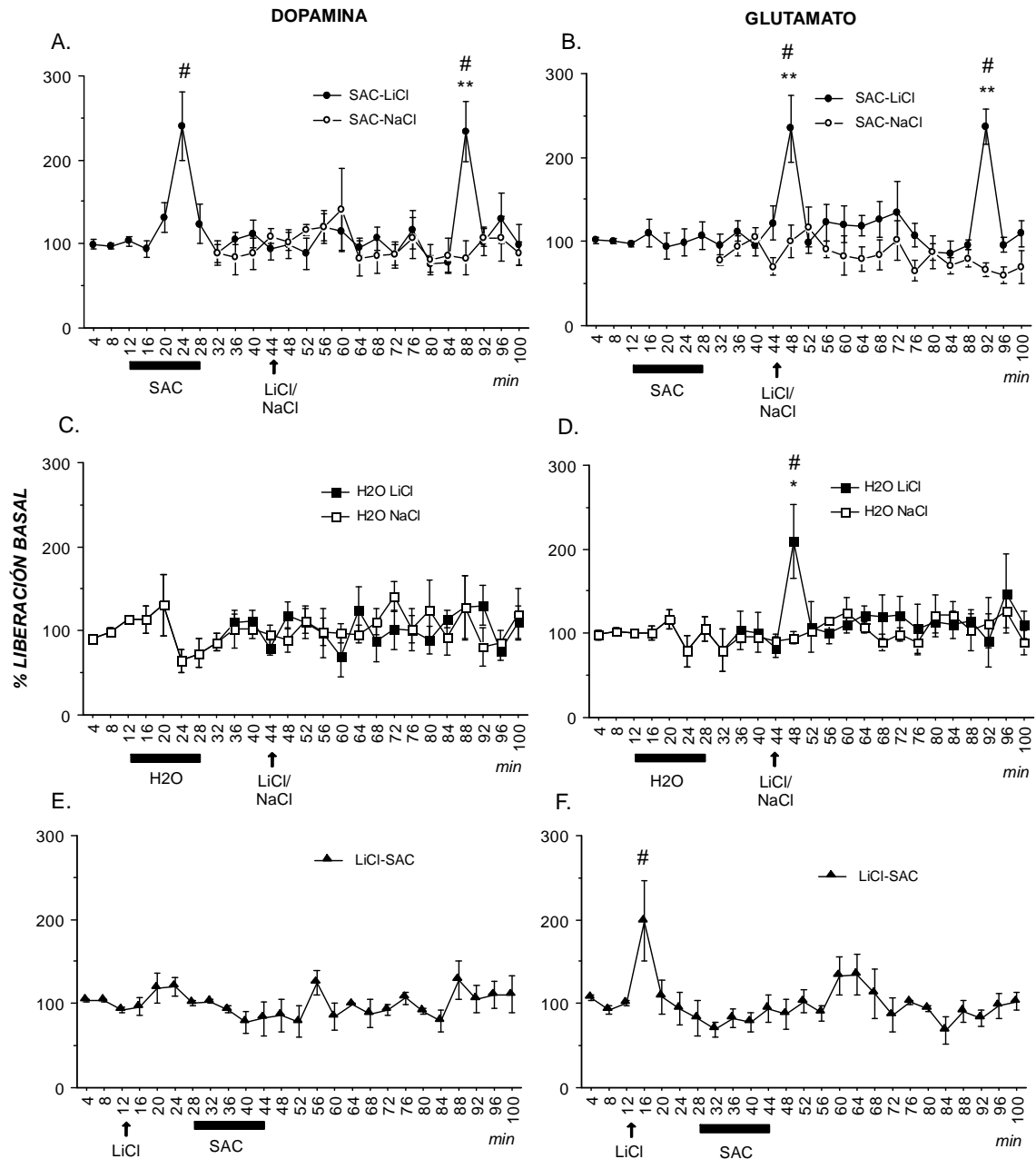


Fig. 9. **La actividad de PKA en la CI está involucrado en la consolidación del CAS.** Efecto de la inhibición de PKA en la MCP y MLP del CAS. El consumo de sacarina es expresado como porcentaje del consumo durante la adquisición  $\pm$  ES. \*  $p<0.05$ .

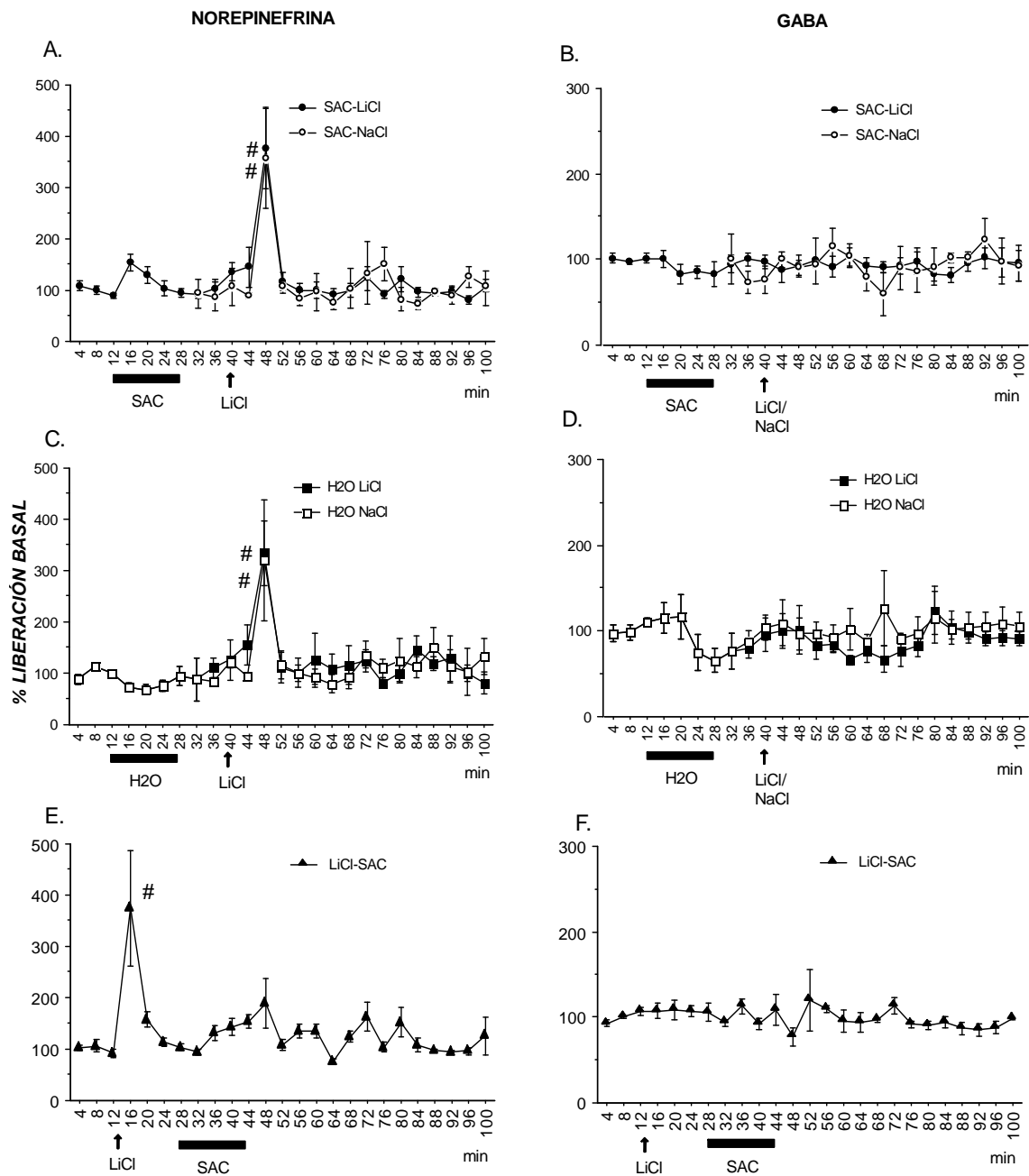
## 2. Monitoreo de la liberación de neurotransmisores en la CI durante la etapa post-adquisición.

Los resultados de la sección 2. y 3. fueron publicados en: **Guzmán-Ramos K, Osorio-Gómez D, Moreno-Castilla P, Bermúdez-Rattoni F.** *Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. J Neurochem.* 2010 Jul; 114(1):226-36, donde se encontrarán debidamente descritos.

Existen antecedentes que sugieren que la actividad post-adquisición de las estructuras que participaron en el procesamiento inicial de la información, podría sustentar la estabilización del trazo de memoria a largo plazo. Para determinar si existe actividad en la CI después del entrenamiento del CAS que se pueda relacionar con la adquisición de este condicionamiento, se monitorearon los siguientes grupos de animales por medio de microdiálisis por alrededor de dos horas, durante la exposición a los estímulos de acuerdo al grupo correspondiente y durante una hora extra: el grupo condicionado (SAC-LiCl n=10), fue expuesto durante 15 min a 10 mL de una solución de sacarina sódica al 0.1% seguida de una inyección i.p. de LiCl (0.4 M, 7.5 mL/kg) después de 15 min. En el grupo no condicionado (SAC-NaCl, n=7) las ratas se expusieron a la sacarina y recibieron después una inyección i.p. de NaCl (0.4 M, 7.5 mL/kg) que no causa malestar gástrico y no se desarrollará el condicionamiento. Otro grupo control fue expuesto a agua en vez de sacarina y recibió una inyección i.p. de LiCl (H<sub>2</sub>O-LiCl, n=5) y otro grupo de animales recibió una inyección de NaCl después del consumo de agua (H<sub>2</sub>O-NaCl, n=6). Finalmente se monitoreó un grupo con condicionamiento retrograde (LiCl-SAC, n=7), al cual se le indujo el malestar gástrico (LiCl 0.4 M, 7.5 ml/kg) y 15 min después se les presentó la solución de sacarina, siendo este protocolo un entrenamiento que no es efectivo para la formación de la memoria del CAS (Barker & Smith 1974). Tres días después del entrenamiento, la memoria de aversión fue evaluada mediante la re-exposición a la sacarina y se midió el consumo.



**Fig. 10** *Los niveles extracelulares de dopamina y glutamato incrementan en la corteza insular durante la etapa post-adquisición del condicionamiento de aversión al sabor.* (A) Comparación de la dopamina extracelular durante adquisición del CAS y una hora post-adquisición en un grupo condicionado (SAC-LiCl, n=10) y un grupo no condicionado (SAC-NaCl, n=7). (B) Comparación del glutamato extracelular en los grupos SAC-LiCl y SAC-NaCl. (C,D) Monitoreo de dopamina y glutamato extracelulares en los grupos control H2O-LiCl (n=5) y H2O-NaCl (n=6). (E,F) Monitoreo de dopamina y glutamato durante un condicionamiento retrógrado. Fracciones de 4 $\mu$ L; las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como % de liberación basal  $\pm$  ES. #  $p < 0.05$  vs. Fracciones basales y \*  $p < 0.05$  comparado con la misma fracción del grupo control.



**Fig. 11** *Los niveles extracelulares de norepinefrina y GABA en la corteza insular no presentan cambios significativos durante la etapa post-adquisición del condicionamiento de aversión al sabor.* (A) Comparación de la norepinefrina extracelular durante adquisición del CAS y una hora post-adquisición en un grupo condicionado (SAC-LiCl, n=10) y un grupo no condicionado (SAC-NaCl, n=7). (B) Comparación de GABA extracelular en los grupos SAC-LiCl y SAC-NaCl. (C,D) Monitoreo de norepinefrina y GABA extracelulares en los grupos control H2O-LiCl (n=5) y H2O-NaCl (n=6). (E,F) Monitoreo de norepinefrina y GABA durante un condicionamiento retrógrado. Fracciones de 4 $\mu$ L; las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como %de liberación basal  $\pm$  ES. #  $p < 0.05$  vs. fracciones basales y \*  $p < 0.05$  comparado con la misma fracción del grupo control.



El monitoreo en la CI reveló que existe actividad post-adquisición en la CI solo en el grupo que fue entrenado en al CAS; esta reactivación se presenta por medio de la liberación de DA y glutamato con una temporalidad muy cercana y que no se observa en el caso de la NE y GABA.

La figura 10 A y B muestran un incremento en la liberación de dopamina y glutamato en el grupo que fue condicionado y en la evaluación a largo plazo presenta aversión al sabor (figura 12); estas señales no se presenta en los demás grupos control que no desarrollaron aversión (Fig. 10 C-H), indicando que el pareamiento de estímulos durante el condicionamiento produce señales post-adquisición que podrían ser específicas de la formación de un trazo de memoria aversivo. Por otra parte, la figura 11 muestra que en el caso de la norepinefrina y GABA no se presentan dichas señales de reactivación en el grupo condicionado ni en los grupos control.

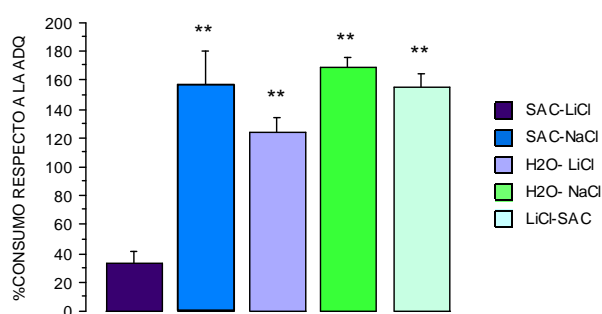


Fig. 12 Evaluación de la memoria 72 horas después de la exposición a los estímulos en los grupos monitoreados por microdiálisis. Se muestra que sólo el grupo condicionado presenta aversión al sabor.  $**p < 0.01$  vs SAC-LiCl.

## Participación en la etapa postadquisición de los receptores NMDA y D1 en la consolidación de la memoria del CAS.

Para determinar el significado funcional de los cambios extracelulares de DA y glutamato en la CI en la etapa post-adquisición se bloquearon los NMDAr (APV, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), los D1 (SCH23390, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) o ambos simultáneamente 30 min después del periodo de adquisición (Fig 13).

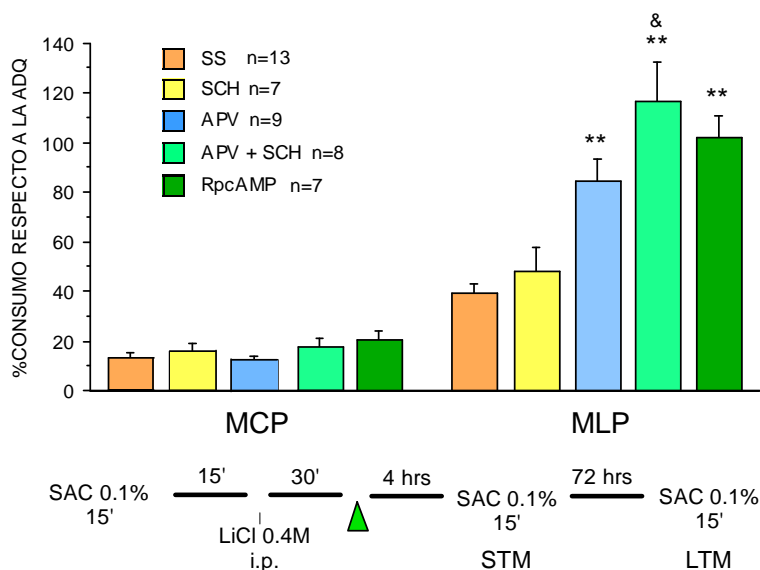


Fig. 13 **La actividad de los receptores D1 potencia la actividad de los NMDAr en la CI durante la post-adquisición para la consolidación del CAS.** Efecto de la administración intracortical (triángulo verde) de APV, SCH, una mezcla de éstos y Rp-AMPC en la MCP y MLP del CAS. El consumo de sacarina es expresado como porcentaje del consumo durante la adquisición  $\pm$ ES. \*  $p < 0.05$  vs SS; &  $p < 0.05$  APV+SCH vs. APV.

Los resultados de este experimento nos indican que las señales post-adquisición intervienen en el proceso de consolidación específicamente, ya que la MCP no se ve afectada por estas manipulaciones farmacológicas. También se muestra que la señal dopaminérgica en la etapa post-adquisición, por si sola, no es suficiente para desencadenar mecanismos que lleven a la consolidación del CAS; por el contrario, la actividad de los NMDAr tiene un papel más importante en este proceso, ya que su bloqueo tiene efectos significativos en la MLP. Interesantemente, el bloqueo simultáneo de los receptores D1 y NMDA tiene un efecto mayor en la atenuación de la MLP del CAS, incluso rebasando el consumo de

sacarina durante la adquisición, de manera que estas ratas no muestran aversión al sabor. Esto sugiere que la actividad de los D1 podría potenciar la actividad de los NMDA para el fortalecimiento y estabilización del trazo de memoria.

### **Papel de PKA en la sinergia NMDA-D1**

Se ha reportado que existe una sinergia entre los receptores NMDA y D1, la cual es dependiente de la actividad de PKA (Baldwin *et al.* 2002, Cepeda *et al.* 1998, Hallett *et al.* 2006, Wang & O'Donnell 2001, Tseng & O'Donnell 2004). PKA es activado a través del incremento de AMPc ocasionado por la estimulación de los receptores D1; PKA fosforila la subunidad NR1 del receptor NMDA, incrementando la conductividad del canal, favoreciendo la respuesta neuronal.

Para evaluar si la actividad post-adquisición de PKA es necesaria para la consolidación del CAS, administramos Rp-AMPC (0.065 µg/µL, n=7) 30 min después del periodo de la adquisición (Fig 13). Este bloqueo afectó la MLP pero no la MCP, indicando que la activación de PKA podría ser vía a través de la cual se da la sinergia NMDA-D1 que favorece la consolidación del CAS.

Dado que la inhibición de la actividad de PKA en el tiempo en el que se presenta la reactivación neuroquímica afectó la consolidación, buscamos averiguar si efectivamente PKA fosforila la subunidad NR1 en este momento de la formación de la memoria. Ratas correspondientes a los mismos grupos monitoreados por microdiálisis fueron sacrificadas 42 minutos después de la adquisición y se disectó la región de la CI que corresponde a la corteza gustativa y se homogenizó en amortiguador de lisis (0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM NaHCO<sub>3</sub>, 1mM NaF, 2mM ortovanadato de sodio, 20 mM betaglicerofosfato, tableta de inhibidores de proteasas de Roche). Se realizaron inmunoblots para detectar la subunidad NR1 fosforilada en Ser897, residuo en el cual actúa PKA, y se comparó con NR1 total.

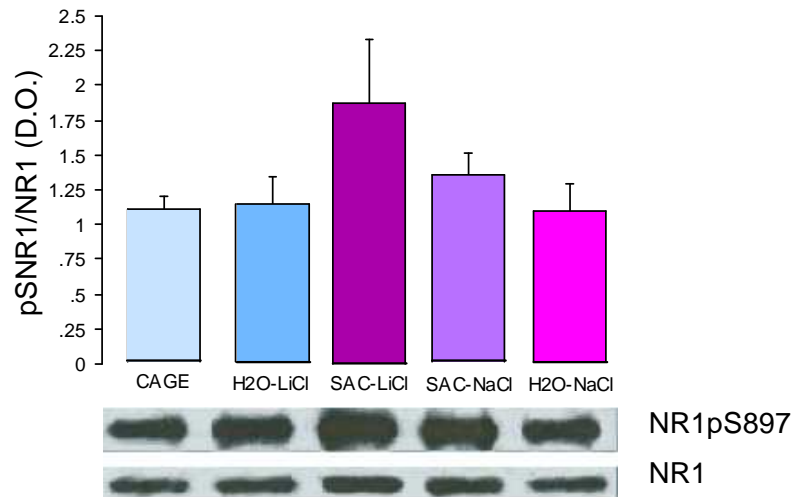


Fig. 14 Fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA en homogenado de Cl. Las muestras se obtuvieron 42 min después del pareamiento de los estímulos durante la adquisición del CAS. Los resultados se muestran como la media de la densidad óptica de la banda correspondiente a la proteína fosforilada entre el total de la proteína  $\pm$  ES.

Los resultados indican una tendencia hacia el incremento en NR1p en el grupo condicionado, sin embargo no es significativamente diferente de los grupos control (Fig. 14). Posiblemente, PKA está actuando también a través de la fosforilación de otros sustratos para tener los efectos conductuales antes descritos.

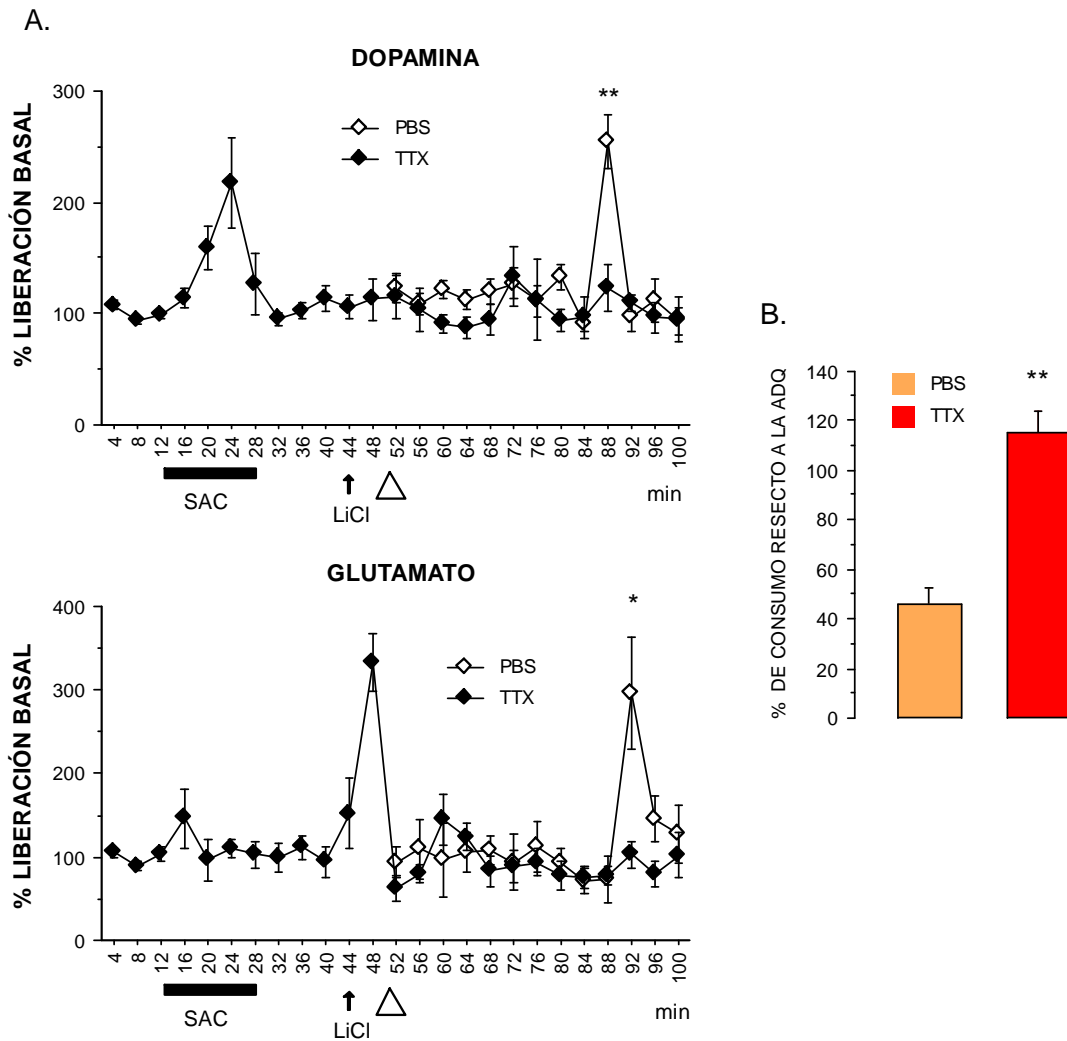
### 3. Participación de la amígdala en la reactivación neuroquímica de la CI y la consolidación del CAS.

