



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS
DURANTE EL APRENDIZAJE AVERSIVO AL OLOR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ FELIPE ESQUIVELZETA RABELL

Tutor principal: Dr. Gabriel Roldán Roldán. Facultad de Medicina, UNAM

Comité tutor:

Dra. Robyn Elizabeth Hudson. Instituto de
Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Oscar Próspero García. Facultad de Medicina,
UNAM.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ESQUIVELZETA RABELL JOSÉ FELIPE** con número de cuenta **301501554** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS DURANTE EL APRENDIZAJE AVERSIVO AL OLOR"** realizada bajo la dirección del DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN:

Presidente:	DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
Vocal:	DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ
Secretario:	DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON
Suplente:	DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
Suplente:	DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de mayo de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM.

Al CONACYT por la beca para realizar mis estudios de Maestría (CVU 385004/ Becario 255118).

A los miembros de mi comité la Dra. Robyn Hudson y el Dr. Oscar Próspero.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Gabriel Roldán por recibirme en su laboratorio, motivarme cuando era necesario, darme libertad creativa, apoyarme constantemente y enseñarme con su vivo ejemplo que existen mejores formas de tutoría y de hacer ciencia.

A Robyn Hudson por su incondicional apoyo a lo largo de mi formación y su amistad. A su laboratorio por la retroalimentación en los seminarios y en especial a Marcos Rosetti por sus clases y revisiones a este trabajo.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, la Dra. Magdalena Crespo y la Dra. Leticia Verdugo por sus comentarios, su comprensión, su apoyo y por permitirme continuar mi camino dentro de la neurociencia.

A Renan, Claudio, Bety, Olga, Ivan, Denisse, Celia, Marco, Alejandro y Erika por saber escuchar y apoyarme cuando era necesario para no perder de vista el gusto por la ciencia a pesar de los constantes obstáculos que pude superar gracias a ustedes.

A Estela por estar siempre, escuchar, discutir, corregirme, motivarme, acompañarme y ser una excelente amiga.

A la Dra. Beatriz Gómez (Bety) por aterrizarme con una dosis de realidad, motivarme y enseñarme que nuestra generación puede generar el cambio necesario en el sistema científico mexicano.

A Miguel Tapia porque a pesar de la breve ausencia continuó siendo un gran ejemplo de científico y un gran amigo.

Al Dr. Jorge Tovar por todas las pláticas, discusiones, bromas y compañía durante mi Maestría.

A mi familia y en especial a mi mamá por apoyarme, hacerme crecer, acompañarme y motivarme con sus vidas y carreras.

Dedicada a Juan

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
Aprendizaje y memoria: conceptos básicos	10
<i>Aprendizaje</i>	<i>10</i>
<i>Memoria</i>	<i>11</i>
<i>Evocación</i>	<i>12</i>
<i>Ejecución</i>	<i>12</i>
<i>Etapas de la formación de la memoria</i>	<i>13</i>
Aprendizaje alimenticio	14
Aprendizaje toxicofóbico	16
Aprendizaje Aversivo al Olor (AAO).....	17
Relevancia del modelo de estudio	22
Sustrato anatómico y funcional del AAO.....	23
<i>Vía emética.....</i>	<i>23</i>
<i>Vía olfativa.....</i>	<i>29</i>
Vías de integración del AAO	39
Sistema colinérgico.....	41
<i>Historia</i>	<i>41</i>
<i>Receptores colinérgicos</i>	<i>41</i>
<i>Sistemas colinérgicos del Sistema Nervioso Central y su inervación a</i> <i>estructuras de la vía olfativa.....</i>	<i>43</i>
Etapas del aprendizaje y Acetilcolina	45
Aprendizaje olfativo y Acetilcolina	47
II. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN	49
III. HIPOTESIS	49
IV. MÉTODO	49
Animales.....	49
Dispositivos de Pruebas Conductuales	50
Condicionamiento	50
Análisis de datos.....	51
V. RESULTADOS	51
FASE 1 Efecto del bloqueo sistémico de los receptores muscarínicos sobre las distintas etapas del AAO.....	52
Experimento 2 El efecto de la administración de escopolamina en la adquisición no es un efecto dependiente de estado.....	56
FASE 2 Contribución del bloqueo periférico de los receptores muscarínicos en el AAO	57