Se ha propuesto que la modulación que ejerce la amígdala contribuye a la consolidación de la memoria del CAS (Gallo *et al.* 1992, Roldan & Bures 1994, Sakai & Yamamoto 1999). Esta modulación puede ser a través de las proyecciones glutamatérgicas hacia la CI (Bermudez-Rattoni and McGaugh, 1991) y el VTA (Kaufling *et al.* 2009). Respecto a esto, se ha demostrado que el bloqueo post-adquisición de los NMDAr dentro del VTA, afecta la MLP de la tarea de prevención pasiva<sup>1</sup> (Rossato *et al.* 2009). Como hemos mencionado antes, la amígdala tiene conexiones recíprocas con la CI y ha sido reportado que la estimulación tetánica de la ABL induce PLP en la CI e incrementa la retención de la memoria del CAS (Escobar *et al.* 1998). Además, la administración post-adquisición de glutamato en la ABL aumenta la fuerza del CAS, siendo este efecto dependiente de la actividad de los NMDAr en la CI (Ferreira *et al.* 2005). Teniendo en cuenta esta información, evaluamos si el incremento post-adquisición de DA y glutamato en la CI dependían de la activación de la amígdala. Empleamos TTX (n=6, 10 ng/ $\mu$ L en PBS) para bloquear temporalmente a la amígdala, mientras monitoreamos la respuesta de la CI. Como puede verse en la figura 15A, la inactivación de la amígdala inhibió el incremento de glutamato (fracción 92 min,  $t=2.782$ ,  $p<0.05$ ) y dopamina (fracción 88 min,  $t=3.562$ ,  $p<0.01$ ) que se replica en el grupo control que recibió una infusión intra-amigdalar de amortiguador de fosfatos (PBS, n=5).

Estos resultados indican que la actividad de la amígdala está involucrada en la reactivación neuroquímica dentro de la CI. La figura 15B muestra la prueba a largo plazo de estos grupos, donde se muestra que la amígdala es necesaria en la etapa post-adquisición para que la aversión al sabor sea consolidada ( $t=5.978$ ,  $p<0.01$ , PBS vs. TTX).

---

<sup>1</sup> En esta tarea los animales aprenden a evadir una zona previamente asociada con choques en las patas.

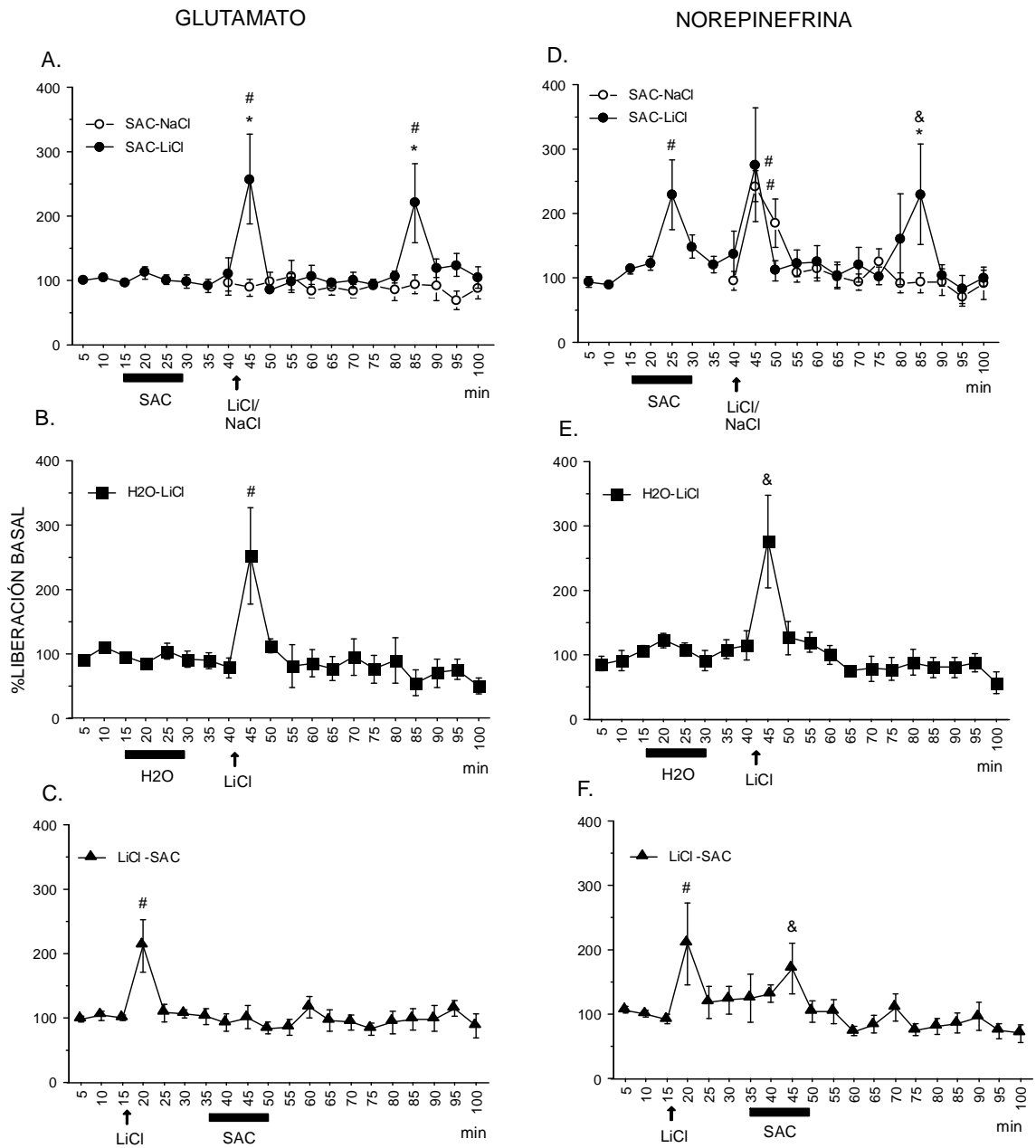


**Fig. 15 La inactivación reversible de la amígdala durante la etapa post-adquisición afecta los incrementos corticales de dopamina y glutamato, así como la formación del CAS** (A) Efectos de la infusión bilateral de tetrodotoxina (TTX) o PBS en la amígdala (triángulo) en los niveles de glutamato y dopamina en la CI. La gráfica se expresa como la media de la liberación basal  $\pm$  ES. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  vs. grupo control. (B) Prueba de memoria a largo plazo de los grupos microdializados. Los resultados se muestran como % de consumo respecto al consumo durante la adquisición  $\pm$  ES. \*\*  $p < 0.01$  vs. PBS.

#### **4. Monitoreo de la liberación de neurotransmisores en la amígdala durante la etapa post-adquisición.**

Después de comprobar que la actividad de la amígdala interviene en la consolidación del CAS, nuestro siguiente objetivo fue monitorear los cambios extracelulares de glutamato, GABA, NE y DA en esta estructura durante la adquisición y post-adquisición del CAS, lo que nos permitirá evaluar también las señales de neurotransmisión asociadas a la presentación de los estímulos condicionado e incondicionado y los neurotransmisores que están actuando en la reactivación de la amígdala.

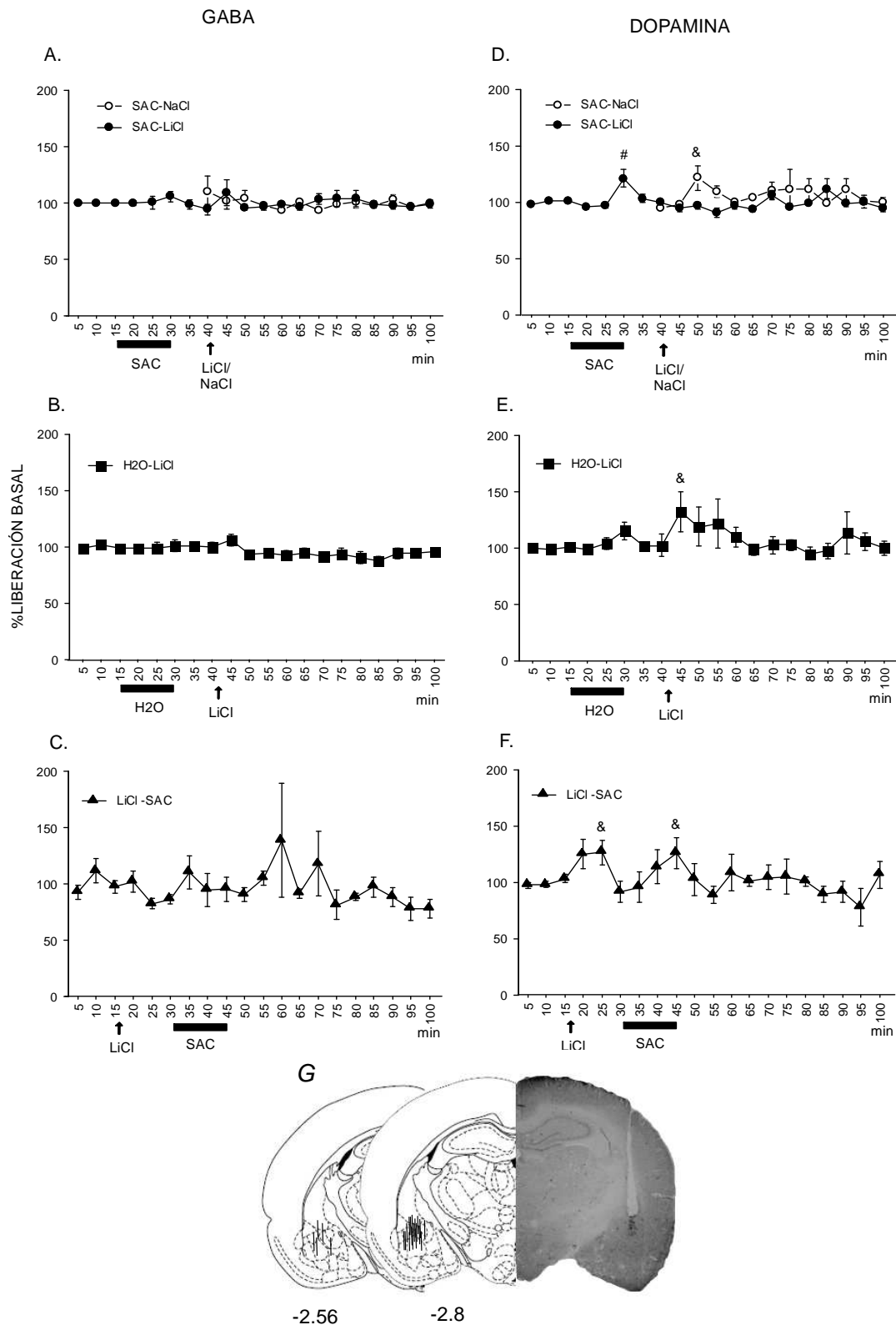
Los siguientes grupos de animales fueron monitoreados por microdiálisis en libre movimiento por alrededor de dos horas. Un grupo condicionado (SAC-LiCl n=6), que fue expuesto durante 15 min a 10 mL de una solución de sacarina 0.1% y 15 min después recibió una inyección i.p. de LiCl (0.4 M, 7.5 mL/kg). El grupo no condicionado (SAC-NaCl, n=6), que fue expuesto a la solución de sacarina y después recibió una inyección i.p. de NaCl (0.4 M, 7.5 mL/kg) que no causa aversión. Otro grupo control fue expuesto a agua en lugar de sacarina y recibió la inyección de LiCl (H<sub>2</sub>O-LiCl, n=6). Finalmente, se empleó también como control un grupo con condicionamiento retrograde (LiCl-SAC, n=6) en el cual se presentó el EI antes que el EC, lo cual hemos visto que resulta ineficiente para formar el CAS. Tres días después del entrenamiento, se evaluó la memoria reexponiendo a los animales a la sacarina y midiendo su consumo.



**Fig. 16 Los niveles extracelulares de norepinefrina y glutamato incrementan en la amígdala durante la etapa post-adquisición del condicionamiento de aversión al sabor.**

(A y D) Comparación del glutamato y norepinefrina extracelular, respectivamente, en la amígdala durante adquisición del CAS y una hora post-adquisición en un grupo condicionado (SAC-LiCl, n=6) y un grupo no condicionado (SAC-NaCl, n=6). (B y D) Monitoreo de glutamato y norepinefrina extracelulares en el grupo control H2O-LiCl (n=6). (C y F) Monitoreo de glutamato y norepinefrina durante un condicionamiento retrógrado. Fracciones de 4uL; las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como % de liberación basal  $\pm$  ES. #  $p < 0.05$  vs. Fracciones basales y \*  $p < 0.05$  comparado con la misma fracción del grupo control.





**Fig. 17** *Los niveles de dopamina y GABA en la amígdala no cambian significativamente en la etapa postadquisición.* Monitoreo de la liberación de GABA y dopamina en la amígdala durante la adquisición del CAS y una hora post-adquisición. Fracciones de 4 $\mu$ L; las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como %de liberación basal  $\pm$  ES. #  $p < 0.05$  vs. fracciones basales y \*  $p < 0.05$  comparado con la misma fracción del grupo control.(G) Micrografía representativa de la implantación de cánulas guía y la localización de las membranas de microdiálisis, los números indican la coordenada AP respecto a bregma.

La concentración basal de glutamato fue de  $2 \pm 0.13 \mu\text{M}$  en los grupos microdializados. Una ANOVA de dos vías indicó que existen diferencias significativas entre grupos ( $F_{3,397}=5.604$ ,  $p<0.01$ ) y entre fracciones ( $F_{20,397}=3.695$ ,  $p<0.01$ ). La figura 16A muestra que no hay cambios en la liberación de glutamato en la amígdala después de la exposición de sacarina en los grupos SAC-LiCl y SAC-NaCl. Sin embargo, la administración de LiCl 0.4 M indujo un incremento significativo de glutamato ( $p<0.01$  vs. Fracciones basales), mientras que la administración de una solución equimolar de NaCl no indujo tal incremento ( $p=0.0402$ , SAC-LiCl vs. SAC-NaCl en la fracción 45 min). Interesantemente, un análisis post-hoc indicó que en la fracción de los 85 min durante el monitoreo post-adquisición existen diferencias significativas entre estos dos grupos ( $p=0.0216$ ). Se puede observar un claro incremento de glutamato en el grupo condicionado, que no se presenta en los demás grupos control (Fig. 16 B y C). Para descartar que esta sea una señal tardía de la inducción del malestar gástrico, se comparó esta respuesta con la producida por el grupo H<sub>2</sub>O-LiCl. Como vemos en la figura 16B, los niveles de glutamato no se vieron afectados por el consumo de agua y la administración del LiCl indujo un incremento de casi 250% de la liberación basal ( $p<0.01$  vs. fracciones basales). Sin embargo, no hay cambios post-adquisición en este grupo. También evaluamos un grupo que fue sujeto a condicionamiento retrogrado (Fig. 16C) En este grupo la administración de LiCl también indujo una liberación significativa de glutamato ( $p<0.01$  vs. fracciones basales) y la exposición a sacarina no tuvo efecto en los niveles extracelulares de glutamato. Tampoco se observan incrementos post-adquisición, sugiriendo que solo el pareamiento de estímulos para la formación del CAS induce la reactivación neuroquímica.

En el caso de la norepinefrina, la concentración en las fracciones basales fue en promedio de  $5 \pm 0.53 \text{ nM}$ . El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre grupos ( $F_{3,382}=6.172$ ,  $p<0.01$ ) y entre fracciones ( $F_{20,382}=6.460$ ,  $p<0.01$ ). Durante el monitoreo del condicionamiento hubo incrementos significativos de NE extracelular ( $p<0.001$ ) relacionados con la exposición al sabor nuevo (Fig. 16D) que no se observan con la exposición al agua (Fig. 16E). En el caso de los grupos SAC-LiCl y SAC-NaCl, la administración i.p. de estas sales indujo un incremento transitorio de NE ( $p'<0.01$  vs. línea basal, para ambos grupos); sin embargo el subsecuente monitoreo reveló un incremento del

210% exclusivamente en los animales entrenados 40 min tras la inducción del malestar gástrico (fracción 85 min,  $p < 0.05$ ). Este incremento fue significativamente diferente del grupo SAC-NaCl ( $p < 0.05$ ), que no desarrolló aversión. Por último, en el grupo con condicionamiento retrograde, se observan incrementos significativos tras la inyección de LiCl ( $p < 0.01$ ) y la presentación de sacarina ( $p < 0.05$  vs. Fracciones basales), pero no se aprecia actividad durante la post-adquisición. Estos resultados concuerdan con el hecho de que aquellos grupos que no adquirieron el CAS, no muestran reactivación neuroquímica.

Dado que analizamos catecolaminas y aminoácidos simultáneamente, determinamos los cambios extracelulares de GABA y dopamina en la amígdala en las mismas condiciones experimentales previamente descritas (Fig. 17). La concentración basal de GABA y DA fue de  $0.15 \mu\text{M}$  y  $6.35 \pm 0.13 \text{ nM}$  respectivamente. Tanto los receptores GABAérgicos como dopaminérgicos en la amígdala han sido relacionados con reacciones autónomas y conductuales al miedo y la ansiedad, particularmente como respuesta a estímulos previamente condicionados como aversivos (Perez de la Mora *et al.* 2010, Inglis & Moghaddam 1999, Stork *et al.* 2002). Esta podría ser la razón por la cual no se aprecian cambios significativos en GABA durante la adquisición (Fig. 17 A-C). Sin embargo, la exposición a la sacarina estuvo relacionada con un pequeño, pero significativo incremento de DA en los grupos SAC-LiCl, SAC-NaCl y LiCl-SAC (Fig. 17D-F,  $p's < 0.05$  vs. línea basal), lo que podría implicar en parte la señalización de un sabor nuevo potencialmente dañino. Por otra parte, la estimulación visceral con la inyección i.p. de LiCl se relacionó con un incremento de DA en los grupos H<sub>2</sub>O-LiCl y LiCl-SAC ( $p's < 0.05$ ), pero en el grupo condicionado SAC-LiCl, no indujo cambios apreciables, a pesar de que el NaCl también indujo cierto incremento de DA ( $p < 0.05$  vs. Línea basal). Se ha reportado que estímulos estresantes, como la manipulación, induce un incremento de DA en la amígdala (Inglis & Moghaddam 1999), de manera que la administración i.p. podría ser responsable de esta respuesta. Como puede observarse, no hay incrementos significativos de GABA o DA en el monitoreo postadquisición de ningún protocolo conductual, sugiriendo que ninguno de estos neurotransmisores está involucrado en la reactivación de la amígdala que favorece la consolidación de CAS.

## Participación en la etapa post-adquisición de los receptores NMDA y $\beta$ -adrenérgicos en la consolidación de la memoria del CAS.

Los resultados de la sección 3 indicaron que la actividad de la amígdala es necesaria en la post-adquisición para la consolidación del CAS, en esta sección describimos que dicha reactivación se da a través de señales noradrenérgicas y glutamatérgicas. Junto con la actividad de los NMDAr, existe evidencia de que los neuromoduladoras influyen en la regulación del proceso de consolidación en periodos post-adquisición; particularmente se ha visto involucrado el sistema noradrenérgico ( McGaugh et al. 2002). Por ejemplo, la infusión intra-amigdalara de antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tras el entrenamiento de prevención pasiva, afectó la consolidación de la memoria y la administración concurrente de NE atenúan dicho efecto (Gallagher et al. 1977). Por otra parte, la infusión de un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tras el entrenamiento de este aprendizaje, mejora la consolidación de la memoria (Ferry & McGaugh 1999, Ferry et al. 1999).

De esta forma evaluamos el papel funcional de las señales glutamatérgicas y noradrenérgicas durante la etapa de reactivación neuroquímica mediante el bloqueo de los NMDAr (APV, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) o los  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 30 min después del periodo de adquisición y evaluamos el efecto en la memoria a corto y largo plazo. Una ANOVA simple mostró que no hay diferencias entre los grupos en la prueba a corto plazo, indicando que la manipulación farmacológica no afectó la adquisición de la tarea (Fig 18); sin embargo, hay diferencias significativas en la prueba a largo plazo ( $F_{2,49} = 16.563, p < 0.01$ ), Una prueba post-hoc reveló que tanto el grupo APV como el PROP consumieron significativamente más sacarina que el grupo SS en la prueba a largo plazo MLP ( $p < 0.01$ ), el cual desarrolló una clara aversión. Cabe señalar que el consumo del grupo APV fue significativamente mayor que el del grupo PROP ( $p < 0.01$ ), indicando que aunque la actividad post-adquisición de ambos tipos de receptores está involucrado en la consolidación del CAS, el bloqueo de los NMDAr causó un mayor efecto, ya que los animales de este grupo no presentan ninguna aversión, siendo casi del 100% de su consumo durante la adquisición.

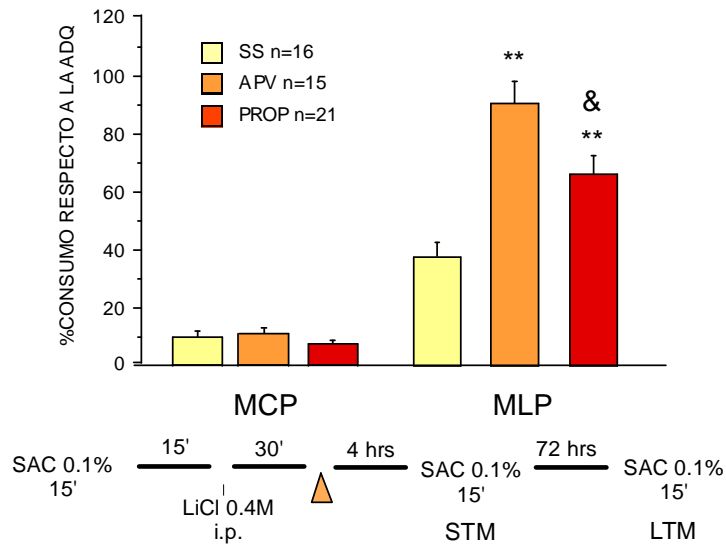


Fig. 18 **La actividad de los receptores NMDA y  $\beta$ -adrenérgicos en la etapa post-adquisición, está involucrada en la consolidación del CAS.** Efecto de la administración intra-amigdalár (triángulo naranja) de solución salina (SS), APV o propranolol en la MCP y MLP del CAS. El consumo de sacarina es expresado como porcentaje del consumo durante la adquisición  $\pm$  ES. \*\*  $p < 0.01$  vs. SS; &  $p < 0.01$  PROP vs. APV.

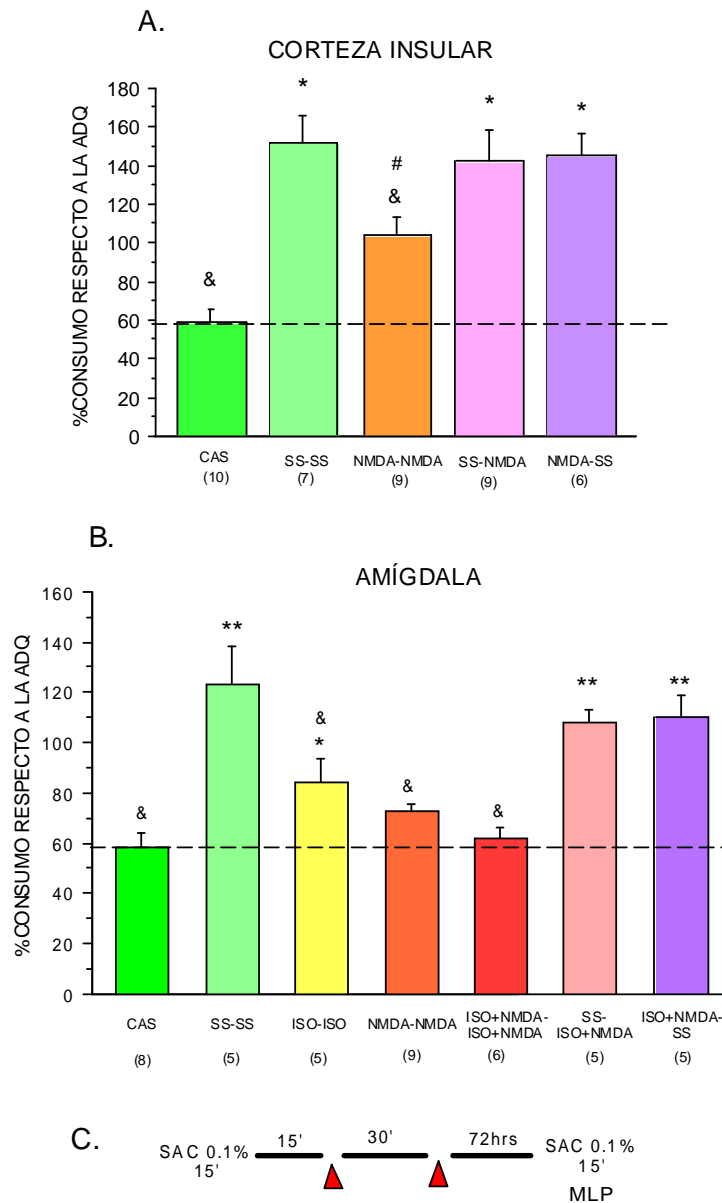
## 5. Inducción del CAS en ausencia de LiCl:

### Importancia de los receptores NMDA en la formación de la memoria.

Las evidencias que hemos presentado sugieren que los NMDAr poseen un papel fundamental en varias etapas de la formación de la memoria del CAS. Su actividad es necesaria para la señalización del malestar gástrico durante la etapa de adquisición y después, durante la reactivación neuroquímica, tanto en CI como en amígdala. En esta última, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están involucrados en la formación del CAS durante la inducción del malestar (Miranda et al. 2003) y en la etapa post-adquisición. El objetivo de los experimentos de esta sección fue evaluar el efecto de la estimulación exógena de estos receptores en los momentos de en los que se presentan los incrementos de glutamato y NE durante el monitoreo.

El esquema de administración intracerebral consistió realizar una inyección 15 min después de la exposición a sacarina y otra inyección 30 min después, evaluando la MLP 72 horas después. Los grupos empleados en el caso de la CI fueron los siguientes: SS-SS (n=9) doble administración de solución salina; NMDA-SS (n=6), SS-NMDA (n=9); la dosis empleada fue de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en solución salina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; (Koh et al. 2003) y NMDA-NMDA (n=8). Estos grupos fueron comparados con un grupo expuesto a sacarina sódica 0.1% durante 15 min y 15 min después se le administró LiCl 0.15M i.p. (75 mL/kg; CAS, n=10) (Fig. 19 A).

En el caso de la amígdala, se emplearon agonistas de los receptores NMDA y  $\beta$ -adrenérgicos, administrados en el esquema de doble inyección en los siguientes grupos: SS-SS (n=5); ISO-ISO (n=5) recibieron doble inyección de isoproterenol (30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Zhang et al. 2001)); NMDA-NMDA (n=9), recibieron doble inyección de NMDA; otro grupo recibió una mezcla de los agonistas, ISO+NMDA-ISO+NMDA (n=6) y dos grupos controles que recibieron solo una inyección de la mezcla, SS-ISO+NMDA (n=5) y ISO+NMDA-SS (n=5). El consumo a largo plazo de estos grupos se comparó con el de un grupo que adquirió el CAS (n=8).



**Fig. 19 La estimulación exógena de los NMDAr en la amígdala induce CAS.** Efecto de la doble inyección de NMDA en amígdala y CI en ausencia de la administración de LiCl. (A) Prueba a largo plazo de los grupos control (SS-SS, solución salina; SS-NMDA, NMDA-SS) y el grupo al cual se le administró NMDA en dos ocasiones en la CI (NMDA-NMDA); todos comparados con un grupo que recibió CAS. (B) Prueba a largo plazo de los grupos control (SS-SS; SS-ISO+NMDA, ISO+NMDA-SS) y los grupos a los cuales se les administró NMDA y NMDA+ISO en dos ocasiones en la amígdala. (C) Esquema de administración de fármacos. El consumo de sacarina es expresado como porcentaje del consumo durante la adquisición  $\pm$ ES \* $p$ <0.05 vs. CAS, \*\* $p$ <0.01 vs. CAS, & $p$ <0.05 vs. grupo SS.

La figura 19A muestra que la activación de los NMDAr en la CI durante los momentos críticos que logramos identificar mediante el monitoreo con microdiálisis no genera aversión al sabor, sin embargo, el consumo en la prueba a largo plazo

del grupo con doble inyección de NMDA se encuentra alrededor del 100% del consumo durante la adquisición y es significativamente diferente de los grupos control ( $F_{4,36}=12.594$ ,  $p's<0.01$  NMDA-NMDA vs. grupos control), indicando que este sabor tampoco fue consolidado como seguro de consumir. En cambio, el efecto de la doble inyección de NMDA en amígdala indica la generación de una aversión similar a la producida por un CAS débil que se consigue con un EC y un EI de baja intensidad. Por otra parte, la estimulación exógena de los receptores  $\beta$  en el mismo esquema de inyección doble no alcanza a ser suficiente para inducir la aversión antes descrita, sin embargo genera cierta aversión, ya que las ratas de este grupo disminuyeron su consumo, el cual es significativamente diferente del consumo del grupo con inyecciones de salina (SS-SS,  $n=5$ ), que incrementa en la prueba a largo plazo ( $p<0.01$ ) (Fig. 19B). También evaluamos el efecto de la administración simultánea de estos agonistas, ya que en la amígdala hay una liberación concomitante de glutamato y NE durante el EI y en la post-adquisición. Este grupo (ISO+NMDA-ISO+NMDA,  $n=6$ ) presenta una aversión de una magnitud similar al grupo CAS ( $n=8$ ), que fue expuesto a EC y EI de baja intensidad, de manera que no es significativamente diferente del grupo que recibió NMDA-NMDA, pero muestra una mayor aversión que el grupo ISO-ISO ( $p<0.05$ ). Como grupos control, realizamos inyecciones de la mezcla de agonistas solo una vez y en la otra inyección administramos solución salina (ISO+NMDA-SS,  $n=5$ ; SS-ISO+NMDA,  $n=5$ ). Con estos grupos mostramos que para inducir aversión al sabor, es necesaria la actividad de los NMDAr y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en los dos momentos que identificamos en el monitoreo de la amígdala durante el condicionamiento y en la etapa post-adquisición.



## IX. DISCUSIÓN

Durante la adquisición y consolidación de una experiencia, varios mecanismos celulares necesitan ser activados por señales neuroquímicas. Sin embargo, no todos los cambios moleculares se relacionan con la formación del trazo de memoria. En el desarrollo de esta tesis nos hemos aproximado a entender la contribución de algunos sistemas de neurotransmisión en la etapa de adquisición y post-adquisición de la memoria del CAS.

### *Señales relacionadas con el estímulo gustativo nuevo: CI*

Varios estudios han demostrado que existe actividad en la CI durante el procesamiento del estímulo gustativo; por ejemplo, la exposición a un sabor nuevo produce cambios eléctricos y moleculares tales como incremento en el disparo de neuronas (Hanamori *et al.* 1998, Katz *et al.* 2001, Ogawa *et al.* 1992); expresión de GEIs, como *c-fos* (Bernstein & Koh 2007) e incremento en la liberación de acetilcolina (Miranda *et al.* 2000, Shimura *et al.* 1995). En el presente trabajo reportamos también cambios en la liberación de neurotransmisores, particularmente DA y NE, que no se presentan al exponer al animal a un sabor familiar, como es el agua. En el caso de la actividad noradrenérgica en la CI, parece no participar en la formación del CAS, ya que el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos antes de la presentación de un estímulo gustativo nuevo, no afecta este tipo de aprendizaje; de manera que el incremento puede obedecer a que el sistema noradrenérgico central participa en mecanismos de atención (Robbins 1995, Robbins 1997), como aquellos involucrados en la exposición a estímulos nuevos, además está comprobado que las neuronas del LC se activan como respuesta a la novedad de estímulos gustativos (Cole *et al.* 1988); recordemos que el LC tiene proyecciones directas a la CI (Saper 1982), y por lo tanto la activación de este núcleo noradrenérgico provocaría un aumento de norepinefrina en sus estructuras eferentes (Pudovkina *et al.* 2001, McQuade *et al.* 1999). Por otro lado, se ha dicho que la actividad noradrenérgica está implicada en ansiedad y estrés (Rossetti *et al.* 1990, Morilak *et al.* 2005) y que estos estados acompañan a situaciones en los que hay ambientes desconocidos (Robbins 1995). Es posible

entonces que la respuesta noradrenérgica observada se deba a las implicaciones que tiene el hecho de consumir un alimento nuevo, es decir, el consumir poco del mismo porque no se saben las consecuencias postingestionales, lo que refleja una respuesta neofóbica (miedo a lo nuevo) que depende de la intensidad o del sabor o del tipo de sabor. Presumiblemente la actividad noradrenérgica en CI formaría parte del mecanismo que permite enfocar la atención en eventos relevantes o en situaciones amenazantes como las que suponen ingerir un alimento desconocido.

Si bien, hay evidencias que muestran la participación directa de la norepinefrina en los mecanismos de la neofobia, los resultados respecto a su papel modulador suelen ser contradictorios y dependen de las condiciones experimentales bajo las que se llevó a cabo el estudio (Steketee *et al.* 1992) además de que no se cuenta con información a este respecto en la CI. De tal manera que el presente trabajo aporta nueva información con la ventaja que ofrece el monitoreo de la liberación por medio de microdiálisis en libre movimiento donde el animal está en completa posesión de sus funciones, pero en condiciones controladas que permiten asegurarnos de que el único estímulo nuevo sea el gustativo.

La respuesta dopaminérgica en CI es muy clara e incrementa cuando se presenta un estímulo gustativo nuevo; algunas evidencias muestran resultados similares en otras estructuras que reciben aferencias dopaminérgicas como núcleo accumbens (Bassareo & Di Chiara 1997, Feenstra *et al.* 2000) y corteza prefrontal (Bassareo & Di Chiara 1997, De Leonibus *et al.* 2006, Rossetti & Carboni 2005, Feenstra *et al.* 2000) durante la exposición a estímulos nuevos. Se ha planteado que las respuestas dopaminérgicas se dan no sólo por la calidad recompensante de los estímulos sino por la importancia conductual que éstos tengan (Ljungberg *et al.* 1992, Ungless 2004); los estímulos gustativos nuevos son importantes para los animales ya que pueden derivar en consecuencias adversas (nauseas, malestar gástrico, muerte).

Respecto a la cinética de la liberación de glutamato tras la exposición al estímulo gustativo, mostramos que no hay cambios significativos en la CI respecto a este neurotransmisor. Ésto concuerda con evidencias previas donde se

monitorearon los niveles de glutamato en esta misma estructura durante la exposición a un estímulo gustativo nuevo (Miranda et al. 2002).

Al no haber encontrado variaciones en este neurotransmisor, podría pensarse que no hay un incremento de la actividad glutamatérgica relacionada con la presentación de un estímulo gustativo nuevo. Una evidencia que apoyaría esto último es la proporcionada por Giovaninni y colaboradores (Giovannini et al. 2001), donde no se observan modificaciones en la liberación de glutamato en la corteza prefrontal de ratas al colocarlas en un contexto espacial nuevo, ni cuando este contexto ya es familiar. Existe muy poca información acerca de los cambios extracelulares de glutamato y GABA durante la presentación de estímulos nuevos, el trabajo de Govannini también muestra que no hay cambios GABAérgicos en la corteza prefrontal relacionados con la novedad de estímulos como vimos que sucede en la CI.

#### *Señales relacionadas con el estímulo gustativo nuevo: amígdala*

Varios estudios han reportado un incremento en la actividad de la amígdala en relación con la exposición al estímulo gustativo nuevo. Por ejemplo, durante la ingestión de varias soluciones con diferente sabor, se localizaron varias neuronas que respondían a estos estímulos en la ACe (Nishijo et al. 2000, Nishijo et al. 1998), y en la ABL (Fontanini et al. 2009). Además se ha encontrado expresión de *c-fos* principalmente en la ACe tras la exposición a un estímulo gustativo nuevo que no se observa cuando se vuelve un sabor familiar (Koh et al. 2003, Yamamoto et al. 1997). En terminos de liberación de neurotransmisores, se ha reportado que no existen cambios extracelulares de glutamato en la ABL cuando las ratas son expuestas a un sabor nuevo (Miranda et al. 2002), lo cual concuerda con los resultados presentados en este trabajo. De esta forma la actividad de la amígdala que ha sido asociada con la estimulación gustativa (Yamamoto et al. 1997) puede deberse a la actividad noradrenérgica que se observa cuando se presenta la solución de sacarina. Respecto a ésto, se ha reportado un incremento en la actividad neuronal del LC y liberación de NE en la amígdala relacionada con la exposición a estímulos nuevos, como la exploración de un ambiente desconocido (Scullion et al. 2009) y estímulos gustativos (Cole et al. 1988). Dado que la

principal proyección noradrenérgica hacia la amígdala proviene del LC, es probable que el incremento de NE observado durante nuestro monitoreo pueda ser un reflejo de la actividad del LC. Apoyando la idea de que la liberación de NE se relaciona con la novedad de los estímulos, se ha demostrado que la inyección intra-amigdalar de NE antes de la exposición a diferentes sabores, incrementa la preferencia por sabores familiares sobre los nuevos (Borsini & Rolls 1984). Por el contrario, el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la ABL reduce la neofobia (miedo a los estímulos nuevos) en ratas privadas de alimento, haciéndolas más propensas a elegir alimentos nuevos sobre el alimento que recibían regularmente (Rooszendaal & Cools 1994).

### *Señales relacionadas con el estímulo visceral*

Los resultados de liberación muestran una respuesta glutamatérgica específica a la inducción del malestar gástrico dado que en las ratas a las cuales se les inyectó una solución equimolar de NaCl (0.4 M), que conductualmente no produce CAS como el LiCl a la misma concentración, no se observó una variación significativa en la liberación de glutamato. En un estudio previo se empleó una solución isotónica de NaCl (Miranda et al. 2002) y la condición de NaCl 0.4 M no se había explorado antes para evaluar la respuesta glutamatérgica en Cl y amígdala, de manera que con este grupo control pudimos discernir claramente la respuesta provocada por una sustancia que produce náuseas y dolor gástrico de una que no lo hace y que esta respuesta está relacionada con la intensidad del malestar gástrico. Además, parece ser que en ambas estructuras la señal glutamatérgica relacionada con el EI actúa a través de los NMDAr.

Según los resultados de liberación de norepinefrina con el estímulo visceral, la cantidad del neurotransmisor incrementó alrededor al realizar la inyección de LiCl 0.4 M, pero también aumentó prácticamente en la misma medida cuando se le inyectó la solución de NaCl equimolar (0.4 M), lo cual reveló que la señal noradrenérgica en dada por el malestar gástrico no es específica del estímulo incondicionado como en el caso del glutamato y dirige nuestra atención hacia las características que comparte la aplicación de las inyecciones. Una de ellas es la introducción de un volumen de solución hipertónica en la cavidad peritoneal, ya sea

de sodio o de litio, que irrita principalmente el peritoneo parietal que es muy sensible y recubre las paredes del abdomen, y que está inervado por nervios aferentes somáticos y viscerales. La lesión o inflamación local del peritoneo parietal origina un espasmo muscular reflejo (Schwartz 1995) que indica una respuesta nociceptiva caracterizada en el animal por la presencia de contracciones abdominales que consisten en astricción de los músculos laterales asociada a movimientos de los miembros posteriores o estiramiento de todo el cuerpo, (Feng *et al.* 2003). El dolor generado que llega a través del nervio vago envía la información al NTS que proyecta directamente al LC (Hassert *et al.* 2004), que como se mencionó es un importante núcleo noradrenérgico hacia la CI y la amígdala (Pitkanen 2000, Saper 1982). El gran incremento de norepinefrina como respuesta a la inyección de ambos tipos de solución probablemente se debe a que las neuronas del LC están especialmente activas durante estados de ansiedad, incluyendo la exposición a estímulos y ambientes estresantes o dolorosos (Robbins 1995), de manera que es posible que, siendo la CI una corteza visceral que integra este tipo de información, deba recibir una señal noradrenérgica que indique la llegada de un dolor relevante como el provocado al peritoneo parietal.

Existe evidencia que sugiere que en la amígdala, a diferencia de CI, la señal noradrenérgica dada por el estímulo visceral tiene relevancia funcional en la formación de la memoria, ya que el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la ABL inmediatamente antes de la inducción del malestar gástrico, afecta la formación del CAS (Miranda *et al.* 2003).

### ***Papel de la actividad post-adquisición en la consolidación de la memoria.***

Se piensa que los cambios en la plasticidad sináptica inducen los mecanismos de consolidación (Martin *et al.* 2000). Estos cambios plásticos podrían involucrar actividad neuronal “off-line”<sup>1</sup> que permita el mantenimiento de la información hasta que se establezca el trazo de memoria. Algunos ejemplos incluyen olas de síntesis de proteínas asociadas con el aprendizaje previo (Bekinschtein *et al.* 2007, Montag-Sallaz & Montag 2003, Ramirez-Amaya *et al.* 2005), y evidencia electrofisiológica que muestra la reactivación post-adquisición

---

<sup>1</sup> Respuestas neuronales en ausencia de estimulación sensorial.

de los patrones de actividad vistos durante el entrenamiento (Eschenko *et al.* 2008, Gerrard *et al.* 2001, Lansink *et al.* 2008, Pennartz *et al.* 2004, Ribeiro *et al.* 2007). Cuando monitoreamos la liberación de neurotransmisores por alrededor de una hora después de la adquisición, encontramos un incremento de glutamato y dopamina alrededor de 44-48 min tras la asociación de los estímulos en la CI y de glutamato y norepinefrina en la amígdala alrededor de 40 min después de la asociación. Estos incrementos fueron específicos para el grupo que adquirió el CAS, ya que no se observa en ninguno de los grupos control que no desarrollaron aversión al sabor y aparentemente no se relaciona con respuestas tardías por el consumo de sacarina o la inyección de LiCl. Estos resultados van de acuerdo con la noción de que tiempo después de que ha terminado la estimulación sensorial, se presenta una reactivación neuronal en las estructuras que participaron en la adquisición como mecanismo de almacenamiento o estabilización de la memoria (Lansink *et al.* 2008, Moser *et al.* 2005).

#### *Actividad postadquisición en CI: Sinergia D1-NMDA.*

En el presente trabajo encontramos que las señales de liberación post-adquisición en la CI parecen estar involucradas en la consolidación de la memoria del CAS; y que dichas señales actúan a través de los NMDAr, probablemente potenciados por la actividad de los receptores D1 a través de PKA. Existen evidencias que indican que los receptores D1 pueden modificar la fuerza de la transmisión sináptica incrementando la excitabilidad de las neuronas (Cepeda *et al.* 1998, Hallett *et al.* 2006, Jay 2003, Tseng & O'Donnell 2003, Tseng & O'Donnell 2004, Wang & O'Donnell 2001). Los receptores D1 potencian la conductancia de los NMDA a través de la fosforilación de la subunidad NR1 por acción de PKA (Tingley *et al.* 1997). Se ha reportado también que la respuesta neuronal mediada por NMDA es potenciada por un agonista de los D1, el SKF38393, provocando un incremento en el número y frecuencia de los disparos neuronales comparado con la aplicación de NMDA solo (Tseng & O'Donnell 2003). En contraste, la aplicación del agonista de los receptores D2, quinpirol, disminuye la frecuencia de los disparos (Gurden *et al.* 2000, Tseng & O'Donnell 2004). Se ha demostrado que otro mecanismo a través del cual la activación de los receptores D1 potencia la función de los NMDA es promoviendo su inserción en la superficie membranal (Hallett *et al.*

2006) induciendo formas de plasticidad sináptica como la PLP a través de la vía AMPc/PKA/CREB (Jay 2003). De esta forma, la actividad de los receptores D1 en la etapa post-adquisición podría modular la actividad glutamatérgica concomitante a través de su efecto sobre los NMDAr, incrementando la excitabilidad neuronal y en consecuencia proveyendo la plasticidad adecuada para mantener la reactivación neuronal en la CI para la formación de la MLP.

Se ha sugerido que la consolidación depende de la interacción de varias estructuras cerebrales en la estabilización de un trazo de memoria. En el caso del CAS, la interacción funcional de la amígdala y la CI ha favorecido la retención de esta tarea, haciendo su extinción más lenta (Escobar & Bermudez-Rattoni 2000). Nosotros planteamos que entre los mecanismos que intervienen en la consolidación del CAS está la reactivación neuroquímica de estas dos estructuras en etapas post-adquisición. De acuerdo a nuestros resultados la actividad post-adquisición en la amígdala es necesaria para la consolidación del CAS y para la reactivación en la CI dado que la inactivación temporal de la amígdala evitó que incrementara el glutamato y la dopamina en la CI.

#### *¿Cómo se produce la reactivación off-line en amígdala y CI?*

Se sabe que las tareas cuyo aprendizaje tiene contenido emocional, como el CAS, involucran la actividad de la amígdala modulando la fuerza de la memoria y la consolidación de la misma (McGaugh 2004), no solo durante el periodo de adquisición mientras se procesan los estímulos ambientales, sino también a través de oscilaciones post-adquisición que promueven la plasticidad sináptica en estructuras que interactúan con la amígdala, como en este caso, la CI (Pare *et al.* 2002). En el monitoreo post-adquisición de la actividad espontánea de neuronas en la amígdala se observa un incremento gradual después del entrenamiento de un condicionamiento aversivo (tono pareado con choque en las patas) teniendo un máximo entre los 30 y 50 min post-choque (Pelletier *et al.* 2005). Además registros neuronales en animales en libre movimiento han revelado que durante experiencias con contenido emocional o de relevancia particular, la tasa de disparos de las células de la ABL incrementa y se sincronizan a través de una modulación a la frecuencia theta (4-7 Hz) (Pelletier & Pare 2004). Dado que la

actividad theta domina durante la etapa de aprendizaje (Pare & Collins 2000, Seidenbecher *et al.* 2003) la consecuencia principal de las oscilaciones es provocar ventanas temporales recurrentes que faciliten las interacciones sinápticas entre las estructuras en sincronía. De esta forma los disparos neuronales en la frecuencia theta favorecerían la despolarización de estructuras a las cuales envía proyecciones generando la reactivación neuroquímica y promoviendo la plasticidad sináptica.

#### *Actividad post-adquisición en amígdala: Papel de los receptores NMDA y $\beta$ -adrenérgicos.*

De acuerdo con nuestros resultados, la reactivación de la amígdala involucra a los sistemas noradrenérgico y glutamatérgico que participan en el proceso de consolidación. Por una parte, existen reportes de una mejoría en el desempeño de la prevención pasiva producida por la administración post-adquisición de agonistas o agonistas parciales de los NMDAr en esta estructura (Jafari-Sabet 2006), mientras que el bloqueo de los NMDAr causa un déficit en la retención de esta tarea (Liang *et al.* 1994). La actividad de los NMDAr induce la expresión de IEGs y síntesis de proteínas *de novo* (Rao & Finkbeiner 2007, Bradley *et al.* 2006), lo cual influye en la plasticidad sináptica y la MLP. Una vez que el receptor es activado por la coincidencia de la liberación presináptica y la despolarización post-sináptica que elimina el bloqueo del canal por  $Mg^{2+}$ , hay una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  que activa a la proteína  $Ca^{2+}$ /calmodulina, la cual incrementa el AMPc activando la vía AMPC/PKA/CREB (Eliot *et al.* 1989), además activa a la proteína cinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII), la cual fosforila y activa varios factores de transcripción dependientes de actividad, incluyendo CREB (Greer & Greenberg 2008).

CREB junto con su coactivador proteína de unión a CREB (CBP) regulan la expresión de una variedad de genes relacionados con la plasticidad que poseen elementos de respuesta CRE en su región promotora (Hagiwara *et al.* 1996); entre estos genes se encuentran IEGs, que actúan como factores de transcripción regulando la expresión de genes efectores. Finalmente, los productos de dichos genes efectores componen los elementos estructurales necesarios para el



crecimiento y/o estabilización de las sinapsis que sustentan la formación de la memoria (Bailey *et al.* 1996, Benito & Barco 2010).