<i>Experimento 3.1 Existe una tendencia a desaparecer el efecto amnésico provocado por la ESC (antagonista) al inyectar carbacol (agonista).....</i>	<i>57</i>
<i>Experimento 3.2.1 y 3.2.2 La mESC produce el mismo efecto amnésico que la ESC durante la adquisición pero no durante la evocación.....</i>	<i>58</i>
FASE 3 Efecto del bloqueo sistémico de los receptores muscarínicos M1 sobre la adquisición y evocación del AAO	59
<i>Experimento 4.1 y 4.2 El antagonismo de los receptores M1 no produce ningún efecto sobre la adquisición del AAO.</i>	<i>60</i>
<i>Experimento 4.3 El antagonismo de los receptores muscarínicos centrales durante la memoria a corto plazo produce un efecto amnésico significativo en la memoria a largo plazo.....</i>	<i>61</i>
<i>Experimento 4.4 El antagonismo de los receptores muscarínicos M1 centrales tiene un efecto amnésico en la memoria a largo plazo</i>	<i>62</i>
VI. DISCUSIÓN.....	63
Los receptores muscarínicos participan en la adquisición y evocación del AAO.	63
La asociación con el estímulo aversivo es independiente de la actividad muscarínica en el AAO.	66
Los receptores muscarínicos no participan en la consolidación del AAO.	67
El efecto durante la adquisición no es dependiente de estado	68
El antagonismo de los receptores muscarínicos fuera del sistema nervioso central provoca un efecto amnésico durante la adquisición	69
Los efectos en la evocación a corto y largo plazo se deben a los receptores M1 principalmente.....	70
VII. CONCLUSIONES.....	71
ANEXO 1 Tablas de expresión de AChT y vesiculador colinérgico en el cerebro	73
ANEXO 2 Procedimiento conductual para establecer el aprendizaje aversivo al olor.....	75
ANEXO 3 Efecto de los antagonistas muscarínicos en el consumo de agua y motricidad	76
VIII. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de formación de la memoria	13
Figura 2. Modelo propuesto por Kyriazakis <i>et al.</i> (1999) relacionando el aprendizaje y el estado interno del animal con su conducta	15
Figura 3. Esquema del AAO	22
Figura 4. Diagrama de las interconexiones locales entre el NTS, el DMX y el AP	27
Figura 5. Interconexiones aferentes y eferentes a gran escala del AP, NTS y DMX	28
Figura 6. Sistemas olfativos accesorio y principal	30
Figura 7. Esquema de los elementos neuronales del BO	32
Figura 8. Esquema de la corteza piriforme	37
Figura 9. Esquema de la corteza entorrinal	38
Figura 10. Vías de integración del AAO	40
Figura 11. Vías colinérgicas centrales en el cerebro de rata	43
Figura 12. Esquema que muestra los diferentes momentos de administración	51
Figura 13. Efecto del AAO sobre la preferencia del olor a almendras	52
Figura 14. Efecto de la ESC sobre la Adquisición	53
Figura 15. Efecto de la ESC sobre la Asociación	54
Figura 16. Efecto de la ESC sobre la Consolidación	54
Figura 17. Efecto de la ESC sobre la Evocación	55
Figura 18. Efecto de la ESC a las 4 horas con evocación a las 4 y 48 horas	55
Figura 19. ESC y aprendizaje dependiente de estado	56
Figura 20. Efecto de la ESC y distintas dosis de carbacol sobre la adquisición (agonismo/antagonismo)	58
Figura 21. Efecto de la mESC sobre la adquisición	59
Figura 22. Efecto de la mESC sobre la evocación	59
Figura 23. Efecto del BIP sobre la adquisición	60
Figura 24. Efecto de la PIR sobre la adquisición	61
Figura 25. Efecto de los antagonistas M1 sobre la evocación a corto plazo	62
Figura 26. Efecto de los antagonistas M1 sobre la evocación a largo plazo	63