Los efectos de la NE en la amígdala se han descrito ampliamente; infusiones post-adquisición de NE o clenbuterol (agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos) mejoran la consolidación de la prevención pasiva y condicionamiento al miedo dependiente de contexto (Ferry & McGaugh 1999, Introini-Collison *et al.* 1996, Introini-Collison *et al.* 1991, Izquierdo *et al.* 1992, LaLumiere *et al.* 2003, LaLumiere & McGaugh 2005), así como la consolidación de un aprendizaje espacial (laberinto acuático de Morris) (Hatfield & McGaugh 1999) y la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos (Roosendaal *et al.* 2008). En contraste, las infusiones post-adquisición de propranolol afectan la memoria a largo plazo de una variedad de tareas (Liang *et al.* 1986, Roosendaal *et al.* 2008). Se ha propuesto que los efectos de la NE sobre la consolidación de la memoria involucran la estimulación de la vía AMPc/PKA/CREB (Ferry *et al.* 1999), ya que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos incrementan AMPc, activando PKA. Como hemos visto, esta vía está relacionada con el proceso de consolidación a través de la fosforilación de algunas proteínas blanco (Bernabeu *et al.* 1997a, Quevedo *et al.* 2004, Schafe *et al.* 1999, Shobe 2002, Wang *et al.* 2006) entre estas proteínas se encuentra CREB, que está involucrado en la expresión de genes y síntesis de proteínas (Bozon *et al.* 2003, Josselyn *et al.* 2004, Silva *et al.* 1998).

Toda esta información sugiere que durante el periodo post-adquisición los NMDAr y  $\beta$ -adrenérgicos actúan en paralelo para la formación de la MLP. Sin embargo, también se ha reportado que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos facilitan la transmisión sináptica excitatoria en células piramidales de la amígdala, de tal forma que podría darse una actividad sinérgica. Por ejemplo, la administración de un agonista  $\beta$ -adrenérgico, como el isoproterenol, incrementa las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) mediadas por NMDA; este incremento fue bloqueado con la aplicación de Rp-CAMPS, que inhibe PKA (Gean *et al.* 1992, Huang & Gean 1995, Huang *et al.* 1998, Huang *et al.* 1993). De esta forma, las señales noradrenérgica y glutamatérgicas concomitantes en la amígdala estarían actuando a través de los receptores NMDA y  $\beta$ -adrenérgicos promoviendo, por vías

separadas o sinérgicas, el flujo de eventos bioquímicos que están involucrados en el proceso de consolidación.

Interesantemente, la doble inyección de NMDA emulando la actividad glutamatérgica de EI y la reactivación de glutamato off-line, fueron suficientes para inducir una aversión significativa en ausencia de malestar gástrico. Respecto a esto, se ha reportado que el glutamato /NMDA produce señales aversivas, por ejemplo, se ha demostrado que la administración de glutamato en la ABL produce una señal de aversión al sabor cuando se administra junto con una concentración baja de LiCl (0.075M) provocando un CAS débil (Miranda et al. 2002), y la inyección de ácido homocistéico (agonista NMDA) en la corteza cingulada anterior durante el condicionamiento al miedo, genera una conducta de evitación en ausencia de estímulos nocivos (Johansen & Fields 2004). Esto indica que la actividad NMDA participa en parte de la integración de las señales que forman el trazo de memoria de aversión por medio de cambios en la plasticidad sináptica.

Tal plasticidad puede necesitar de la reactivación de vías de señalización particulares que sustenten los niveles de proteína requeridos para la persistencia de la memoria (Wang et al. 2006). Esto se ve apoyado por experimentos que muestran que la ausencia temporal de NMDAr corticales después de la adquisición del condicionamiento al miedo y del CAS provoca deficiencia en la consolidación de la memoria (Cui et al. 2005, Shimizu et al. 2000). El mismo grupo de estudio empleó un knock out región específico inducible para evaluar el papel de la proteína-quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina II (CaMKII) en las etapas post-adquisición; sus resultados revelan que durante la primera semana posterior al aprendizaje, la reactivación de CaMKII es esencial para la consolidación de la memoria (Wang et al. 2003). También se ha observado que el entrenamiento de animales en prevención pasiva induce la expresión de BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) en el hipocampo 12 horas después del entrenamiento (Bekinschtein et al. 2007) y que el aprendizaje gustativo induce dos olas de actividad de mTor en la corteza gustativa a los 15 y 180 min después de la presentación del sabor (Belelovsky et al. 2009). Estos datos indican que entre los mecanismos “off-line” involucrados en la persistencia del trazo de memoria se

encuentra la reactivación de eventos moleculares como la síntesis de varias proteínas implicadas en la plasticidad sináptica.

Una gran cantidad de evidencia indica que estos procesos podrían llevarse a cabo durante el sueño, que ha sido identificado como un estado que optimiza la consolidación de memorias declarativas y no declarativas (Ellenbogen *et al.* 2006, Robertson *et al.* 2004, Smith 2001). Particularmente, la etapa de sueño de ondas lentas (SWS) ha sido implicada en la consolidación dependiente de sueño (Stickgold 2005, Walker & Stickgold 2006). Existen reportes de un incremento significativo de la liberación de NE en la región prelímbica de la corteza prefrontal de la rata alrededor de 2 horas después de la adquisición de una tarea de discriminación de olor que ha sido relacionado con un incremento en la actividad del LC durante el SWS (Eschenko & Sara 2008). Sin embargo, la información no tendría necesariamente que esperar a las etapas de sueño para llevar a cabo los procesos que la mantengan y consoliden; de esta manera, la actividad off-line sería una forma de fortalecer el trazo de memoria cuyo establecimiento a largo plazo se ve favorecido por los procesos de consolidación relacionados al sueño.

### *¿Puede un sabor volverse aversivo en ausencia de malestar gástrico?*

Durante la adquisición de los condicionamientos de aversión, el trazo del EC se integra con las señales generadas por un estímulo nocivo (EI). Existen algunos trabajos que indican que en ausencia de dicho estímulo nocivo, se puede obtener una respuesta de aversión mediante la activación de los receptores  $\beta$ ; Deyama y colaboradores reportaron que la administración de isoproterenol en el núcleo cama de la stria terminalis durante la exploración de un área que antes era preferida por el animal, generó aversión a ese lugar (Deyama *et al.* 2008). Además por medio de imagen de resonancia magnética funcional (fMRI) se escaneó la respuesta amigdalal de voluntarios sanos durante el paradigma de reconocimiento de emociones faciales en un grupo al cual se le administró placebo y otro que recibió un inhibidor selectivo de la recaptura de NE (reboxetina). Los resultados muestran que la reboxetina inducía un incremento en la respuesta amigdalal relacionada al miedo, que no se observó en el grupo placebo. También se ha

reportado que la activación de los NMDAr en la corteza cingulada anterior cuando un animal está en un contexto específico, genera aversión al lugar en una magnitud ligeramente menor a la aversión producida por una inyección de formalina en la pata para provocar dolor, empleada para realizar este condicionamiento (Johansen & Fields 2004). En el caso particular del CAS, se ha logrado facilitar la aversión al sabor mediante la administración intra-amigdalara de glutamato junto con la inyección i.p. de LiCl en una dosis baja que no genera CAS por sí mismo (Tucci et al. 1998).

Nuestros resultados indican que es posible generar aversión al sabor en ausencia de LiCl, ya que la actividad de los NMDAr no solo es necesaria en el momento de la llegada del EI, sino también en la etapa postadquisición, de manera que al activar estos receptores en dos etapas críticas donde son necesarias las señales noradrenérgicas y glutamatérgicas, es posible conseguir un efecto aversivo en animales que no experimentaron malestar gástrico.

## X. CONCLUSIONES

La formación de la memoria de experiencias aversivas involucra mecanismos que permiten su persistencia y su almacenamiento de forma eficiente para contribuir a la supervivencia de los organismos. Los resultados presentados en esta tesis nos permiten aportar elementos para integrar un modelo que describa dichos mecanismos.

Este modelo incluye la descripción de cambios en la neurotransmisión de dos estructuras importantes para la formación del CAS, la corteza insular y la amígdala. La liberación de dopamina en la CI por la exposición a un estímulo gustativo nuevo actúa a través de los receptores D1 activando la vía AMPc/PKA que participa en la consolidación de la memoria, mientras que amplia evidencia indica que el sistema colinérgico subyace la MCP a través de los receptores muscarínicos (Bermudez-Rattoni 2004, Tseng & O'Donnell 2003). Parte de la contribución de la actividad de PKA en la consolidación del CAS involucra la fosforilación de la subunidad NR1, lo cual se ha reportado que incrementa la conductancia de los NMDAr (Tseng & O'Donnell 2003) potenciando el desencadenamiento de señales intracelulares que favorecen cambios plásticos en la neurona.

Una vez que la relevancia del estímulo gustativo nuevo y potencialmente nocivo genera la señal dopaminérgica y se integra con la posterior señal glutamatérgica generada por el malestar gástrico, proponemos que, para la estabilización a largo plazo de esta información, es necesaria la reactivación de la CI a través de incrementos extracelulares concomitantes de dopamina y glutamato que de nuevo desencadenan en esta estructura mecanismos moleculares que subyacen la permanencia del trazo hasta que éste se estabiliza o almacena.

La reactivación cortical es dependiente de la actividad de la amígdala, que a su vez muestra actividad glutamatérgicas y noradrenérgicas en la misma temporalidad que la CI, sugiriendo así que en esta estructura se están llevando a cabo mecanismos similares que promuevan los cambios plásticos en la neurona mediante los receptores NMDA y los  $\beta$ -adrenérgicos. Podemos suponer que dicha reactivación se produce cíclicamente como se ha reportado que sucede con otras

reactivaciones moleculares asociadas al aprendizaje previo (Bekinschtein *et al.* 2008, Ramirez-Amaya *et al.* 2005, Rasch & Born 2007), y que con cada ronda de activación, el trazo de memoria se fortalece, lo cual favorece su persistencia en el tiempo, sin embargo se necesitarán más estudios para comprobar esto.

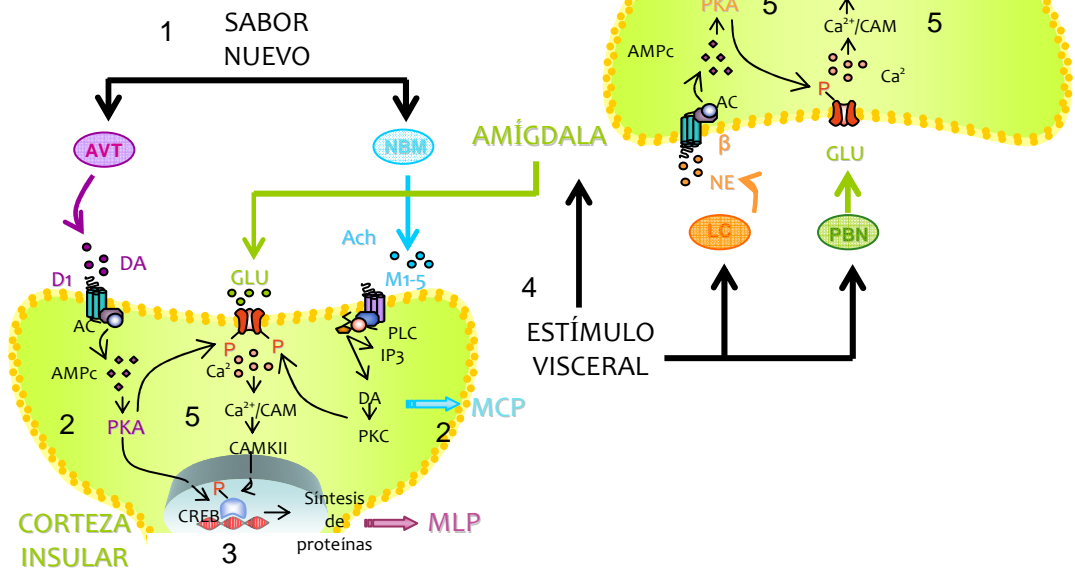
Por último, mostramos la relevancia funcional de las señales noradrenérgicas y glutamatérgicas para la consolidación del CAS, ya que logramos generar una significativa aversión a un sabor nuevo en ausencia de malestar gástrico mediante la estimulación exógena de los receptores NMDA y  $\beta$ -adrenérgicos en sustitución de los incrementos extracelulares que reveló el monitoreo de microdiálisis.

Estos datos nos acercan a una descripción cada vez más precisa de los eventos moleculares que subyacen la formación de una memoria tan persistente y relevante como la aversión al sabor, abriendo así el panorama a la inclusión de mecanismos que han sido escasamente considerados, como la reactivación neuroquímica, en el panorama de procesos que incluye la consolidación de la memoria.

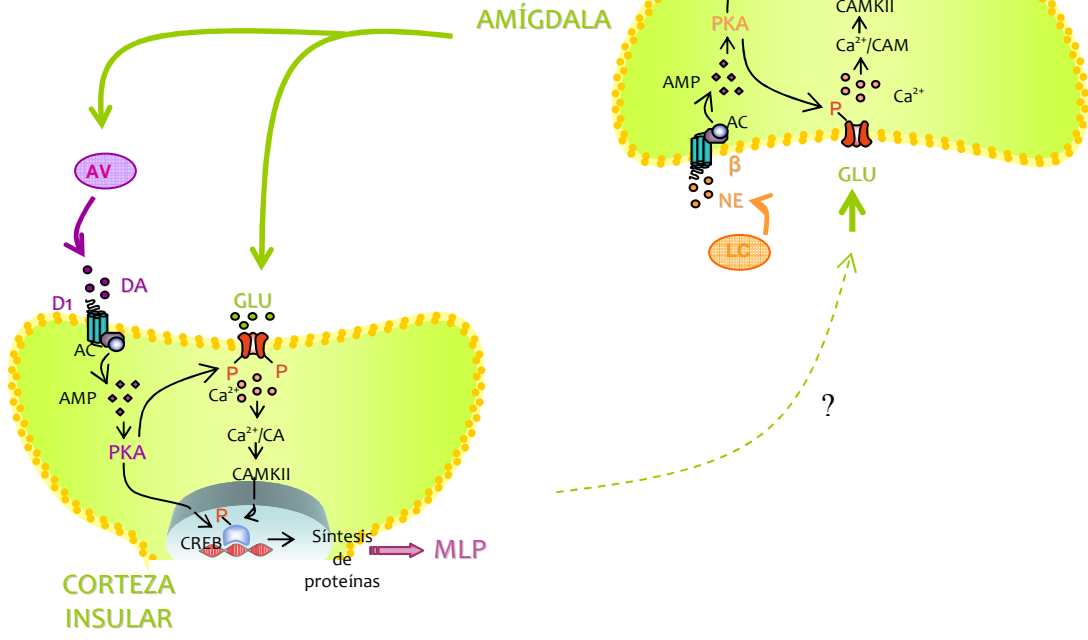
**Fig. 20** *Página siguiente. Integración de los eventos moleculares en la CI y amígdala durante la adquisición y la reactivación de la memoria del CAS.* (1) La exposición a un sabor nuevo incrementa la liberación de dopamina (DA) y acetilcolina en la CI. (2) La acetilcolina actúa a través de los receptores muscarínicos, activando la proteína cinasa C (PKC) induciendo la fosforilación del receptor NMDA, contribuyendo a la integración de la memoria a corto plazo. La DA activa los receptores D1, activando a su vez PKA cuyas proteínas blanco incluyen el receptor NMDA y CREB. (3) La fosforilación de CREB regula la expresión de una variedad de genes relacionados con la plasticidad sináptica que contribuye a la formación de la memoria a largo plazo, por lo que la activación de la vía AMPc/PKA/CREB por la activación de los receptores D1 participa en la consolidación del CAS. (4) El estímulo visceral induce la liberación de glutamato en la CI, actuando a través de los receptores NMDA, cuya fosforilación por PKA y PKC incrementa la conductancia del canal, mejorando la respuesta postsináptica (5), la cual incluye la activación de CaMKII, favoreciendo a su vez la fosforilación de CREB. En la amígdala, el estímulo visceral induce la liberación de glutamato, activando los receptores NMDA y la liberación de norepinefrina (NE), activando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo cual también activa la vía AMPc/PKA/CREB, favoreciendo la consolidación del CAS.

En el caso de la reactivación off-line, la amígdala es activada post-adquisición mediante señales de NE y glutamato que activan los receptores NMDA y  $\beta$ -adrenérgicos, favoreciendo la síntesis de proteínas. Esta estructura participa en la reactivación de la CI, donde las señales de DA y glutamato se integran a través de la interacción de los receptores D1 y NMDA por medio de PKA. Es posible que esta actividad sea recurrente y se retroalimente de proyecciones recíprocas entre la amígdala y la CI con el fin de estabilizar el trazo de memoria a largo plazo.

# ADQUISICIÓN



# REACTIVACIÓN



## XI. REFERENCIAS

- Aggleton, J. P., Petrides, M. and Iversen, S. D. (1981) Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversion learning by rats. *Physiology & behavior*, **27**, 397-400.
- Akirav, I. (2007) NMDA Partial agonist reverses blocking of extinction of aversive memory by GABA(A) agonist in the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 542-550.
- Alves, F. H., Crestani, C. C. and Correa, F. M. (2010) The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Brain research*, **1333**, 57-63.
- Amaral DG, P. J., Pitkanen A, Carmichael ST (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental disfunction*, (J. Aggleton ed.), pp. 1-66. Wiley-Liss, Inc., New York, EUA.
- Asermely, K. E., Broomfield, C. A., Nowakowski, J., Courtney, B. C. and Adler, M. (1997) Identification of a recombinant synaptobrevin-thioredoxin fusion protein by capillary zone electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **695**, 67-75.
- Baddeley, A. (1999) *Human memory, theory and practice*. Psychology Press, East Sussex, UK
- Bailey, C. H., Bartsch, D. and Kandel, E. R. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 13445-13452.
- Baldwin, A. E., Sadeghian, K. and Kelley, A. E. (2002) Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, **22**, 1063-1071.
- Barker, L. M. and Smith, J. C. (1974) A comparison of taste aversions induced by radiation and lithium chloride in CS-US and US-CS paradigms. *Journal of comparative and physiological psychology*, **87**, 644-654.
- Bassareo, V. and Di Chiara, G. (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci*, **17**, 851-861.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I. and Medina, J. H. (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, **53**, 261-277.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katze, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I. and Medina, J. H. (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2711-2716.
- Belelovsky, K., Kaphzan, H., Elkobi, A. and Rosenblum, K. (2009) Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J Neurosci*, **29**, 7424-7431.
- Beninger, R. J., Hoffman, D. C. and Mazurski, E. J. (1989) Receptor subtype-specific dopaminergic agents and conditioned behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, **13**, 113-122.



- Benito, E. and Barco, A. (2010) CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in neurosciences*, **33**, 230-240.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature reviews*, **5**, 209-217.
- Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B. and McGaugh, J. L. (1991) Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 5379-5382.
- Bermudez-Rattoni, F. and McGaugh, J. L. (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain research*, **549**, 165-170.
- Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B. and McGaugh, J. L. (2005) Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y)*, **12**, 447-449.
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I. and Medina, J. H. (1997a) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 7041-7046.
- Bernabeu, R., Cammarota, M., Izquierdo, I. and Medina, J. H. (1997b) Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]*, **30**, 961-965.
- Bernstein, I. L. and Koh, M. T. (2007) Molecular signaling during taste aversion learning. *Chemical senses*, **32**, 99-103.
- Borsini, F. and 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 & behavior*, **33**, 37-43.
- Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S. A., Silva, A. J., Davis, S. and Laroche, S. (2003) MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **358**, 805-814.
- Bradley, J., Carter, S. R., Rao, V. R., Wang, J. and Finkbeiner, S. (2006) Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. *J Neurosci*, **26**, 1065-1076.
- Braun, J. J., Slick, T. B. and Lorden, J. F. (1972) Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions. *Physiology & behavior*, **9**, 637-641.
- Bures J, B.-R. F., Yamamoto T (1998) Conditioned Taste Aversion, memory of special kind. pp. 41-43. Oxford University Press.
- Cahill, L., Prins, B., Weber, M. and McGaugh, J. L. (1994) Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature*, **371**, 702-704.
- Carlezon, W. A., Jr., Duman, R. S. and Nestler, E. J. (2005) The many faces of CREB. *Trends in neurosciences*, **28**, 436-445.
- Casadio, A., Martin, K. C., Giustetto, M., Zhu, H., Chen, M., Bartsch, D., Bailey, C. H. and Kandel, E. R. (1999) A transient, neuron-wide form of CREB-mediated

- long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*, **99**, 221-237.
- Cepeda, C., Colwell, C. S., Itri, J. N., Chandler, S. H. and Levine, M. S. (1998) Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol*, **79**, 82-94.
- Cole, B. J., Robbins, T. W. and Everitt, B. J. (1988) Lesions of the dorsal noradrenergic bundle simultaneously enhance and reduce responsivity to novelty in a food preference test. *Brain research*, **472**, 325-349.
- Conrad, C. D. (2008) Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Reviews in the neurosciences*, **19**, 395-411.
- Cubero, I., Thiele, T. E. and Bernstein, I. L. (1999) Insular cortex lesions and taste aversion learning: effects of conditioning method and timing of lesion. *Brain research*, **839**, 323-330.
- 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. *Eur J Neurosci*, **22**, 755-763.
- Chance, P. (1999) Learning and behavior. Brooks/Cole Publishing Company, EUA.
- Chebib, M. and Johnston, G. A. (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **26**, 937-940.
- Chen, Z., Wu, J., Baker, G. B., Parent, M. and Dovichi, N. J. (2001) Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. *J Chromatogr A*, **914**, 293-298.
- Davis, M. (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual review of neuroscience*, **15**, 353-375.
- de la Mora, M. P., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-Garcia, Y., Marcellino, D. and Fuxe, K. (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology*, **90**, 198-216.
- De Leonibus, E., Verheij, M. M., Mele, A. and Cools, A. (2006) Distinct kinds of novelty processing differentially increase extracellular dopamine in different brain regions. *The European journal of neuroscience*, **23**, 1332-1340.
- Delamater, A. and Treit, D. (1988) Chlordiazepoxide attenuates shock-based and enhances LiCl-based fluid aversions. *Learning and motivation*, **19**, 221-238.
- Dere, E., Pause, B. M. and Pietrowsky, R. (2010) Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research*.
- Deyama, S., Katayama, T., Ohno, A., Nakagawa, T., Kaneko, S., Yamaguchi, T., Yoshioka, M. and Minami, M. (2008) Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci*, **28**, 7728-7736.
- Dudai, Y. (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of psychology*, **55**, 51-86.
- Dudman, J. T., Eaton, M. E., Rajadhyaksha, A., Macias, W., Taher, M., Barczak, A., Kameyama, K., Haganir, R. and Konradi, C. (2003) Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. *Journal of neurochemistry*, **87**, 922-934.