ABREVIATURAS

AAO	Aprendizaje aversivo al olor
AAS	Aprendizaje aversivo al sabor
ACh	Acetilcolina
AON	Núcleo anterior olfativo
AP	Área postrema
BIP	Biperideno
BLA	Amígdala basolateral
BO	Bulbo olfatorio
CEL	Corteza entorrinal lateral
CEM	Corteza entorrinal medial
ChAT	Cholin acetil transferasa
DMX	Núcleo motor dorsal del vago o núcleo motor dorsovagal
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
EPL	Capa plexiforme externa
ESC	Escopolamina
GRC	Células granulares
IP	Índice de preferencia
IPL	Capa plexiforme interna
JGC	Neuronas juxtglomerulares
LiCl	Cloruro de litio
LOT	Tracto lateral olfativo
IPBN	Núcleo parabraquial lateral
MCP	Memoria a corto plazo
mESC	Metil escopolamina
MLP	Memoria a largo plazo
NHDB	Núcleo del brazo horizontal de la banda diagonal de Broca
NTS	Núcleo del tracto solitario
OA	Olor aversivo
OI	Olor inócuo
OSN	Neuronas sensoriales olfativas
PGC	Neuronas periglomerulares
PIR	Pirenzepina
PVN	Núcleo paraventricular
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada

RESUMEN

Reconocer y evitar alimentos tóxicos o en descomposición es una conducta básica presente en muchas especies tanto de vertebrados como de invertebrados. Dicha respuesta depende del aprendizaje asociativo entre las características del alimento, principalmente el olor y el sabor, y las consecuencias nocivas de su ingesta, como el malestar visceral. A ese tipo de aprendizaje se le conoce como condicionamiento toxicofóbico y se han descrito dos tipos: el aprendizaje aversivo al olor (AAO) y al sabor (AAS).

Desde que fue descrito por García *et al.* en 1955, el AAS ha sido objeto de una intensa investigación lo cual ha permitido un gran avance en su comprensión, sin embargo esto ha relegado el estudio del componente olfativo, es decir del AAO. Numerosas evidencias indican que la acetilcolina (ACh) a través de sus receptores muscarínicos participa de manera fundamental en el AAS. Sin embargo, aun se desconoce el papel de la ACh en el AAO.

En el presente estudio realizamos una administración sistémica de los antagonistas muscarínicos no selectivos, escopolamina y metil escopolamina (la cual no cruza la barrera hematoencefálica), durante las distintas etapas del condicionamiento (adquisición, asociación, consolidación y evocación a corto y largo plazo) para poder determinar si la ACh participa en el AAO y en qué momento lo hace. Posteriormente, exploramos la participación de los receptores M1 mediante la administración de los antagonistas selectivos biperideno y pirenepina (que no cruza la barrera hematoencefálica).

Nuestros hallazgos indican que la inyección de escopolamina intraperitoneal produce un efecto dosis-respuesta durante la adquisición y evocación (tanto a corto como largo plazo), pero no tiene ningún efecto entre estímulos (asociación) después del estímulo condicionado (consolidación). La inyección de metil escopolamina tiene el mismo efecto sobre la adquisición y ningún efecto durante la evocación; y finalmente, al inyectar biperideno y pirenzepina pudimos reproducir los efectos durante la adquisición, pero solamente el biperideno tuvo un efecto significativo sobre la evocación a largo plazo.