- Eliot, L. S., Dudai, Y., Kandel, E. R. and Abrams, T. W. (1989) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 9564-9568.
- Ellenbogen, J. M., Payne, J. D. and Stickgold, R. (2006) The role of sleep in declarative memory consolidation: passive, permissive, active or none? *Curr Opin Neurobiol*, **16**, 716-722.
- Escobar, M. L., Alcocer, I. and Bermudez-Rattoni, F. (2002) In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioural brain research*, **129**, 101-106.
- Escobar, M. L. and Bermudez-Rattoni, F. (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain research*, **852**, 208-212.
- Escobar, M. L., Chao, V. and Bermudez-Rattoni, F. (1998) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain research*, **779**, 314-319.
- Eschenko, O., Ramadan, W., Molle, M., Born, J. and Sara, S. J. (2008) Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn Mem*, **15**, 222-228.
- Eschenko, O. and Sara, S. J. (2008) Learning-dependent, transient increase of activity in noradrenergic neurons of locus coeruleus during slow wave sleep in the rat: brain stem-cortex interplay for memory consolidation? *Cereb Cortex*, **18**, 2596-2603.
- Everitt, B. J., Cardinal, R. N., Parkinson, J. A. and Robbins, T. W. (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **985**, 233-250.
- Fallon, J. H. C., P. (1992) Distribution of monoamines within the amygdala. In: *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Disfunction*, (J. Aggleton ed.), pp. 97-114. Wiley-Liss, Inc., New York, EUA.
- Feenstra, M. G., Botterblom, M. H. and Mastenbroek, S. (2000) Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience*, **100**, 741-748.
- Feenstra, M. G., Teske, G., Botterblom, M. H. and De Bruin, J. P. (1999) Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex of rats during classical aversive and appetitive conditioning to a contextual stimulus: interference by novelty effects. *Neuroscience letters*, **272**, 179-182.
- Feng, Y., Cui, M. and Willis, W. D. (2003) Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology*, **98**, 729-733.
- Fernandez-Ruiz, J., Miranda, M. I., Bermudez-Rattoni, F. and Drucker-Colin, R. (1993) Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behavioral and neural biology*, **60**, 189-191.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V. and Bermudez-Rattoni, F. (2002) Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *The European journal of neuroscience*, **16**, 1139-1145.
- Ferreira, G., Miranda, M. I., De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C. J. and Bermudez-Rattoni, F. (2005) Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste

- aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *The European journal of neuroscience*, **22**, 2596-2604.
- Ferry, B. and McGaugh, J. L. (1999) Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of learning and memory*, **72**, 8-12.
- Ferry, B., Roozendaal, B. and McGaugh, J. L. (1999) Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J Neurosci*, **19**, 5119-5123.
- Fontanini, A., Grossman, S. E., Figueroa, J. A. and Katz, D. B. (2009) Distinct subtypes of basolateral amygdala taste neurons reflect palatability and reward. *J Neurosci*, **29**, 2486-2495.
- Frey, U. and Morris, R. G. (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, **385**, 533-536.
- Gallagher, M., Kapp, B. S., Musty, R. E. and Driscoll, P. A. (1977) Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. *Science (New York, N.Y)*, **198**, 423-425.
- Gallo, M., Roldan, G. and Bures, J. (1992) Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural brain research*, **52**, 91-97.
- García, J. K., D.J.; Koelling, R.A. (1955) Conditioned taste aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science (New York, N.Y)*, **122**, 157-158.
- Gean, P. W., Huang, C. C., Lin, J. H. and Tsai, J. J. (1992) Sustained enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol in rat amygdalar slices. *Brain research*, **594**, 331-334.
- Gerrard, J. L., Kudrimoti, H., McNaughton, B. L. and Barnes, C. A. (2001) Reactivation of hippocampal ensemble activity patterns in the aging rat. *Behav Neurosci*, **115**, 1180-1192.
- Giovannini, M. G., Rakovska, A., Benton, R. S., Pazzagli, M., Bianchi, L. and Pepeu, G. (2001) Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*, **106**, 43-53.
- Greer, P. L. and Greenberg, M. E. (2008) From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, **59**, 846-860.
- Guarraci, F. A., Frohardt, R. J., Falls, W. A. and Kapp, B. S. (2000) The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, **114**, 647-651.
- Guarraci, F. A., Frohardt, R. J. and Kapp, B. S. (1999) Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain research*, **827**, 28-40.
- Gurden, H., Takita, M. and Jay, T. M. (2000) Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *J Neurosci*, **20**, RC106.
- Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., Ramirez-Amaya, V. and Bermudez-Rattoni, F. (1999) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, **89**, 751-758.

- Hagiwara, M., Shimomura, A., Yoshida, K. and Imaki, J. (1996) Gene expression and CREB phosphorylation induced by cAMP and Ca<sup>2+</sup> in neuronal cells. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*, **36**, 277-285.
- Hallett, P. J., Spoelgen, R., Hyman, B. T., Standaert, D. G. and Dunah, A. W. (2006) Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J Neurosci*, **26**, 4690-4700.
- Hanamori, T., Kunitake, T., Kato, K. and Kannan, H. (1998) Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *Journal of neurophysiology*, **79**, 2535-2545.
- Hassert, D. L., Miyashita, T. and Williams, C. L. (2004) The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav Neurosci*, **118**, 79-88.
- Hatfield, T. and McGaugh, J. L. (1999) Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiology of learning and memory*, **71**, 232-239.
- Hoffman, K. L. and McNaughton, B. L. (2002) Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. *Science*, **297**, 2070-2073.
- Huang, C. C. and Gean, P. W. (1995) Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate potentiates the synaptic potential mediated by NMDA receptors in the amygdala. *Journal of neuroscience research*, **40**, 747-754.
- Huang, C. C., Lin, C. H. and Gean, P. W. (1998) Potentiation of N-methyl-D-aspartate currents by isoproterenol in the acutely dissociated rat amygdalar neurons. *Neuroscience letters*, **253**, 9-12.
- Huang, C. C., Tsai, J. J. and Gean, P. W. (1993) Enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol is blocked by Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate. *Neuroscience letters*, **161**, 207-210.
- Inglis, F. M. and Moghaddam, B. (1999) Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of neurochemistry*, **72**, 1088-1094.
- Introini-Collison, I. B., Dalmaz, C. and McGaugh, J. L. (1996) Amygdala beta-noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiology of learning and memory*, **65**, 57-64.
- Introini-Collison, I. B., Miyazaki, B. and McGaugh, J. L. (1991) Involvement of the amygdala in the memory-enhancing effects of clenbuterol. *Psychopharmacology*, **104**, 541-544.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A. and Medina, J. H. (1998a) Mechanisms for memory types differ. *Nature*, **393**, 635-636.
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B. and Medina, J. H. (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and neural biology*, **58**, 16-26.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., de Souza, M. M. and Mello e Souza, T. (1998b) Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem*, **69**, 219-224.
- Jacobson, L. H., Kelly, P. H., Bettler, B., Kaupmann, K. and Cryan, J. F. (2006) GABA(B(1)) receptor isoforms differentially mediate the acquisition and extinction of aversive taste memories. *J Neurosci*, **26**, 8800-8803.
- Jafari-Sabet, M. (2006) NMDA receptor antagonists antagonize the facilitatory effects of post-training intra-basolateral amygdala NMDA and physostigmine on passive avoidance learning. *European journal of pharmacology*, **529**, 122-128.

- Jasmin, L., Burkey, A. R., Granato, A. and Ohara, P. T. (2004) Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **468**, 425-440.
- Jay, T. M. (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in neurobiology*, **69**, 375-390.
- Johansen, J. P. and Fields, H. L. (2004) Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nature neuroscience*, **7**, 398-403.
- Jolkkonen, E. and Pitkanen, A. (1998) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus. *The Journal of comparative neurology*, **395**, 53-72.
- Jones, M. W., French, P. J., Bliss, T. V. and Rosenblum, K. (1999) Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci*, **19**, RC36.
- Josselyn, S. A., Kida, S. and Silva, A. J. (2004) Inducible repression of CREB function disrupts amygdala-dependent memory. *Neurobiology of learning and memory*, **82**, 159-163.
- Kashdan, T. B., Breen, W. E., Afram, A. and Terhar, D. (2010) Experiential avoidance in idiographic, autobiographical memories: construct validity and links to social anxiety, depressive, and anger symptoms. *Journal of anxiety disorders*, **24**, 528-534.
- Katz, D. B., Simon, S. A. and Nicolelis, M. A. (2001) Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J Neurosci*, **21**, 4478-4489.
- Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M. J. and Barrot, M. (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol*, **513**, 597-621.
- Klempir, J., Klempirova, O., Stochl, J., Spackova, N. and Roth, J. (2009) The relationship between impairment of voluntary movements and cognitive impairment in Huntington's disease. *Journal of neurology*, **256**, 1629-1633.
- Koh, M. T., Wilkins, E. E. and Bernstein, I. L. (2003) Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behavioral neuroscience*, **117**, 1416-1422.
- Kosar, E., Grill, H. J. and Norgren, R. (1986) Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain research*, **379**, 329-341.
- Krushel, L. A. and van der Kooy, D. (1988) Visceral cortex: integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. *The Journal of comparative neurology*, **270**, 39-54, 62-33.
- LaLumiere, R. T., Buen, T. V. and McGaugh, J. L. (2003) Post-training intrabasolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J Neurosci*, **23**, 6754-6758.
- LaLumiere, R. T. and McGaugh, J. L. (2005) Memory enhancement induced by post-training intrabasolateral amygdala infusions of beta-adrenergic or muscarinic agonists requires activation of dopamine receptors: Involvement of right, but not left, basolateral amygdala. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, **12**, 527-532.
- Landers, J. (1997) *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC press, USA.
- Lansink, C. S., Goltstein, P. M., Lankelma, J. V., Joosten, R. N., McNaughton, B. L. and Pennartz, C. M. (2008) Preferential reactivation of motivationally relevant information in the ventral striatum. *J Neurosci*, **28**, 6372-6382.

- Lechner, H. A., Squire, L. R. and Byrne, J. H. (1999) 100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y)*, **6**, 77-87.
- Leverenz, J. B., Quinn, J. F., Zabetian, C., Zhang, J., Montine, K. S. and Montine, T. J. (2009) Cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson disease. *Current topics in medicinal chemistry*, **9**, 903-912.
- Liang, K. C., Hon, W. and Davis, M. (1994) Pre- and posttraining infusion of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists into the amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task. *Behavioral neuroscience*, **108**, 241-253.
- Liang, K. C., Juler, R. G. and McGaugh, J. L. (1986) Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain research*, **368**, 125-133.
- Liu, J., Cobb, K. A. and Novotny, M. (1990) Capillary electrophoretic separations of peptides using micelle-forming compounds and cyclodextrins as additives. *Journal of chromatography*, **519**, 189-197.
- Liu, J. P., Shiota, O. and Novotny, M. (1991) Capillary electrophoresis of amino sugars with laser-induced fluorescence detection. *Analytical chemistry*, **63**, 413-417.
- Ljungberg, T., Apicella, P. and Schultz, W. (1992) Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol*, **67**, 145-163.
- Makkar, S. R., Zhang, S. Q. and Cranney, J. (2010) Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 1625-1652.
- Martin, K. C., Barad, M. and Kandel, E. R. (2000) Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Current opinion in neurobiology*, **10**, 587-592.
- McDonald, A. J. and Betette, R. L. (2001) Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D(28k). *Neuroscience*, **102**, 413-425.
- McGaugh, J. L. (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual review of neuroscience*, **27**, 1-28.
- McGaugh, J. L. and Alpern, H. P. (1966) Effects of Electroshock on Memory: Amnesia without Convulsions. *Science (New York, N.Y)*, **152**, 665-666.
- McGaugh, J. L., McIntyre, C. K. and Power, A. E. (2002) Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiology of learning and memory*, **78**, 539-552.
- McQuade, R., Creton, D. and Stanford, S. C. (1999) Effect of novel environmental stimuli on rat behaviour and central noradrenaline function measured by in vivo microdialysis. *Psychopharmacology (Berl)*, **145**, 393-400.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L. and Bermudez-Rattoni, F. (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 11417-11422.
- Miranda, M. I., LaLumiere, R. T., Buen, T. V., Bermudez-Rattoni, F. and McGaugh, J. L. (2003) Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *The European journal of neuroscience*, **18**, 2605-2610.
- Miranda, M. I. and McGaugh, J. L. (2004) Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y)*, **11**, 312-317.
- Miranda, M. I., Ramirez-Lugo, L. and Bermudez-Rattoni, F. (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain research*, **882**, 230-235.

- Miranda, M. I., Rodriguez-Garcia, G., Reyes-Lopez, J. V., Ferry, B. and Ferreira, G. (2008) Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiology of learning and memory*, **90**, 54-61.
- Moga, M. M., Weis, R. P. and Moore, R. Y. (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **359**, 221-238.
- Montag-Sallaz, M. and Montag, D. (2003) Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learn Mem*, **10**, 99-107.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A., Ma, S. and Petre, C. O. (2005) Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **29**, 1214-1224.
- Morris, R., Frey, S., Kasambira, T. and Petrides, M. (1999) Ibotenic acid lesions of the basolateral, but not the central, amygdala interfere with conditioned taste aversion: evidence from a combined behavioral and anatomical tract-tracing investigation. *Behavioral neuroscience*, **113**, 291-302.
- Moser, E. I., Moser, M. B., Lipa, P., Newton, M., Houston, F. P., Barnes, C. A. and McNaughton, B. L. (2005) A test of the reverberatory activity hypothesis for hippocampal 'place' cells. *Neuroscience*, **130**, 519-526.
- Murchison, C. F., Zhang, X. Y., Zhang, W. P., Ouyang, M., Lee, A. and Thomas, S. A. (2004) A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*, **117**, 131-143.
- Naor, C. and Dudai, Y. (1996) Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural brain research*, **79**, 61-67.
- Nelson, P. T., Braak, H. and Markesbery, W. R. (2009) Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **68**, 1-14.
- Nerad, L., Ramirez-Amaya, V., Ormsby, C. E. and Bermudez-Rattoni, F. (1996) Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiology of learning and memory*, **66**, 44-50.
- Nishijo, H., Ono, T., Uwano, T., Kondoh, T. and Torii, K. (2000) Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various tastant solutions during ingestive behavior in rats. *The Journal of nutrition*, **130**, 954S-959S.
- Nishijo, H., Uwano, T., Tamura, R. and Ono, T. (1998) Gustatory and multimodal neuronal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. *Journal of neurophysiology*, **79**, 21-36.
- Ogawa, H., Hasegawa, K. and Murayama, N. (1992) Difference in taste quality coding between two cortical taste areas, granular and dysgranular insular areas, in rats. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung*, **91**, 415-424.
- Ogawa, H., Hasegawa, K. and Nakamura, T. (2000) Action of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P on neurons in the insular cortex and the modulation of taste responses in the rat. *Chemical senses*, **25**, 351-359.
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B. R., Tillet, Y. and Jasmin, L. (2003) Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of neurocytology*, **32**, 131-141.
- Orlowska-Majdak, M. (2004) Microdialysis of the brain structures: application in behavioral research on vasopressin and oxytocin. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **64**, 177-188.



- Pape, H. C. and Pare, D. (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological reviews*, **90**, 419-463.
- Pare, D. and Collins, D. R. (2000) Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J Neurosci*, **20**, 2701-2710.
- Pare, D., Collins, D. R. and Pelletier, J. G. (2002) Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories. *Trends Cogn Sci*, **6**, 306-314.
- Pavlidis, C. and Winson, J. (1989) Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes. *J Neurosci*, **9**, 2907-2918.
- Paxinos, G., Watson, C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Peigneux, P., Orban, P., Balteau, E., Degueldre, C., Luxen, A., Laureys, S. and Maquet, P. (2006) Offline persistence of memory-related cerebral activity during active wakefulness. *PLoS Biol*, **4**, e100.
- Pelletier, J. G., Likhtik, E., Filali, M. and Pare, D. (2005) Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y)*, **12**, 96-102.
- Pelletier, J. G. and Pare, D. (2004) Role of amygdala oscillations in the consolidation of emotional memories. *Biological psychiatry*, **55**, 559-562.
- Pennartz, C. M., Lee, E., Verheul, J., Lipa, P., Barnes, C. A. and McNaughton, B. L. (2004) The ventral striatum in off-line processing: ensemble reactivation during sleep and modulation by hippocampal ripples. *J Neurosci*, **24**, 6446-6456.
- Perez de la Mora, M., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-Garcia, Y., Marcellino, D. and Fuxe, K. (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology*, **90**, 198-216.
- Persengiev, S. P. and Green, M. R. (2003) The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis*, **8**, 225-228.
- Pitkanen, A. (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The Amygdala, a functional analysis*, (J. Aggleton ed.), pp. 31-95. Oxford University Press, New York, EUA.
- Pitkanen, A., Stefanacci, L., Farb, C. R., Go, G. G., LeDoux, J. E. and Amaral, D. G. (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *The Journal of comparative neurology*, **356**, 288-310.
- Price, J. L. (2003) Comparative aspects of amygdala connectivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **985**, 50-58.
- Pudovkina, O. L., Kawahara, Y., de Vries, J. and Westerink, B. H. (2001) The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. *Brain research*, **906**, 38-45.
- Qin, Y. L., McNaughton, B. L., Skaggs, W. E. and Barnes, C. A. (1997) Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **352**, 1525-1533.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Martins, M. R., Barichello, T., Medina, J. H., Roesler, R. and Izquierdo, I. (2004) Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural brain research*, **154**, 339-343.

- Ramirez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F. and Barnes, C. A. (2005) Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci*, **25**, 1761-1768.
- Rao, V. R. and Finkbeiner, S. (2007) NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends in neurosciences*, **30**, 284-291.
- Rasch, B. and Born, J. (2007) Maintaining memories by reactivation. *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 698-703.
- Ray, J. P. and Price, J. L. (1992) The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *The Journal of comparative neurology*, **323**, 167-197.
- Reilly, S. and 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., Shi, X., Engelhard, M. et al. (2007) Novel Experience Induces Persistent Sleep-Dependent Plasticity in the Cortex but not in the Hippocampus. *Front Neurosci*, **1**, 43-55.
- Roache, J. D. and Zabik, J. E. (1986) Effects of benzodiazepines on taste aversions in a two-bottle choice paradigm. *Pharmacol Biochem Behav*, **25**, 431-437.
- Robbins, T., Everitt, B.J. (1995) *Central norepinephrine neurons and behavior: Psychopharmacology-The fourth generation of progress*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Robbins, T. W. (1997) Arousal systems and attentional processes. *Biol Psychol*, **45**, 57-71.
- Robertson, E. M., Pascual-Leone, A. and Press, D. Z. (2004) Awareness modifies the skill-learning benefits of sleep. *Curr Biol*, **14**, 208-212.
- Roldan, G. and Bures, J. (1994) Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural brain research*, **65**, 213-219.
- Rollins, B. L., Stines, S. G., McGuire, H. B. and King, B. M. (2001) Effects of amygdala lesions on body weight, conditioned taste aversion, and neophobia. *Physiology & behavior*, **72**, 735-742.
- Roosendaal, B., Castello, N. A., Vedana, G., Barsegyan, A. and McGaugh, J. L. (2008) Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, **90**, 576-579.
- Roosendaal, B. and 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**, 1107-1118.
- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S., Lamprecht, R. and Dudai, Y. (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci*, **17**, 5129-5135.
- Rosenblum, R. (2008) Conditioned taste aversion and taste learning: molecular mechanisms. In: *Concise Learning and Memory* (J. H. Byrne ed.), pp. 465-482. Elsevier, Sand Diego, CA, EUA.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H. and Cammarota, M. (2009) Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science (New York, N.Y.)*, **325**, 1017-1020.
- Rossetti, Z. L. and Carboni, S. (2005) Noradrenaline and dopamine elevations in the rat prefrontal cortex in spatial working memory. *J Neurosci*, **25**, 2322-2329.

- Rossetti, Z. L., Portas, C., Pani, L., Carboni, S. and Gessa, G. L. (1990) Stress increases noradrenaline release in the rat frontal cortex: prevention by diazepam. *Eur J Pharmacol*, **176**, 229-231.
- Rudy, J. W. (2008) *The Neurobiology of Learning and Memory*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
- Runyan, J. D. and Dash, P. K. (2004) Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem*, **82**, 65-70.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez De Armentia, M. and Power, J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews*, **83**, 803-834.
- Sakai, N. and Yamamoto, T. (1999) Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion. *Neuroscience research*, **35**, 53-61.
- Saper, C. B. (1982) Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **210**, 163-173.
- Scullion, G. A., Kendall, D. A., Sunter, D., Marsden, C. A. and Pardon, M. C. (2009) Central noradrenergic depletion by DSP-4 prevents stress-induced memory impairments in the object recognition task. *Neuroscience*, **164**, 415-423.
- Schafe, G. E., Nadel, N. V., Sullivan, G. M., Harris, A. and LeDoux, J. E. (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y)*, **6**, 97-110.
- Schultz, W. (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nature reviews*, **1**, 199-207.
- Schwartz, S., Shires, T, Spencer, F (1995) *Principios de cirugía*. Interamericana-McGraw-Hill, México.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O. and Pape, H. C. (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science (New York, N.Y)*, **301**, 846-850.
- Shallice, T. and Warrington, E. K. (1970) Independent functioning of verbal memory stores: a neuropsychological study. *The Quarterly journal of experimental psychology*, **22**, 261-273.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C. and Tsien, J. Z. (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, **290**, 1170-1174.
- Shimura, T., Suzuki, M. and Yamamoto, T. (1995) Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain research*, **679**, 221-226.
- Shin, L. M. and Liberzon, I. (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 169-191.
- Shobe, J. (2002) The role of PKA, CaMKII, and PKC in avoidance conditioning: permissive or instructive? *Neurobiology of learning and memory*, **77**, 291-312.
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W. and Kida, S. (1998) CREB and memory. *Annual review of neuroscience*, **21**, 127-148.
- Simonyi, A., Serfozo, P., Parker, K. E., Ramsey, A. K. and Schachtman, T. R. (2009) Metabotropic glutamate receptor 5 in conditioned taste aversion learning. *Neurobiology of learning and memory*, **92**, 460-463.
- Skeberdis, V. A., Chevaleyre, V., Lau, C. G. et al. (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature neuroscience*, **9**, 501-510.
- Smith, C. (2001) Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems. *Sleep Med Rev*, **5**, 491-506.

- St Andre, J. and Reilly, S. (2007) Effects of central and basolateral amygdala lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition. *Behavioral neuroscience*, **121**, 90-99.
- Steketee, J. D., Silverman, P. B. and Swann, A. C. (1992) Noradrenergic receptor mechanisms in neophobia. *Psychopharmacology (Berl)*, **106**, 136-142.
- Stickgold, R. (2005) Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*, **437**, 1272-1278.
- Stork, O., Ji, F. Y. and Obata, K. (2002) Reduction of extracellular GABA in the mouse amygdala during and following confrontation with a conditioned fear stimulus. *Neuroscience letters*, **327**, 138-142.
- Sutherland, G. R. and McNaughton, B. (2000) Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 180-186.
- Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T. and Haganir, R. L. (1997) Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 5157-5166.
- Tseng, K. Y. and O'Donnell, P. (2003) Dopamine-glutamate interactions in the control of cell excitability in medial prefrontal cortical pyramidal neurons from adult rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1003**, 476-478.
- Tseng, K. Y. and O'Donnell, P. (2004) Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci*, **24**, 5131-5139.
- Tucci, S., Rada, P. and Hernandez, L. (1998) Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain research*, **813**, 44-49.
- Ungerstedt, U. (1991) *Introduction to cerebral microdialysis: Microdialysis in the Neurosciences*. Elsevier Publishing Company, EUA.
- Ungless, M. A. (2004) Dopamine: the salient issue. *Trends Neurosci*, **27**, 702-706.
- van Stegeren, A. H., Everaerd, W., Cahill, L., McGaugh, J. L. and Gooren, L. J. (1998) Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. *Psychopharmacology (Berl)*, **138**, 305-310.
- Waelti, P., Dickinson, A. and Schultz, W. (2001) Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature*, **412**, 43-48.
- Walker, M. P. and Stickgold, R. (2006) Sleep, memory, and plasticity. *Annu Rev Psychol*, **57**, 139-166.
- Wang, H., Hu, Y. and Tsien, J. Z. (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in neurobiology*, **79**, 123-135.
- Wang, H., Shimizu, E., Tang, Y. P. et al. (2003) Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4287-4292.
- Wang, J. and O'Donnell, P. (2001) D(1) dopamine receptors potentiate nmda-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex*, **11**, 452-462.
- Welzl, H., D'Adamo, P. and Lipp, H. P. (2001) Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural brain research*, **125**, 205-213.
- Wilkinson, L. S., Humby, T., Killcross, A. S., Torres, E. M., Everitt, B. J. and Robbins, T. W. (1998) Dissociations in dopamine release in medial prefrontal cortex and ventral striatum during the acquisition and extinction of classical aversive conditioning in the rat. *The European journal of neuroscience*, **10**, 1019-1026.