De lo anterior podemos concluir que los receptores muscarínicos centrales en áreas que carecen de la barrera hematoencefálica (área postrema) son responsables del efecto amnésico observado durante la adquisición y que el efecto durante la evocación se debe al antagonismo de receptores muscarínicos centrales. Adicionalmente, los efectos observados se deben principalmente al antagonismo de los receptores muscarínicos M1.

Por lo tanto, la neurotransmisión colinérgica parece estar involucrada durante diferentes etapas del AAO y en diferentes niveles de la vía olfativa y la vía visceral.

ABSTRACT

The recognition and avoidance of toxic food is a basic behavior present in many vertebrate and invertebrate species. Two experimental models for this type of toxicophobic learning have been implemented: conditioned taste aversion (CTA) and conditioned odor aversion (COA). However, while CTA has been the object of numerous studies since its discovery in 1955, COA is less understood.

We analyzed the role of acetylcholine in COA by evaluating the effect of systemic administration of the muscarinic non-selective antagonists scopolamine and methyl-scopolamine (which does not cross the blood-brain barrier) in different stages of the learning process (acquisition, consolidation, short and long term memory retrieval). Then we explore the participation of the M1 muscarinic receptors by means of the selective M1 antagonists biperiden and pirenzepine (which does not cross the blood-brain barrier). We used male Wistar rats deprived of water and submitted to a COA protocol during 5 consecutive days. On the third day an orthonasal almond odor was paired with an intraperitoneal injection of LiCl (0.15 M, 2% b.w.) in order to induce an association between the olfactory stimulus and visceral malaise.

Our results show that scopolamine induced a dose-response impairment of acquisition and memory retrieval, but not of memory consolidation or stimulus association. Interestingly, methyl-scopolamine had the same effect but only during acquisition. Biperiden and pirenzepine reproduces the amnesic effects of the non-selective antagonists, but only biperiden could reproduce the effect on evocation.

We conclude that central muscarinic receptor antagonism at areas lacking the blood-brain barrier (i.e., area postrema) is responsible for the amnesic effect observed during acquisition and that the effect on retrieval is due to the antagonism of central muscarinic receptors. Moreover, this effect may be mainly due to the antagonism of the M1 muscarinic receptors. Thus, acetylcholine neurotransmission appears to be involved in different stages of COA and at different levels of the olfactory and visceral pathways.

I. INTRODUCCIÓN

En términos biológicos, consideramos que los seres vivos son exitosos en la medida de su adecuación, es decir, mayor tiempo de supervivencia y mayor tasa de reproducción (Nuñez-Farfán y Eguiarte 1999). En el caso de los animales, la adecuación implica un mayor número de crías y una mejor oportunidad de mantener sus genes en la población y perpetuarse. Esto depende de diferentes factores, entre los que reconocemos: la genética del individuo, el ambiente y el azar. A su vez, de la interacción entre los genes y el ambiente, resultan las capacidades del individuo, entre las cuales podemos destacar el aprendizaje y la memoria como procesos imprescindibles tanto para la supervivencia como para la reproducción, ya que son necesarios en la adquisición de patrones conductuales complejos como el comportamiento alimenticio, el social y el sexual-reproductivo, entre muchos otros, así como en la modificación de dichas conductas frente a un entorno cambiante.

Aprendizaje y memoria: conceptos básicos

Desde el momento en que nacemos, e incluso antes, los estímulos sensoriales modifican nuestro sistema nervioso e influyen en nuestro comportamiento. Dichas modificaciones se suceden durante todo el curso de nuestra vida y nos permiten aprender, recordar y responder apropiadamente ante situaciones que hemos experimentado con anterioridad (Squire 1986; Jerusalinsky *et al.* 1997). Es fácil reconocer que podemos adquirir conocimientos y recordar experiencias con características muy variadas, por lo cual se han desarrollado sistemas de clasificación del aprendizaje y la memoria basados en diferentes criterios (Squire 1986; Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá 2001).

A continuación se presentan las definiciones y características de ciertos procesos de aprendizaje y memoria que se encuentran directamente relacionados a esta investigación.

Aprendizaje

Aunque tradicionalmente el aprendizaje ha sido considerado como una de las funciones nerviosas superiores en los mamíferos (Ambroggi *et al.* 1999), también existen numerosos ejemplos de aprendizaje en animales inferiores, incluyendo organismos unicelulares (Eisenstein 1997). El aprendizaje consiste en adquirir información nueva sobre el medio externo o interno y su codificación en el sistema nervioso (Squire 1986; Ambroggi *et al.*

1999; Kandel 2001; Bouton y Moody 2004), lo que en determinadas circunstancias puede producir modificaciones conductuales transitorias o permanentes (Ambrogi *et al.* 1999; Davis 2005).

Las clasificaciones de aprendizaje más utilizadas son: impronta; aprendizaje no asociativo (habitación y sensibilización); y aprendizaje asociativo (condicionamiento clásico, también llamado pavloviano en honor a Iván Pavlov –el famoso investigador que lo describió por primera vez– y condicionamiento operante, también llamado instrumental –utilizado y descrito inicialmente por el psicólogo Edward Lee Thorndike).

Por corresponder al modelo utilizado en nuestra investigación, este trabajo ahondará exclusivamente en el aprendizaje asociativo. En el aprendizaje asociativo el sujeto relaciona dos estímulos dependiendo de su contigüidad temporal y su contingencia. Se conocen dos tipos generales: el condicionamiento operante y el condicionamiento clásico. En el operante, una conducta inicialmente espontánea del sujeto es seguida de una consecuencia que incrementa o disminuye la probabilidad de repetición de la conducta por parte del sujeto. Existen variantes del modelo general operante, sin embargo su descripción escapa a los objetivos de este trabajo (para una descripción más detallada ver Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá 2001).

En el condicionamiento clásico un estímulo irrelevante para el sujeto es seguido de un estímulo intrínsecamente importante que ocasiona cambios biológicos y conductuales por sí mismo. Como consecuencia, la posterior presentación del estímulo irrelevante desencadena la conducta que originalmente sólo el segundo estímulo podía provocar (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá 2001).

Memoria

Se refiere a los cambios estructurales y funcionales (plasticidad) del sistema nervioso que codifican lo aprendido. Se utilizan como sinónimos los términos *trazo*, *huella* o *engrama* (Squire 1986; Woolf 1998).

En cuanto a la clasificación de la memoria, según su contenido, se identifican dos tipos en general: a) explícita (también llamada declarativa), concerniente al conocimiento y recuerdo consciente, por ejemplo de eventos ocurridos. Este tipo de memoria depende de la integridad del lóbulo temporal, hipocampo y algunas regiones del diencefalo; y b) implícita

(no declarativa o de procedimiento), concerniente al conocimiento y recuerdo inconsciente. Este tipo de memoria se clasifica en cuatro tipos: habilidades y hábitos, “priming”, aprendizajes asociativos y aprendizajes no asociativos. No dependen del lóbulo temporal y sí de estructuras como el cuerpo estriado, la corteza motora, la amígdala, el cerebelo y vías reflejas (Squire 1986; Bailey *et al.* 1996; Albright *et al.* 2000; Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá 2001; Barco *et al.* 2006).

Según la permanencia temporal de la memoria se puede clasificar en: a) memoria de corto plazo (MCP), cuya duración varía de unos pocos segundos a unas cuantas horas, y b) memoria de largo plazo (MLP), que puede durar varios días o incluso el resto de la vida del sujeto, aunque desde el punto de vista de la neurobiología celular se considera que 24 horas es suficiente tiempo para consolidarla (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá 2001). El proceso de consolidación consiste básicamente en la expresión genética diferencial que provoca un incremento en la síntesis de proteínas y esto a su vez deriva en el desarrollo de nuevas conexiones sinápticas o la remodelación de las existentes, lo cual induce que la MCP se establezca en MLP (Bailey *et al.* 1996).