- Wilson, M. A. and McNaughton, B. L. (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, **265**, 676-679.
- Yamamoto, T. and Fujimoto, Y. (1991) Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain research bulletin*, **27**, 403-406.
- Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T. and Yasoshima, Y. (1998) Roles of chemical mediators in the taste system. *Japanese journal of pharmacology*, **76**, 325-348.
- Yamamoto, T., Sako, N., Sakai, N. and 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.
- Yasoshima, Y., Morimoto, T. and Yamamoto, T. (2000) Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain research*, **869**, 15-24.
- Yasoshima, Y. and Yamamoto, T. (2005) Effects of midazolam on the expression of conditioned taste aversion in rats. *Brain research*, **1043**, 115-123.
- Yasui, Y., Breder, C. D., Saper, C. B. and Cechetto, D. F. (1991) Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **303**, 355-374.
- Young, A. M., Moran, P. M. and Joseph, M. H. (2005) The role of dopamine in conditioning and latent inhibition: what, when, where and how? *Neurosci Biobehav Rev*, **29**, 963-976.
- Zhang, H. T., Frith, S. A., Wilkins, J. and O'Donnell, J. M. (2001) Comparison of the effects of isoproterenol administered into the hippocampus, frontal cortex, or amygdala on behavior of rats maintained by differential reinforcement of low response rate. *Psychopharmacology*, **159**, 89-97.

## Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation

Kioko Guzmán-Ramos, Daniel Osorio-Gómez, Perla Moreno-Castilla and Federico Bermúdez-Rattoni

*División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México*

### Abstract

It has been postulated that memory consolidation process requires post-learning molecular changes that will support long-term experiences. In the present study, we assessed with *in vivo* microdialysis and capillary electrophoresis whether such changes involve the release of neurotransmitters at post-acquisition stages. Using conditioned taste aversion paradigm we observed spontaneous off-line (i.e. in absence of stimulation) dopamine and glutamate reactivation within the insular cortex about 45 min after the stimuli association. These increments did not appear in control groups that were unable to acquire the task, and it seems to be dependent on

amygdala activity since its reversible inactivation by tetrodotoxin impaired cortical off-line release of both neurotransmitters and memory consolidation. In addition, blockade of dopaminergic D1 and/or NMDA receptors before the off-line activity impaired long- but not short-term memory. These results suggest that off-line extracellular increments of glutamate and dopamine have a significant functional role in consolidation of taste memory.

**Keywords:** consolidation, dopamine, glutamate, microdialysis, neurochemical reactivation, taste memory.

*J. Neurochem.* (2010) 10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x

Memory formation relies on synaptic changes initiated by the activation of several neurotransmitter systems during learning, i.e. the acquisition of information. The progressive process of information storage is referred as memory consolidation (Dudai 2004). According to their duration, there are two kinds of memories: short-term memory (STM) lasting from minutes to hours and long-term memory (LTM) lasting days, weeks, and even a life time (Alberini *et al.* 2006). The molecular and cellular mechanisms underlying these memory processes have been the main subject of several studies. In this regard, an experimental model that has been very useful to study the neurobiological processes involved in memory consolidation is known as conditioned taste aversion (CTA). CTA is a learning paradigm where a novel taste [conditioned stimulus (CS)] is paired with digestive malaise [unconditioned stimulus (US)]. In the next CS exposure, animals avoid its consumption reflecting the aversion learning that protects organisms against ingestion of toxic food (Bermudez-Rattoni 2004). This associative learning is established in one trial and allows for a convenient delay between taste exposure and visceral signals of poisoning making possible to study the biochemical and molecular events related with the CS and the US during the taste learning process (Bermudez-Rattoni 2004).

Many studies have demonstrated that the insular cortex (IC) activation is necessary for the gustatory and visceral stimuli processing. For instance, the exposure to a new gustatory stimulus produces electrical and molecular changes in this structure, such as increments in unitary neurons firing (Ogawa *et al.* 1992; Hanamori *et al.* 1998; Katz *et al.* 2001); expression of immediate-early genes, such as *c-fos* (Bernstein and Koh 2007) and increase of acetylcholine release (Miranda *et al.* 2000, Shimura *et al.* 1995). In addition, it has been demonstrated that visceral stimulation, like malaise

Received January 11, 2010; revised manuscript received March 27, 2010; accepted March 30, 2010.

Address correspondence and reprint requests to Federico Bermúdez-Rattoni, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México. E-mail: fbermude@ifc.unam.mx

**Abbreviations used:** AMY, amygdala; AP, anteroposterior; APV, 2-amino-5-phosphonovaleric acid; CS, conditioned stimulus; BLA, basolateral amygdala; CTA, conditioned taste aversion; DA, dopamine; DV, dorsoventral; GLU, glutamate; IC, insular cortex; L, mediolateral; LTM, long-term memory; NMDAR, NMDA receptors; PBS, phosphate buffer saline; PKA, cAMP dependent protein kinase; SAC, saccharin; SCH23390, R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride; SS, saline; STM, short-term memory; TTX, tetrodotoxin; US, unconditioned stimulus.



induction by i.p. LiCl injection, induces reliable glutamate (GLU) increments within the IC (Miranda *et al.* 2002). Moreover, the IC participates in the CTA consolidation process (Rosenblum *et al.* 1993; De la Cruz *et al.* 2008) which depends of the NMDA receptors (NMDAr) activity (Rosenblum *et al.* 1997; Gutierrez *et al.* 1999; Miranda *et al.* 2002). In particular, NMDAr blockade before or 30, 60 and 120 min after CTA training impairs long-, but not short-term memory (Gutierrez *et al.* 1999). These results suggest that prolonged glutamate/NMDA activity may take place to achieve the consolidation process. Supporting this hypothesis, Cui *et al.* (2005) reported a CTA long-term impairment in temporary induced forebrain NMDAr knock-out mice which showed absence of NR1 subunit for hours and even days after learning. These authors proposed that glutamate/NMDAr reactivations occurring after acquisition are important for long-term memory storage.

Such post-learning reactivation may involve other neurotransmitter systems acting as modulators that facilitate glutamatergic inputs leading to enduring changes in the memory trace. Several lines of evidence indicate that the dopaminergic system modulates synaptic plasticity (Schultz 2002; Jay 2003; Ungless 2004). However, little is known about the role of the dopaminergic system in the associative CS and US process for CTA formation. It has been reported that dopamine (DA) depletion by the administration of 6-hydroxydopamine in the IC or the blockade of D1 type receptors before the conditioning impairs this task (Fernandez-Ruiz *et al.* 1993; Berman *et al.* 2000). Although these results indicate that dopaminergic activity is necessary in the IC for memory formation, it remains to be determined if DA is involved in acquisition and/or consolidation of CTA. Post-acquisition role of the dopaminergic system in the regulation of memory consolidation has also been studied. Thus, it has been shown that systemic amphetamine administration, which increases DA release, enhanced retention of other aversive conditioning training such as inhibitory avoidance (Martinez *et al.* 1980). Moreover, DA infusions into the basolateral amygdala immediately after training enhanced retention of the same task (Lalumiere *et al.* 2004). Both glutamatergic and dopaminergic systems are related to consolidation of several learning tasks and their role may not be restricted to stimulus signaling during acquisition stages, since their activity in post-acquisition periods seems to be involved in long-term storage.

All these results suggest that post-acquisition neurotransmitter release within the IC during off-line periods (i.e. absence of sensory input) is required to consolidate memory. Therefore, the aim of the present study was to evaluate, by using *in vivo* microdialysis and capillary electrophoresis, the simultaneous GLU and DA release in the IC during the associative CS-US forward presentation and for an additional hour to determine post-trial neurotransmitter extracellular changes. We found off-line changes in these neurotransmit-

ters release, which were impaired by reversible blockade of the amygdala, a structure that modulates IC activity and is involved in CTA memory formation. Furthermore, we evaluated the functional role of the cortical neurochemical off-line changes by performing bilateral post-trial injections of either a NMDA antagonist, 2-amino-5-phosphonopivalic acid (APV) or a D1 antagonist, R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390), and the combination of both into the IC 30 min after the CS-US presentation. The results suggest that the off-line concomitant release of DA and GLU within the IC is required to accomplish CTA memory consolidation and that such post-acquisition activity is dependent on amygdala functional integrity.

## Experimental procedures

### Animals

Adult male Wistar rats, weighing 260–280 g at the time of surgery, were used and handled according to the The Institute of Cellular Physiology Animal Welfare Assurance, approved by NIH. Rats were housed individually and maintained on a 12 h light/12 h dark cycle with water and food *ad libitum* except when noted on the behavioral procedures. Training was conducted during the light portion of the cycle.

### Guide cannulae implantation

Unilateral guide cannula (CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) aiming to the left insular cortex was implanted using standard stereotaxic procedures with coordinates from Bregma according to Paxinos and Watson (1998) [Anteroposterior (AP) + 1.2 mm; Mediolateral (L) –5 mm; Dorsoroventral (DV) –4.5 mm]. For the drugs administration experiments, bilateral 23-gauge stainless steel cannulae were implanted aiming both IC (AP + 1.2 mm; L ± 5.5 mm; DV –3 mm).

### Microdialysis procedure for CS – US associative presentation

Five days after surgery, animals were deprived of water for 24 h and placed in the microdialysis chamber for 3 h for 5 days to let them habituate to the environment and constant manipulation and were allowed to drink 10 mL of tap water from a graded bottle during 15 min. During microdialysis, a dialysis probe with a 3 mm membrane (CMA 12 MD Probe, CMA Microdialysis) was connected to the micro infusion pump system (CMA Microdialysis), which infused artificial cerebrospinal fluid (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.25 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, glucose 10 mM) at a rate of 1 µL/min. The length of the outflow connection tubing was measured to calculate the ‘dead volume’ (inner volume of the tubing × length of the tubing × infusion rate) which causes a delay between the beginning of the behavioral response and the correspondent microdialysis fraction. After insertion of the probe, 1 h of fluid stabilization was allowed; samples were collected every 4 min in vials containing 1 µL of antioxidant mixture (0.25 mM ascorbic acid, Na<sub>2</sub>EDTA 0.27 mM, 0.1 M acetic acid) and immediately frozen at –80°C. Three fractions were collected



as baseline samples after which stimulus exposure began (see below for behavioral conditions).

The following groups of animals were submitted to microdialysis for about 2 h, during stimuli exposure according to the corresponding group and one extra hour: The conditioned group (SAC-LiCl  $n = 10$ ), which was exposed during 15 min to 10 mL of a 0.1% (wt/vol) sodium saccharin solution (SAC) and then followed by i.p. LiCl injections (0.4 M, 7.5 mL/kg) after 15 min. Non-conditioned group (SAC-NaCl,  $n = 7$ ), rats were exposed to the same saccharin solution, but afterwards they received i.p. NaCl injection (0.4 M, 7.5 mL/kg) that would not cause gastric malaise and therefore no taste aversion would develop. Another control group of animals were exposed to tap water instead of saccharin and received the LiCl injection (H<sub>2</sub>O-LiCl,  $n = 5$ ) and other group of animals received NaCl i.p. injection after water consumption (H<sub>2</sub>O-NaCl,  $n = 6$ ). Finally the backward conditioning group (LiCl-SAC,  $n = 7$ ) that was exposed to a LiCl injection (0.4 M, 7.5 mL/kg) and 15 min later with the presentation of saccharin solution, being an ineffective training for CTA memory formation (Barker and Smith 1974). Three days after training, aversion memory was evaluated by re-exposure of the animals to the saccharin solution and measuring consumption.

#### Analysis of glutamate and dopamine in microdialysate samples

These neurotransmitters levels were determined by capillary electrophoresis. This methodological approximation allows us to analyze aminoacids and catecholamines simultaneously in the same sample, with more resolution than conventional HPLC (Landers 1997). The procedure for microdialysis samples analysis was derivatization with 6  $\mu$ L of 16.67 M 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in the presence of 2  $\mu$ L of KCN 25 mM in 10 mM borate buffer (pH 9.2) and 1  $\mu$ L of internal standard (0.075 mM O-methyl-L-threonine). The mixture was allowed to react in the dark at 65°C for 15 min. Separation and analysis was conducted in a capillary electrophoresis system (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with laser induced fluorescence detection, light at 488 nm from an argon ion laser was used to excite the 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde-labeled analytes. The separation of compounds was based on a micellar electrokinetic chromatography buffer system that included 35 mM borates, sodium dodecylsulphate 25 mM, 13% (vol/vol) methanol HPLC grade, final pH 9.6. The samples were injected hydro-dynamically at 0.5 psi for 5 s in a 75  $\mu$ m i.d. capillary (Beckman Coluter); then the separation was performed at 25 kV. After each run the capillary was flushed with 0.1 M NaOH, water and running buffer. The glutamate and dopamine peaks were identified by matching the migration pattern with those in a spiked sample and corrected by relating the area under the curve of the unknown sample with the area under the curve of the internal standard. Data were analyzed using Karat System Gold (Beckman Coulter) generating a calibration curve of six points (see Appendix S1). All results were converted into percentage of baseline release (% BL = analyte concentration  $\times$  100/mean of the three-first samples).

#### Statistical analysis

Statistical analysis of extracellular changes in the dialysates was carried out using one-way ANOVA with Fisher *post hoc* test using Statview 4 (Abacus Concepts, Piscataway, NJ, USA); *t* tests to

compare one fraction among groups when indicated. We considered any change of  $\pm 100\%$  from baseline release as significant. A  $p < 0.05$  value was considered statistically significant.

#### Tetrodotoxin administration during microdialysis monitoring

Animals were implanted with a unilateral microdialysis cannula aiming the left IC (AP + 1.2 mm; L -5 mm; DV -4.5 mm) and bilateral cannulae aiming the amygdala (AP -2.8 mm, L  $\pm$  4.8 mm, DV -6.5). Microdialysis monitoring procedure was performed in the IC as described above following the conditioning procedure of the SAC-LiCl group. Immediately after the LiCl, tetrodotoxin (TTX, 10 ng/ $\mu$ L in phosphate buffer solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA,  $n = 6$ ) or phosphate buffer saline (PBS;  $n = 5$ ) were infused into the amygdala; a total volume of 1  $\mu$ L per hemisphere was delivered at a rate of 0.5  $\mu$ L/min. After micro infusions were completed, the injection needles were left placed in the guide cannulae for an additional minute to allow diffusion of the solutions into the tissue. LTM was evaluated 72 h after the acquisition by re-exposure to the same saccharin solution and the consumption was measured.

#### Behavioral procedure for drugs administration experiments

Five days after cannulae implantation, animals were deprived of water for 24 h and the subsequent 5 days they were allowed to drink 30 mL of tap water during 15 min in the morning and 4.5 h later for another 15 min, to perform a STM and LTM test when required. This protocol for testing STM and LTM in the same animals has proved that the saccharin presentation during STM has no interference with the LTM aversion response (Ferreira *et al.* 2002). The volume of water ingested was measured and the mean of this intake was considered as baseline. For CTA acquisition, rats were exposed to 0.1% (wt/vol) saccharin solution during 15 min and 15 min later they received a 0.4 M LiCl i.p. injection (7.5 mL/kg); STM was evaluated 4.5 h after the acquisition by re-exposing the rats to the same saccharin solution and the consumption was registered. LTM was evaluated 72 h after acquisition. Data are presented as percentage of consumption during acquisition [%ACQ = (saccharin solution intake  $\times$  100/mean of baseline water consumption)]. ANOVA with *post hoc* Fisher test was used to analyze these data, a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

#### Drugs administration

All drugs were dissolved in saline solution (0.9% wt/vol). Drug administration was made through 30-gauge dental needles that protruded 1.5 mm from the tip of the guide cannulae. Injection needles were connected via polyethylene tubing into two 10  $\mu$ L Hamilton syringes, driven by an automated micro infusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). A total volume of 1  $\mu$ L per hemisphere was delivered at a rate of 0.5  $\mu$ L/min. After micro infusions were completed, the injection needles were left placed in the guide cannulae for an additional minute to allow diffusion of the solutions into the tissue.

Animals were divided into five groups, counter-balanced according to their baseline mean consumption: Control group ( $n = 13$ ) received saline solution microinjections; APV ( $n = 9$ ) received DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L in saline solution; Tocris Bioscience, MO, USA); this is an effective dose for blocking NMDAr in the IC (Berman *et al.* 2000). SCH ( $n = 7$ ) received



SCH23390 (2 µg/µL; Sigma-Aldrich; Runyan and Dash (2004)). APV + SCH group received a mixture of APV and SCH23390 at the above final concentrations ( $n = 8$ ) and the last group which received a cAMP analog, Rp-cAMP that inhibits cAMP dependent protein kinase (PKA) activity (0.065 µg/µL,  $n = 7$ ; Sigma-Aldrich); the dose used was taken from Izquierdo *et al.* (2002). All groups received the cortical microinjections 30 min after the CTA training and were evaluated for STM and LTM.

## Results

### Concomitant off-line release of dopamine and glutamate after training

We determined neurotransmitters extracellular levels during and after CS-US association. The baseline concentration for DA was  $2 \pm 0.7$  fmol/µL in all the microdialyzed groups. As it can be seen in Fig. 1a, significant increments of extracellular DA, about 250% of baseline ( $t = 6.122$ ,  $p < 0.001$ ), were related to exposure to a new taste (0.1% saccharin). There were not noticeable changes on DA release related to visceral stimulation, but the continuous post-acquisition monitoring revealed a 240% increase exclusively in trained animals 40 min after LiCl injections. The increments were significantly different from the SAC-NaCl group which did not develop taste aversion ( $t = 3.310$ ,  $p < 0.01$ ; see Figs 1a and 2), but experienced the same novel taste. These results indicate that the sole gustatory stimuli did not elicit the posterior off-line release. To rule out that the post-acquisition increment could be related to the LiCl injection, which is the only difference between SAC-LiCl and SAC-NaCl groups, we monitored two more groups that were allowed to drink water and then received a 0.4 M LiCl injection or 0.4 M NaCl injection (H<sub>2</sub>O-LiCl and H<sub>2</sub>O-NaCl; Fig. 1c). The post-acquisition monitoring revealed no significant changes in DA release over time.

Regarding the glutamatergic release, there were no significant changes in extracellular GLU after presentation of saccharin (GLU baseline concentration  $1.75 \pm 0.32$  nmol/µL, Fig. 1b). This result is in accordance to previous studies that reported no GLU changes during exposure to novel gustatory stimulus. As it can be seen in Fig. 1b, LiCl 0.4 M injections produced significant increment in extracellular GLU compared with its baseline levels ( $t = 6.023$ ,  $p < 0.001$ ) and to an equimolar NaCl 0.4 M group (Fig. 1b, 48 min fraction,  $t = 3.792$ ,  $p < 0.01$ ). These results indicate that the increments are specific to gastric malaise induction and not handling, manipulation of animals or intraperitoneal injections. In the post-acquisition monitoring, we found that the SAC-LiCl group showed a 270% increase 44 min after LiCl injection that did not appear in the SAC-NaCl group ( $t = 6.524$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 1b). Interestingly, we did not observe any significant post-acquisition release changes in GABA or in norepinephrine (see Figure S1) indicating that such phenomenon is not generalized for all neurotransmitters. The GLU monitoring in

the H<sub>2</sub>O-LiCl group showed the expected significant increase related to the LiCl administration (Fig. 1d,  $t = 4.747$ ,  $p < 0.05$  vs. baseline). However, no post-learning neurochemical reactivation occurred indicating that such phenomenon is not related to the malaise induction alone.

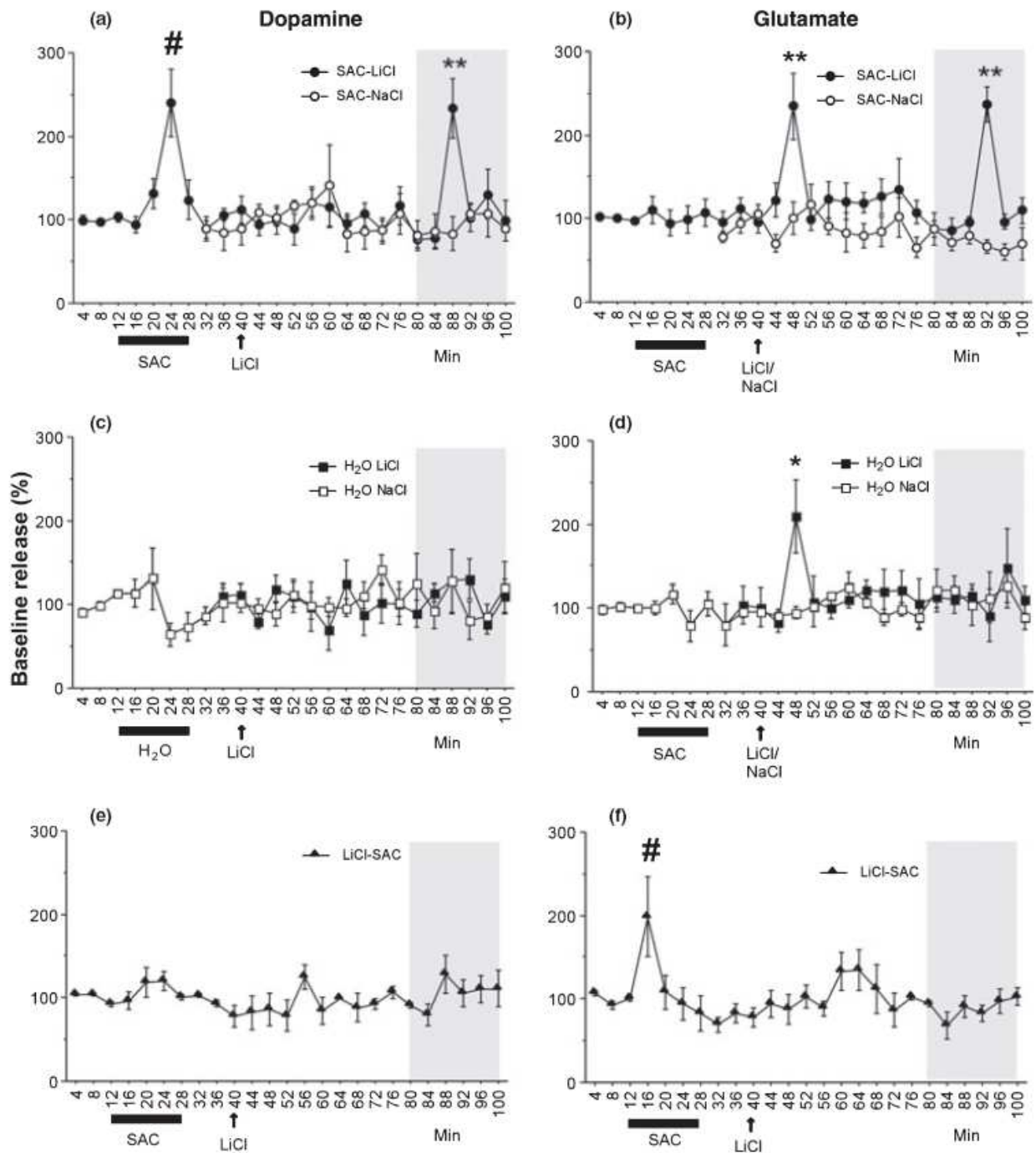
To evaluate if the presentation of both stimuli would produce off-line neurochemical reactivation, we evaluated a group that underwent backward conditioning in which the CS is preceded by the US presentation and CTA was not established. No significant DA (Fig. 1e, LiCl-SAC) or GLU (Fig. 1f) post-acquisition changes from baseline levels were observed in this group. GLU extracellular levels increased following the induction of malaise ( $t = 3.959$ ,  $p < 0.01$ ) but no after the acquisition period. The lack of DA increase during saccharin exposure in the backward conditioning group is noteworthy. This lack of release may be because of NMDA-mediated synaptic depression. Accordingly, it has been reported that stimulus-induced dopamine release in the prefrontal cortex can be reduced by previous GLU levels increments and/or activation of NMDAR by local perfusion of the receptor agonist NMDA (Del Arco & Mora 2001). In addition, NMDA agonist application also depressed evoked-dopamine release in cortico-striatal mouse brain slices through NR2A- but not NR2B-containing NMDAR, a well-known regulating system of glutamatergic transmission (Schotanus & Chergui 2008). Although the specific mechanisms by means of which glutamate release produces depression of dopamine release remains to be demonstrated, it is clear that backward conditioning did not produce reliable off-line dopamine and glutamate release.

As shown in Fig. 2, the conditioned SAC-LiCl group produced significant taste aversion in contrast to the backward conditioning (LiCl-SAC), the H<sub>2</sub>O-LiCl, H<sub>2</sub>O-NaCl and SAC-NaCl groups that failed to elicit CTA. A simple ANOVA analysis for the long-term memory taste test revealed that there were significant differences among groups. ( $F_{4,21} = 11.588$ ,  $p < 0.001$ ). A Fisher *post hoc* test indicated a significant difference between the SAC-LiCl group and the rest of the control groups ( $p$ 's  $< 0.001$ ).

### Post-trial reversible amygdala inactivation impairs cortical off-line glutamate and dopamine release and taste memory consolidation

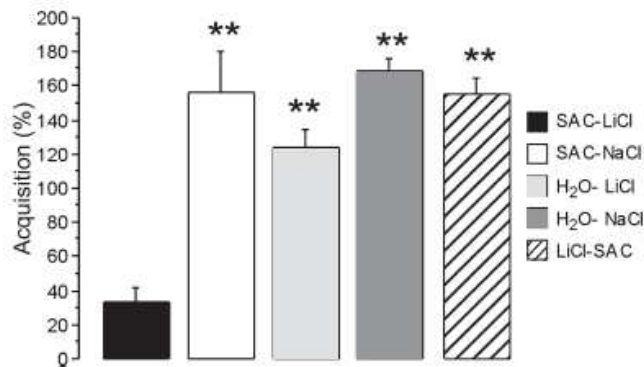
It has been proposed that the amygdala (AMY) modulation contributes to CTA memory consolidation (Gallo *et al.* 1992; Roldan and Bures 1994; Sakai and Yamamoto 1999). Such modulation could be through the glutamatergic projections to the IC (Bermudez-Rattoni and McGaugh, 1991) and to the ventral tegmental area (Kauffling *et al.* 2009). In this regard, it has been demonstrated that post-acquisition blockade of NMDAR within the ventral tegmental area impaired LTM of an inhibitory avoidance task (Rossato *et al.* 2009). Similarly, it has been reported that tetanic stimulation of basolateral amygdala (BLA) induces NMDA dependent long-term





**Fig. 1** Extracellular dopamine and glutamate levels in the insular cortex increase concomitantly in the post-acquisition period of conditioned taste aversion training. (a) Dopamine monitoring: SAC-LiCl, conditioned group ( $n = 10$ ) received 0.1% saccharin solution followed by 0.4 M LiCl i.p. injection (7.5 mL/kg); SAC-NaCl, non-conditioned group ( $n = 7$ ) received 0.1% saccharin solution followed by 0.4 M NaCl i.p. injection (7.5 mL/kg); the conditioned stimulus elicited a dopamine increase in both groups but only the conditioned group showed a post-acquisition increase in the 88 min fraction. (b) Glutamate responses monitoring in conditioned and non-conditioned groups, the unconditioned stimulus elicited an increment in the SAC-LiCl group as a result of the LiCl injection but only the conditioned group showed a post-acquisition increase in the 92 min fraction. (c)

Dopamine responses of control groups to stimuli: H<sub>2</sub>O-LiCl group ( $n = 5$ ) received tap water followed by 0.4 M LiCl i.p.; H<sub>2</sub>O-NaCl group ( $n = 6$ ) received tap water followed by 0.4 M NaCl i.p.; Dopamine levels are significantly different during saccharin exposure that during water exposure and showed no post-acquisition increments. (d) Glutamate responses to the LiCl and NaCl injection showed no post-acquisition changes, only the one related to the unconditioned stimulus. (e) Dopamine responses during backward conditioning: LiCl-SAC ( $n = 7$ ), received 0.4 M LiCl i.p. and later, a 0.1% (wt/vol) saccharin solution; there is no post-acquisition increment. (f) Glutamate response during the backward conditioning. Graphics expressed as means of % baseline release  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , and \*\* $p < 0.01$  versus control group and # $p < 0.05$  versus baseline release.

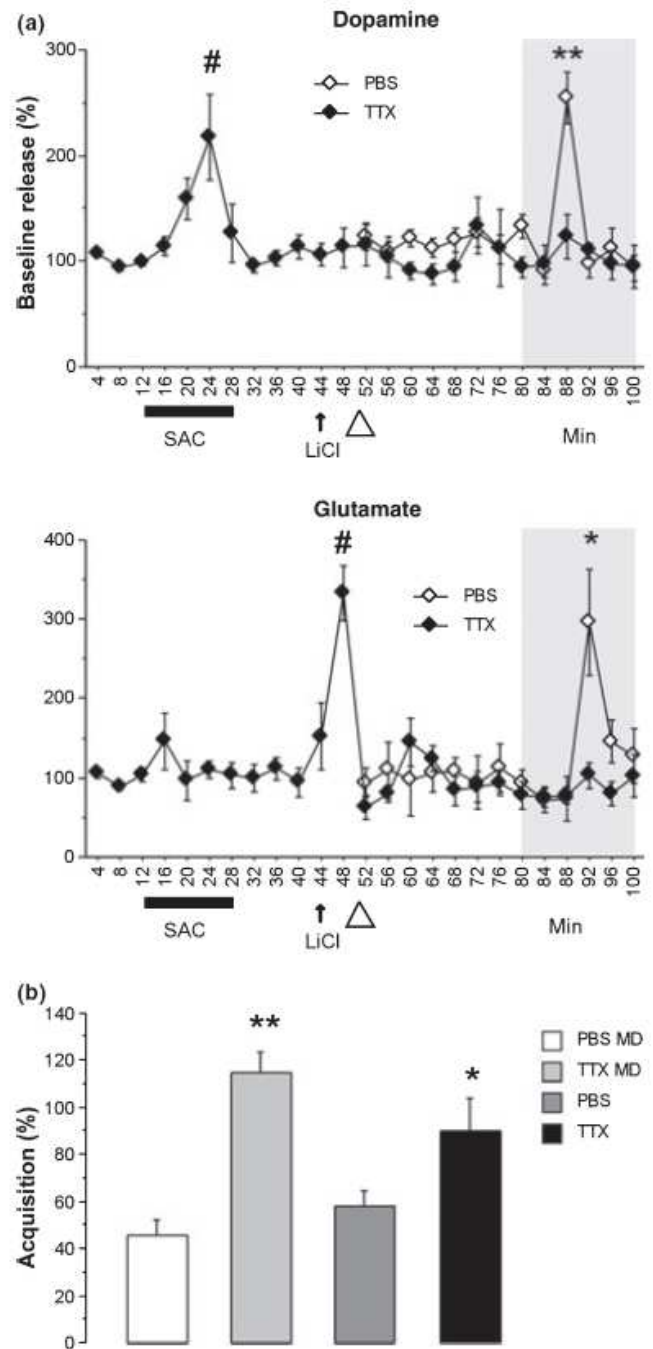


**Fig. 2** The conditioned group is the only one that shows aversion in a long-term memory test. The microdialyzed groups were exposed to the saccharin solution 72 h after acquisition. SAC-LiCl, conditioned group ( $n = 10$ ) received 0.1% saccharin solution followed by 0.4 M LiCl i.p. injection (7.5 mL/kg); SAC-NaCl, non-conditioned group ( $n = 7$ ) received 0.1% saccharin solution followed by 0.4 M NaCl i.p. injection (7.5 mL/kg). H<sub>2</sub>O-LiCl group ( $n = 5$ ) received tap water followed by 0.4 M LiCl i.p.; H<sub>2</sub>O-NaCl group ( $n = 6$ ) received tap water followed by 0.4 M NaCl i.p.; LiCl-SAC ( $n = 7$ ) received 0.4 M LiCl i.p. and later, a 0.1% saccharin solution. Graphics are expressed as % of consumption during acquisition  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  versus SAC-LiCl.

potentiation in the IC and increases the retention of CTA memory (Escobar *et al.* 1998). Moreover, post-acquisition glutamate administration in the BLA enhances the strength of CTA and this effect depends on NMDAR activation within the IC (Ferreira *et al.* 2005). With this information, we assessed if the DA and GLU off-line increment in the IC are as a result of amygdalar activation. We reversibly blocked the AMY activity by bilateral infusion of TTX (10 ng/ $\mu$ L in phosphate buffer) after the LiCl injection, while we made the microdialysis monitoring in the IC. As it can be seen in Fig. 3a, AMY inactivation impaired GLU (92 min fraction,  $t = 2.782$ ,  $p < 0.05$ ) and DA (88 min fraction,  $t = 3.562$ ,  $p < 0.01$ ) off-line release in the IC when compared with a control group that received intra-amygdalar vehicle. These results indicate that AMY activity is involved in the off-line extracellular changes within the IC. Fig. 3b shows LTM test of the microdialyzed groups, vehicle (PBS-MD) and TTX intra-amygdalar infusions (TTX-MD) that were compared with animals cannulated in the AMY and received the same drug treatment and underwent CTA training without been monitored by microdialysis (PBS and TTX groups). An ANOVA analysis showed that the TTX infusion significantly impaired CTA consolidation as compared with PBS infusion ( $t = 5.978$ ,  $p < 0.01$ , PBS-MD vs. TTX-MD; and PBS vs. TTX,  $t = 2.502$   $p < 0.05$ ).

#### Post-trial NMDA receptors antagonist impairs CTA consolidation, and it is potentiated by concurrent blockade of D1 dopamine receptors

To evaluate the functional role of the extracellular DA and GLU changes within the insular cortex in CTA formation, we



**Fig. 3** Amygdala reversible inactivation impairs conditioned taste aversion consolidation and post-acquisition dopamine and glutamate cortical increments. (a) Effects of bilateral infusion of tetrodotoxin (TTX;  $n = 6$ ) or phosphate buffer saline (PBS;  $n = 5$ ) into the amygdala immediately after the LiCl administration in the dopamine and glutamate levels within the insular cortex. Graphics expressed as means of % baseline release  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , and \*\* $p < 0.01$  versus control group. (b) Long-term memory test of the microdialyzed groups (TTX-MD and PBS-MD) compared with groups without microdialysis monitoring (TTX,  $n = 8$  and PBS,  $n = 8$ ). TTX administration impaired memory consolidation in both cases. The results are showed in % of acquisition = (mL of saccharin during test  $\times$  100)/mL saccharin during acquisition. \*\* $p < 0.01$  versus PBS group.



blocked either the NMDA glutamate receptors (APV, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) or the D1-type dopamine receptors (SCH23390, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) separately or simultaneously 30 min after the acquisition period. A simple ANOVA analysis showed no significant difference among groups in STM test indicating that drug administration did not impair the task acquisition (Fig. 4). However, significant differences were found among groups in the LTM test, as revealed by one-way ANOVA analysis ( $F_{3,33} = 15.807$ ,  $p < 0.05$ ). *Post hoc* Fisher test showed that LTM was impaired in the NMDA-inhibited group (APV) as it was significantly different from the saline group (SS) ( $p < 0.001$ ). The D1-inhibited group (SCH) showed no differences in LTM test compared with the SS group, indicating that post-acquisition SCH administration did not interfere with long-term memory storage. Interestingly, the simultaneous blockade of NMDA and D1 receptors in the IC (APV + SCH group) caused a potentiated and significant impairment of LTM compared with the groups that received APV or SCH alone ( $p < 0.05$ , Fig. 4). These results suggest

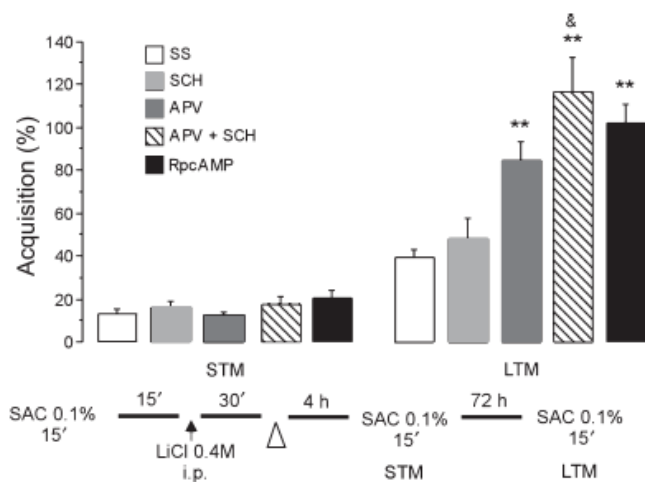
that D1 receptors potentiate the consolidation process in conjunction with NMDA receptors.

#### Post-trial blockade of cAMP dependent protein kinase impairs CTA consolidation

It has been reported that NMDA–D1 synergism require post-synaptic intracellular calcium and PKA activation (Cepeda *et al.* 1998; Wang and O'Donnell 2001; Baldwin *et al.* 2002; Tseng and O'Donnell 2004; Hallett *et al.* 2006). PKA is activated through the increment of cAMP caused by D1 receptors stimulation. To evaluate if PKA off-line activity was necessary for CTA consolidation, we injected intracortically a PKA inhibitor (Rp-cAMP) 30 min after the acquisition period. STM evaluation revealed no differences against the group that received saline solution; LTM showed a significant difference with SS group ( $t = 6.015$ ,  $p < 0.01$ ) indicating a role on CTA consolidation.

#### Discussion

For a long time the mechanisms for memory consolidation have been explained by structural synaptic plasticity (Martin *et al.* 2000). Those plastic changes may involve off-line neuronal activity that allows maintenance of the information until it is well established. Several examples include off-line waves of protein synthesis associated with earlier learning (Montag-Sallaz and Montag 2003; Ramirez-Amaya *et al.* 2005; Bekinschtein *et al.* 2007), and electrophysiological evidence that shows post-acquisition replay of activity patterns that occurred during training (Gerrard *et al.* 2001; Pennartz *et al.* 2004; Ribeiro *et al.* 2007; Eschenko *et al.* 2008; Lansink *et al.* 2008). When we monitored neurotransmitters release for an hour after acquisition, a close coincident increase of GLU and DA occurred about 44–48 min after stimuli association. DA and GLU increments were specific to the group that acquired CTA learning, since they did not appear in any of the other groups that did not display aversion. Thus, it seems unlikely that the off-line neurotransmitters release is related to late signals produced either by saccharin consumption or LiCl injection. Our results fit well with the notion that memory consolidation requires neurochemical reactivation within the structure that was engaged during the acquisition long time after sensory stimulation is over. Furthermore, the post-acquisition release responses in the IC seem to be involved in memory consolidation of CTA, since blockade of the NMDA and D1 receptors simultaneously disrupted long- but not short-term memory. There are some insights into the possible mechanism involve synergic activity between the D1–NMDA receptors. A considerable amount of evidence indicates that D1 receptors can modify the strength of synaptic transmission enhancing the excitability of neurons (Cepeda *et al.* 1998; Wang and O'Donnell 2001; Jay 2003; Tseng and O'Donnell 2003, 2004; Hallett *et al.* 2006). D1



**Fig. 4** D1 and NMDA receptors post-acquisition activity is required for memory consolidation. (a) Effect of intracortical administration of 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV), R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride, a mixture of both drugs and Rp-cAMP 30 min after conditioned taste aversion (CTA) acquisition in short- and long-term memory. Post-acquisition blockade of NMDA receptors (APV group,  $n = 9$ ) impaired CTA consolidation compared with the group that received an intracortical saline injection (SS,  $n = 13$ ); the sole blockade of D1 receptors has no effect in short-term memory (STM) or long-term memory (LTM) (SCH,  $n = 7$ ); however, the concomitant blockade of NMDA and D1 receptors caused significantly stronger CTA impairment (APV + SCH,  $n = 8$ ). cAMP dependent protein kinase inhibition in the post-acquisition period also impaired LTM but not STM indicating a role in CTA consolidation (Rp-cAMP,  $n = 7$ ). (b) CTA protocol and drugs administration (white triangle) 30 min after CTA acquisition. The results are shown in % of acquisition = (mL of saccharin during test  $\times$  100)/mL saccharin during acquisition  $\pm$  SEM. STM, short-term memory; LTM, long-term memory. \*\* $p < 0.01$  versus SS group; &  $p < 0.05$  APV + SCH versus APV group.



receptors potentiate NMDA conductance by means of NR1 subunit phosphorylation through cAMP-protein kinase activity (PKA; Tingley *et al.* 1997). It has been reported that the NMDA-mediated response is potentiated by SKF38393 resulting in a significant increment of the number and frequency of spikes compared with the application of NMDA alone (Tseng and O'Donnell 2003). Conversely, D2 receptors agonist quinpirole decrease the frequency of spikes and the D2 receptors antagonist sulphiride has no effect (Gurden *et al.* 2000; Tseng and O'Donnell 2004). It has been shown that D1 receptors activation can potentiate NMDA receptors function by directly promoting the surface insertion of the receptor complexes (Hallett *et al.* 2006) and induce long lasting forms of synaptic plasticity like long-term potentiation through cAMP/PKA/CREB pathway activation (Jay 2003). Thus, D1 receptors post-acquisition activity may modulate the concomitant glutamatergic activity through NMDA phosphorylation and protein synthesis, enhancing excitability which in consequence provides adequate plasticity to maintain neuronal signaling ongoing in the IC for the long-term memory establishment.

Since NMDA activity seems to be critical for CTA memory consolidation (Rosenblum *et al.* 1997; Berman *et al.* 2000), we tried to assess if such glutamatergic input came from amygdalar projections. In this regard, it has been shown that long-term potentiation induced in the BLA produces significant CTA memory enhancement (Escobar and Bermudez-Rattoni 2000) which depends on NMDAR activation within the IC (Escobar *et al.* 2002; Ferreira *et al.* 2005). Reversible post-acquisition blockade of AMY with bilateral TTX infusion hindered off-line glutamate and dopamine increments in the IC and impaired CTA consolidation. These results indicate that amygdala activation is associated to IC post-acquisition activity. Glutamatergic reactivation impairment may be because of inhibition of this kind of input directly from AMY blockade. Conversely, the inhibition of DA release may be because of blockade of amygdalar modulation of ventral tegmental area (Kaufling *et al.* 2009), the main dopaminergic nucleus projecting to the IC (Ohara *et al.* 2003). It has been proposed that emotionally arousing tasks, such as CTA, engage AMY activation which modulate memory strength and consolidation (McGaugh 2004) not only during the acquisition period through stimuli signaling, but through post-learning oscillations that promote synaptic plasticity in co-active structures such as the IC (Pare *et al.* 2002). Such plasticity may need reactivation of particular biochemical pathways to sustain the levels of proteins that are required for the persistence of memory (Wang *et al.* 2006). This hypothesis is supported by experiments that showed that NMDA receptors synthesis is required for CTA and fear conditioning consolidation since the temporary knockout of the cortical NMDAR during either learning or post-learning consolidation stages causes severe performance deficits for up to 1-month after taste memory

training (Shimizu *et al.* 2000; Cui *et al.* 2005). The same research group used an inducible and region specific protein knockout technique to assess CaMKII role in post-learning stages; their results revealed that during the first week after learning, CAMKII reactivation is essential for memory consolidation (Wang *et al.* 2003). Furthermore, it was observed that training in an one-trial associative learning task induces expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus 12 h after learning (Bekinschtein *et al.* 2007). Similarly, it has been reported that novel taste learning induces two waves of mTor activation in the gustatory cortex at 15 and 180 min after taste presentation (Belelovsky *et al.* 2009). All these data indicate that several rounds of protein synthesis take place as one of the off-line processes involved in the persistence of memory.

A great amount of evidence indicates that this process could be taking place during sleep, which has been identified as a state that optimizes the consolidation of declarative and non-declarative memories (Smith 2001; Robertson *et al.* 2004; Ellenbogen *et al.* 2006). Particularly, the slow-wave sleep stage has been implicated in sleep-dependent memory consolidation (Stickgold 2005; Walker and Stickgold 2006). In this regard, there are reports of a significant increase in noradrenaline release within prelimbic region of the rat frontal cortex around 2 h after the acquisition of an odor discrimination task (Tronel *et al.* 2004) that has been related to an increment in the *locus coeruleus* activity during slow-wave sleep (Eschenko and Sara 2008). Nevertheless, there is also evidence indicating that information is maintained and processed during post-training wakefulness periods. Simultaneous neural recordings in the macaque neocortex, i.e. posterior parietal cortex, motor cortex, somatosensory cortex and dorsal prefrontal cortex, revealed that cells in all four areas exhibit off-line firings related to the task (sequential reaching behavior), and those cells tended to be coactive afterwards (Hoffman and McNaughton 2002). Accordingly, our data showed a cortical reactivation release of DA and GLU several minutes after the acquisition of taste aversion could be taking part in the off-line processes that maintain long-term memory, but its relation to sleep stages remains to be studied.

Although it remains to be clarified whether several waves of neurotransmitters release are necessary for ensembles of neurons to sustain information while memory consolidates, the present results suggest that long-term memory consolidation depends on dopaminergic and glutamatergic activity during the acquisition and during off-line post-acquisition periods.

## Acknowledgments

We thank Oreste Carbajal for his technical support. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Kioko Guzmán-Ramos at the



Universidad Nacional Autónoma de México with a doctoral fellowship provided by CONACyT. This work was supported by CONACyT 060478 and DGAPA UNAM IN216709-3.

## Supporting Information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article:

**Appendix S1.** Supplementary Materials and methods.

**Figure S1.** Norepinephrine and GABA levels do not change in the IC during the post-acquisition period.

**Figure S2.** Representative photomicrograph of the guide cannula track aiming IC and location of microdialysis membranes. The numbers above indicate mm from bregma.

**Table S1.** Validation data for dopamine, norepinephrine, glutamate and GABA.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

## References

- Alberini C. M., Milekic M. H. and Tronel S. (2006) Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 999–1008.
- Baldwin A. E., Sadeghian K. and Kelley A. E. (2002) Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **22**, 1063–1071.
- Barker L. M. and Smith J. C. (1974) A comparison of taste aversions induced by radiation and lithium chloride in CS-US and US-CS paradigms. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **87**, 644–654.
- Bekinschtein P., Cammarota M., Igaz L. M., Bevilacqua L. R., Izquierdo I. and Medina J. H. (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* **53**, 261–277.
- Belevovsky K., Kaphzan H., Elkobi A. and Rosenblum K. (2009) Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J. Neurosci.* **29**, 7424–7431.
- Berman D. E., Hazvi S., Neduva V. and Dudai Y. (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J. Neurosci.* **20**, 7017–7023.
- Bermudez-Rattoni F. and McGaugh J. L. (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* **549**, 165–170.
- Bermudez-Rattoni F. (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 209–217.
- Bernstein I. L. and Koh M. T. (2007) Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem. Senses* **32**, 99–103.
- Cepeda C., Colwell C. S., Itri J. N., Chandler S. H. and Levine M. S. (1998) Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J. Neurophysiol.* **79**, 82–94.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 755–763.
- Del Arco A. and Mora F. (2001) Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors. *Brain Res. Bull.* **56**, 125–130.
- De la Cruz V., Rodriguez-Ortiz C. J., Balderas I. and Bermudez-Rattoni F. (2008) Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1377–1381.
- Dudai Y. (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 51–86.
- Ellenbogen J. M., Payne J. D. and Stickgold R. (2006) The role of sleep in declarative memory consolidation: passive, permissive, active or none? *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 716–722.
- Eschenko O. and Sara S. J. (2008) Learning-dependent, transient increase of activity in noradrenergic neurons of locus coeruleus during slow wave sleep in the rat: brain stem-cortex interplay for memory consolidation? *Cereb. Cortex* **18**, 2596–2603.
- Eschenko O., Ramadan W., Molle M., Born J. and Sara S. J. (2008) Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn. Mem.* **15**, 222–228.
- Escobar M. L. and Bermudez-Rattoni F. (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* **852**, 208–212.
- Escobar M. L., Chao V. and Bermudez-Rattoni F. (1998) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* **779**, 314–319.
- Escobar M. L., Alcocer I. and Bermudez-Rattoni F. (2002) In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.* **129**, 101–106.
- Fernandez-Ruiz J., Miranda M. I., Bermudez-Rattoni F. and Drucker-Colin R. (1993) Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behav. Neural Biol.* **60**, 189–191.
- Ferreira G., Gutierrez R., De La Cruz V. and Bermudez-Rattoni F. (2002) Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1139–1145.
- Ferreira G., Miranda M. I., De la Cruz V., Rodriguez-Ortiz C. J. and Bermudez-Rattoni F. (2005) Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 2596–2604.
- Gallo M., Roldan G. and Bures J. (1992) Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.* **52**, 91–97.
- Gerrard J. L., Kudrimoti H., McNaughton B. L. and Barnes C. A. (2001) Reactivation of hippocampal ensemble activity patterns in the aging rat. *Behav. Neurosci.* **115**, 1180–1192.
- Gurden H., Takita M. and Jay T. M. (2000) Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *J. Neurosci.* **20**, RC106.
- Gutierrez H., Hernandez-Echeagaray E., Ramirez-Amaya V. and Bermudez-Rattoni F. (1999) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* **89**, 751–758.
- Hallett P. J., Spoelgen R., Hyman B. T., Standaert D. G. and Dunah A. W. (2006) Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA



- receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J. Neurosci.* **26**, 4690–4700.
- Hanamori T., Kunitake T., Kato K. and Kannan H. (1998) Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J. Neurophysiol.* **79**, 2535–2545.
- Hoffman K. L. and McNaughton B. L. (2002) Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. *Science* **297**, 2070–2073.
- Izquierdo L. A., Barros D. M., Vianna M. R., Coitinho A., deDavid e Silva T., Choi H., Moletta B., Medina J. H. and Izquierdo I. (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol. Neurobiol.* **22**, 269–287.
- Jay T. M. (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog. Neurobiol.* **69**, 375–390.
- Katz D. B., Simon S. A. and Nicoledis M. A. (2001) Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J. Neurosci.* **21**, 4478–4489.
- Kauffing J., Veinante P., Pawlowski S. A., Freund-Mercier M. J. and Barrot M. (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* **513**, 597–621.
- Lalumiere R. T., Nguyen L. T. and McGaugh J. L. (2004) Post-training intrasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2804–2810.
- Landers J. P. (1997) *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC Press, U.S.A.
- Lansink C. S., Goltstein P. M., Lankelma J. V., Joosten R. N., McNaughton B. L. and Pennartz C. M. (2008) Preferential reactivation of motivationally relevant information in the ventral striatum. *J. Neurosci.* **28**, 6372–6382.
- Martin K. C., Barad M. and Kandel E. R. (2000) Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 587–592.
- Martinez Jr J. L., Jensen R. A., Messing R. B., Vasquez B. J., Soumireu-Mourat B., Geddes D., Liang K. C. and McGaugh J. L. (1980) Central and peripheral actions of amphetamine on memory storage. *Brain Res.* **182**, 157–166.
- McGaugh J. L. (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 1–28.
- Miranda M. I., Ferreira G., Ramirez-Lugo L. and Bermudez-Rattoni F. (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11417–11422.
- Miranda M. I., Ramirez-Lugo L. and Bermudez-Rattoni F. (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res.* **882**, 230–235.
- Montag-Sallaz M. and Montag D. (2003) Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learn. Mem.* **10**, 99–107.
- Ogawa H., Hasegawa K. and Murayama N. (1992) Difference in taste quality coding between two cortical taste areas, granular and dysgranular insular areas, in rats. *Exp. Brain Res.* **91**, 415–424.
- Ohara P. T., Granato A., Moallem T. M., Wang B. R., Tillet Y. and Jasmin L. (2003) Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J. Neurocytol.* **32**, 131–141.
- Pare D., Collins D. R. and Pelletier J. G. (2002) Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories. *Trends Cogn. Sci.* **6**, 306–314.
- Paxinos G. and Watson C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pennartz C. M., Lee E., Verheul J., Lipa P., Barnes C. A. and McNaughton B. L. (2004) The ventral striatum in off-line processing: ensemble reactivation during sleep and modulation by hippocampal ripples. *J. Neurosci.* **24**, 6446–6456.
- Ramirez-Amaya V., Vazdarjanova A., Mikhael D., Rosi S., Worley P. F. and Barnes C. A. (2005) Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J. Neurosci.* **25**, 1761–1768.
- Ribeiro S., Shi X., Engelhard M. *et al.* (2007) Novel experience induces persistent sleep-dependent plasticity in the cortex but not in the hippocampus. *Front. Neurosci.* **1**, 43–55.
- Robertson E. M., Pascual-Leone A. and Press D. Z. (2004) Awareness modifies the skill-learning benefits of sleep. *Curr. Biol.* **14**, 208–212.
- Roldan G. and Bures J. (1994) Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.* **65**, 213–219.
- Rosenblum K., Meiri N. and Dudai Y. (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav. Neural Biol.* **59**, 49–56.
- Rosenblum K., Berman D. E., Hazvi S., Lamprecht R. and Dudai Y. (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J. Neurosci.* **17**, 5129–5135.
- Rossato J. I., Bevilacqua L. R., Izquierdo I., Medina J. H. and Cammarota M. (2009) Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* **325**, 1017–1020.
- Runyan J. D. and Dash P. K. (2004) Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **82**, 65–70.
- Sakai N. and Yamamoto T. (1999) Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion. *Neurosci. Res.* **35**, 53–61.
- Schotanus S. M. and Chergui K. (2008) NR2A-containing NMDA receptors depress glutamatergic synaptic transmission and evoked-dopamine release in the mouse striatum. *J. Neurochem.* **106**, 1758–1765.
- Schultz W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* **36**, 241–263.
- Shimura T., Suzuki M. and Yamamoto T. (1995) Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Res.* **679**, 221–226.
- Shimizu E., Tang Y. P., Rampon C. and Tsien J. Z. (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* **290**, 1170–1174.
- Smith C. (2001) Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems. *Sleep Med. Rev.* **5**, 491–506.
- Stickgold R. (2005) Sleep-dependent memory consolidation. *Nature* **437**, 1272–1278.
- Tingley W. G., Ehlers M. D., Kameyama K., Doherty C., Ptak J. B., Riley C. T. and Haganir R. L. (1997) Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **272**, 5157–5166.
- Tronel S., Feenstra M. G. and Sara S. J. (2004) Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn. Mem.* **11**, 453–458.
- Tseng K. Y. and O'Donnell P. (2003) Dopamine-glutamate interactions in the control of cell excitability in medial prefrontal cortical pyramidal neurons from adult rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1003**, 476–478.

- Tseng K. Y. and O'Donnell P. (2004) Dopamine–glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J. Neurosci.* **24**, 5131–5139.
- Ungless M. A. (2004) Dopamine: the salient issue. *Trends Neurosci.* **27**, 702–706.
- Walker M. P. and Stickgold R. (2006) Sleep, memory, and plasticity. *Annu. Rev. Psychol.* **57**, 139–166.
- Wang J. and O'Donnell P. (2001) D(1) dopamine receptors potentiate NMDA-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb. Cortex* **11**, 452–462.
- Wang H., Shimizu E., Tang Y. P. *et al.* (2003) Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 4287–4292.
- Wang H., Hu Y. and Tsien J. Z. (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog. Neurobiol.* **79**, 123–135.



**Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in  
taste memory consolidation**

Kioko R. Guzmán-Ramos, Daniel Osorio-Gómez, Perla Moreno Castilla,  
Federico Bermúdez-Rattoni

**SUPPLEMENTAL INFORMATION**

**Supplemental Data**

**Gamma- aminobutyric acid (GABA) and norepinephrine (NE) monitoring.**

Saccharin presentation induced a significant NE ( $F_{2,12}= 7.774$ ,  $p<0.01$ ) but not GABA release within the insular cortex. Such increment could be related to central noradrenergic system activation during attention mechanisms (Robbins 1995, Robbins 1997) like those involved in the new stimuli exposure. It has been reported that *locus coeruleus* (LC) neurons are activated by exposure to novel gustatory stimuli and stressing experiences (Cole *et al.* 1988) and since this noradrenergic nucleus sends direct projections to the IC (Saper 1982) it is possible that the NE increments are part of the mechanisms that allow the animal to focus on relevant or threatening situations such as the ingestion of unknown food. The digestive malaise caused by i.p. LiCl injection also induced a significant increment in NE release that was not seen in GABA monitoring. Interestingly both LiCl and NaCl hypertonic solutions induce similar NE release, indicating an unspecific response to the administration of the solutions. Probably this response is due to the peritoneum irritation. This nociceptive stimulus is processed through the vagus nerve to the NTS which projects directly to the LC (Hassert *et al.* 2004) and therefore the IC response through NE release (Fig. S1). Post-acquisition GABA and NE monitoring of the SAC-LiCl and SAC-NaCl groups showed no

increments of these neurotransmitters, supporting the specificity of the glutamatergic and dopaminergic signals in the memory formation.

**Verification of probes and cannulae placement.** After the experiments were completed, rats were sacrificed with a pentobarbital overdose, and perfused intracardially with saline 0.9%. Brains were removed and stored in paraformaldehyde 4% at 4°C. They were cut in 40 µm coronal slices with a freezing cryostat. Mounted slices were stained with cresyl violet, and the placement of the cannulae was verified by analyzing the slices under the light microscope. All animals with an erroneous cannulae placement were discarded from statistical analysis. Figure S2 presents a microphotograph of the location of the microdialysis probes and cannulae aimed to the IC. In all groups the rats included in the microdialysis and pharmacological analyses had the cannulae and probes within the granular and dysgranular region of the IC. Eleven animals with erroneous guide cannulae placement were not considered for analysis and are not included in the final indicated *n*.

Fig S1.

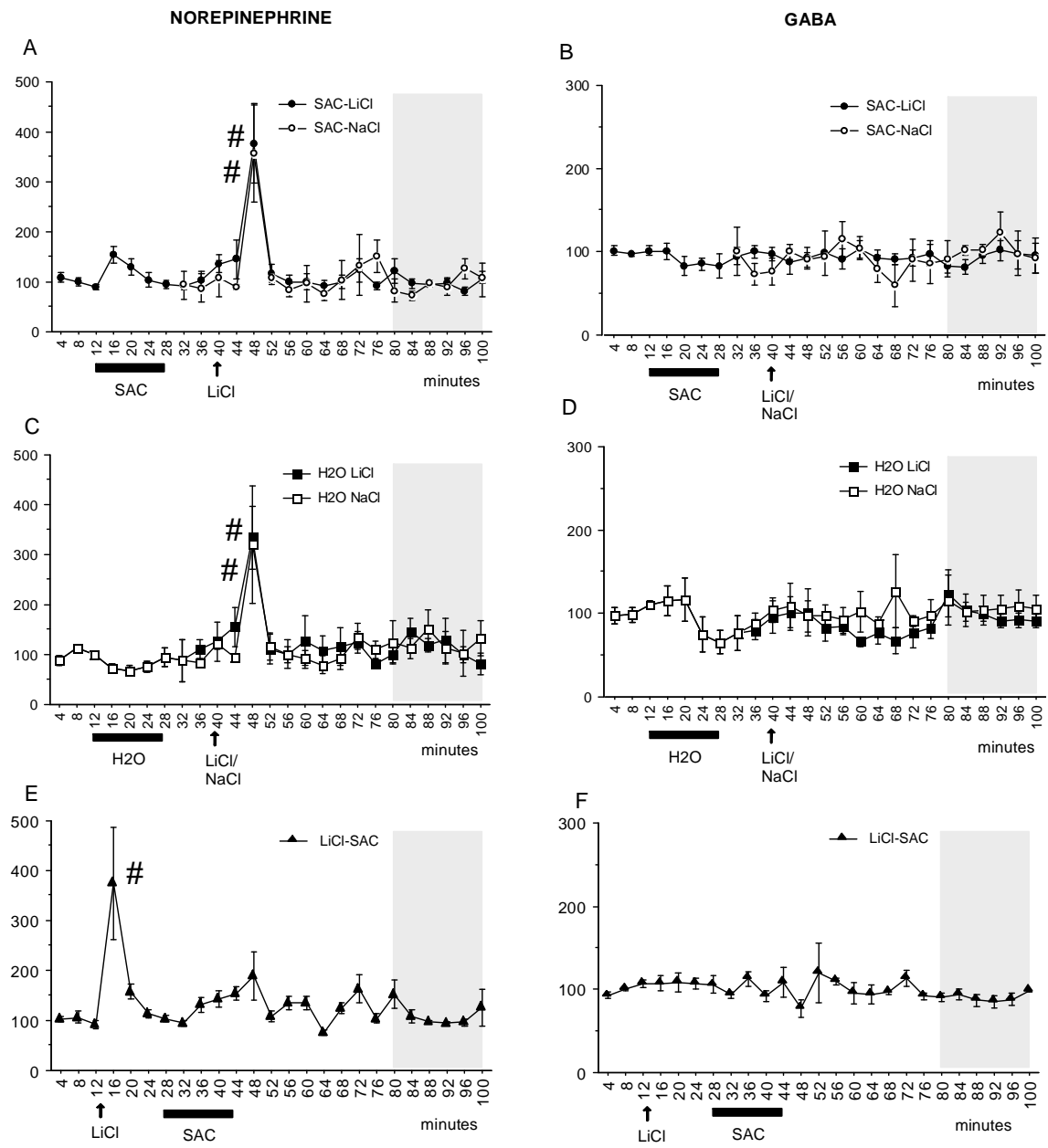
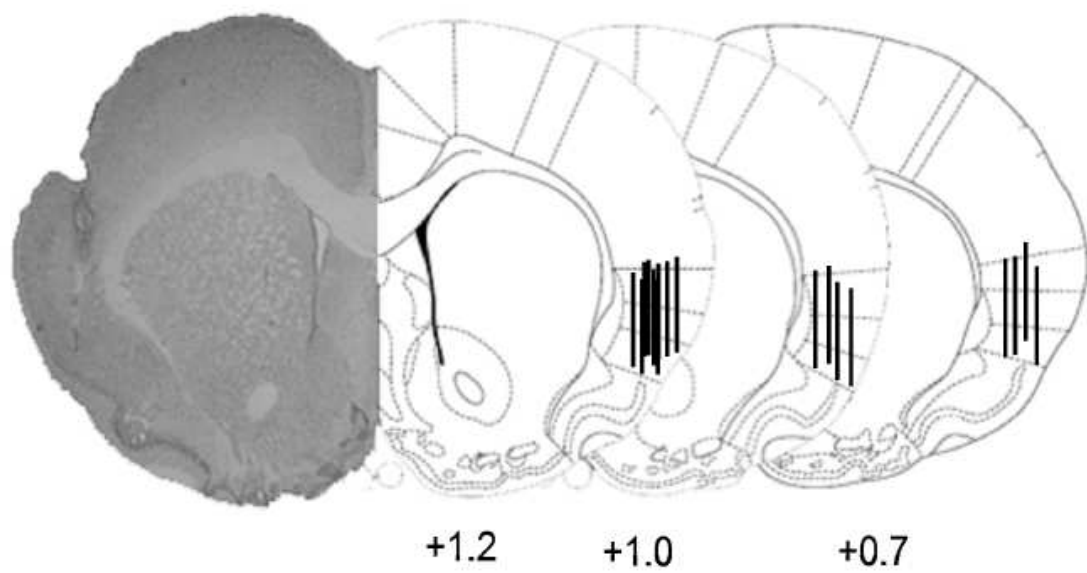


Fig. S2



**Fig S1. Norepinephrine and GABA levels do not change in the IC during the post-acquisition period.** (A) NE monitoring: SAC-LiCl, conditioned group received 0.1% saccharin solution followed by 0.4 M LiCl i.p. injection (7.5 mL/kg); SAC-NaCl, non conditioned group received 0.1% saccharin solution followed by 0.4 M NaCl i.p. injection (7.5 mL/kg); the CS elicited a significant NE increase in both groups and the US elicited a 400% increase in both groups. (B) GABA monitoring in conditioned and non-conditioned groups showed no changes. (C) NE responses of control groups to stimuli: H<sub>2</sub>O-LiCl group received tap water followed by 0.4M LiCl i.p.; H<sub>2</sub>O-NaCl group received tap water followed by 0.4M NaCl i.p; NE levels are increased following both LiCl and NaCl administration and showed no post-acquisition increments. (D) GABA responses to the LiCl and NaCl injection showed changes.(E) Backward conditioning LiCl-SAC, received 0.4M LiCl i.p. and later 0.1% saccharin solution and only showed the NE increase related to the US presentation and no post-acquisition increment was observed. (F) GABA response during the backward conditioning. Graphics expressed as means of %baseline release  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , and \*\* $P < 0.01$  vs control group and #  $p < 0.05$  vs. baseline release.

**Fig. S2 Representative photomicrograph of the guide cannula track aiming IC and location of microdialysis membranes.** The numbers above indicate mm from bregma.

## **Supplemental Experimental Procedures**

### **Capillary electrophoresis analysis.**

#### *Optimization of the derivatization conditions.*

Given the complexity of the biological sample due to the presence of a great number of molecules that are prone to react with the fluorogenic compound, it was necessary to use an analytical method that allowed us to separate, identify and quantify simultaneously Glutamate and dopamine levels in the microdialysis samples. Since one of the great advantages of using capillary electrophoresis as an analytical technique is that it requires nanoliter volumes for injection, it allowed the analysis of small sample volume collected in very short times. Since high sensitivity was required, the most convenient detection method was laser induced fluorescence detection (LIFD). According to the excitation wave length of the argon ion laser the fluorogenic reagent of choice was 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ, Molecular Probes) which react in the presence of cyanide with the primary amine group of the molecules allowing the simultaneous derivatization of catecholamines and aminoacids.

Several studies indicate the use of FQ for the detection of proteins, peptides and aminoacids in different kinds of samples (Asermely *et al.* 1997, Liu *et al.* 2003, Paez & Hernandez 2001). However, there is scarce reference of the FQ use for catecholamines and aminoacids simultaneous analysis in microdialysis samples (Chen *et al.* 2001). For this reason it was necessary to find the optimal derivatization conditions for our particular samples in which different FQ (100, 200 and 300 nmol) and KCN concentrations, sample quantities (2, 4, 8  $\mu$ L) and microdialysis flow rates (0.5, 1  $\mu$ L/min) were tried. Increasing FQ increased derivatization efficiency, but the lowest suggested FQ concentration allowed us to reach optimal detection limits (see below).

*Optimization of the separation.* The derivatization products are hydrophobic molecules with very similar electrophoretic mobilities, so we used a capillary electrophoresis modality known as Micellar Electrokinetic Chromatography (MECK), based in chromatographic and electrophoretic principles which allows to separate ionic and neutral compounds depending on their electrophoretic mobilities and their partition between a mobile aqueous phase and other semi-stationary composed of micelles (Terabe 2008). Among the parameters that influence the resolution in MECK are surfactant kind and concentration (sodium dodecyl sulphate or sodium deoxycholate) 25 or 35 mM; also type and proportion of organic modifier greatly affect partition coefficient of the compounds of interest (methanol or acetonitrile). The optimization was initially performed with 35 mM borate buffer at voltage of 20 kV and a temperature of 25°C. The pH was varied between 9.3 and 9.7 and it was found that a pH of 9.6 was optimal for the separation of catecholamines and aminoacids, including dopamine, norepinephrine, glutamate and GABA. However, the run buffer content that had a greater impact in these compounds resolution was methanol proportion varying from 13.5-15% v/v that allowed us to increase migration window and avoid overlapping of the peaks of interest with interfering peaks. Instrumental parameters such as capillary temperature and applied voltage were also optimized.

The procedure for microdialysis samples analysis was derivatization with 6  $\mu$ L of 16.67 M 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ, Molecular Probes) in the presence of 2  $\mu$ L of KCN 25 mM in 10 mM borate buffer (pH 9.2) and 1  $\mu$ L of internal standard (0.075 mM O-methyl-L-threonine). The mixture was allowed to react in the dark at 65°C for 15 min. Separation and analysis was conducted in a Capillary Electrophoresis system (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System) with laser-induced fluorescence (LIF) detection, light at 488 nm from an argon ion laser was

used to excite the FQ-labeled analytes. The separation of compounds was based on a micellar electrokinetic chromatography (MEKC) buffer system that included 35 mM borates, sodium dodecylsulphate (SDS) 25mM, 13% methanol HPLC grade, final pH 9.6. The samples were injected hydro-dynamically at 0.5 psi for 5 s in a 75  $\mu$ m i.d. capillary (Beckman Coulter); then the separation was performed at 25 kV. After each run the capillary was flushed with 0.1M NaOH, water and running buffer. The glutamate and dopamine peaks were identified by matching the migration pattern with those in a spiked sample and corrected by relating the area under the curve (AUC) of the unknown sample with the AUC of the internal standard. Data were analyzed using Karat System Gold generating a calibration curve of six points (see supplemental data). All results were converted into percentage of baseline release ( $\% \text{ BL} = \text{analyte concentration} * 100 / \text{mean of the three first samples}$ ).

Some validation parameters such as linearity, precision and limit of detection were determined for dopamine, norepinephrine, glutamate and GABA. The results are shown in Table S1.



Table S1

Validation data for dopamine, norepinephrine, glutamate and GABA.

Parameter	Estimated value
<i>Repeatability (n=6)</i>	
<i>Relative migration time<sup>a</sup></i>	Dopamine RSD= 1.96%
	Norepinephrine RSD= 0.74%
	Glutamate RSD= 0.71%
	GABA RSD= 1.03%
<i>Corrected peak area<sup>b</sup></i>	Dopamine RSD= 4.3%
	Norepinephrine RSD= 9.2%
	Glutamate RSD= 5.8%
	GABA RSD= 3.5%
<i>Linearity (Number of concentrations for each compound =6)</i>	
Dopamine: 0.1-10 nM	$R^2=0.9928$
Norepinephrine: 0.1-10 nM	$R^2=0.9980$
Glutamate: 0.01-5 $\mu$ M	$R^2=0.9984$
GABA: 0.01-5 $\mu$ M	$R^2=0.9962$
Aspartate: 0.01-5 $\mu$ M	$R^2=0.9973$
<i>Limit of detection</i>	
Dopamine	1 nM
Norepinephrine	1 nM
Glutamate	0.010 $\mu$ M
GABA	0.001 $\mu$ M

a Relative migration time (neurotransmitter/IS). IS= 0.075 mM O-methyl-L-treonine as Internal Standard.

b Corrected peak area (neurotransmitter/IS)

RSD= Relative Standard deviation

## Supplemental References

- Asermely, K. E., Broomfield, C. A., Nowakowski, J., Courtney, B. C. and Adler, M. (1997) Identification of a recombinant synaptobrevin-thioredoxin fusion protein by capillary zone electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **695**, 67-75.
- Cole, B. J., Robbins, T. W. and Everitt, B. J. (1988) Lesions of the dorsal noradrenergic bundle simultaneously enhance and reduce responsivity to novelty in a food preference test. *Brain Res.* **472**, 325-349.
- Chen, Z., Wu, J., Baker, G. B., Parent, M. and Dovichi, N. J. (2001) Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. *J. Chromatogr. A* **914**, 293-298.
- Hassert, D. L., Miyashita, T. and Williams, C. L. (2004) The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.* **118**, 79-88.
- Liu, X., Yang, L. X. and Lu, Y. T. (2003) Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, **998**, 213-219.
- Paez, X. and Hernandez, L. (2001) Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**, 273-289.
- Robbins, T., Everitt, BJ (1995) *Central norepinephrine neurons and behavior: Psychopharmacology-The fourth generation of progress*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Robbins, T. W. (1997) Arousal systems and attentional processes. *Biol. Psychol.* **45**, 57-71.
- Saper, C. B. (1982) Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J. Comp Neurol.* **210**, 163-173.
- Terabe, S. (2008) Micellar electrokinetic chromatography for high-performance analytical separation. *Chem. Rec.* **8**, 291-301.