Otra forma de clasificación corresponde al sistema sensorial involucrado. De esta manera, tanto en libros como en artículos científicos encontramos los términos: memoria visual, memoria auditiva, memoria gustativa, memoria olfativa, etc.

Evocación

Involucra la reactivación de la memoria que yace latente (Cammarota *et al.* 2004). Depende de la correspondencia entre las condiciones presentes durante el aprendizaje y las condiciones presentes durante la prueba de evocación. Para el caso del aprendizaje asociativo, el estímulo condicionado activa la representación del estímulo incondicionado (Bouton y Moody 2004; Cammarota *et al.* 2004).

Ejecución

Es la manifestación conductual de los cambios en el sistema nervioso a consecuencia del aprendizaje y en el ámbito de la investigación, se utiliza como un indicador para medir el mismo. Debemos tener en cuenta que cuando evaluamos experimentalmente el aprendizaje de un sujeto, evaluamos su ejecución, y lo que hace puede no corresponder exactamente a

lo que “sabe”. Debe quedar clara la diferencia entre la memoria – aquellos cambios físicos que hayan ocurrido en el cerebro como resultado del aprendizaje – y la ejecución – la manifestación de tales cambios en la conducta del sujeto (Bouton y Moody 2004).

Etapas de la formación de la memoria

En general se acepta que los procesos de formación de memoria siguen una secuencia lineal (ver figura 1):

1. Adquisición y codificación de la información. Corresponde a la transducción sensorial de los estímulos y su codificación en una MCP en el sistema nervioso. Se ha propuesto que para que un estímulo percibido logre generar MCP se requiere la intervención adecuada de los sistemas de atención (Woolf 1998; Salamon 2002).
2. Consolidación y almacenamiento de la MLP. Corresponde a una serie de eventos a nivel celular y de circuitos neuronales que tardan un tiempo variable según la información adquirida. Algunos autores la refieren como “elaboración” de la información (Bailey *et al.* 1996; Nader *et al.* 2000; Salamon 2002).
3. Evocación de la memoria. Corresponde a la reactivación de la memoria, según sea requerida (Woolf 1998; Ambrogi *et al.* 1999; Ambrogi Lorenzini *et al.* 1999; Salamon 2002; Cammarota *et al.* 2004).

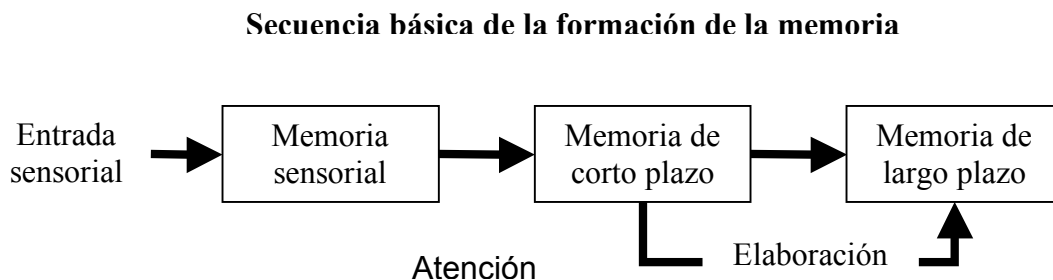


Figura 1. Modelo de formación de memorias de Atkinson y Shiffrin. Tomado de Salamon (2002).

El procesamiento sensorial es actualizado cada 150–700 milisegundos, y debido a ello casi toda codificación sensorial se pierde en fracciones de segundo. Esta memoria sensorial es la más inmediata posterior al estímulo (Woolf 1998). Una vez que la información ingresa al sistema nervioso por medio de los sentidos (auditivo, visual, etc.) es retenida hasta que por medio de diversos mecanismos de atención se mantienen en la MCP (Salamon 2002). Se ha

propuesto que sólo aquellos estímulos que activan dichos procesos de atención son capaces de pasar a la codificación de MCP (Woolf 1998). La MCP puede durar desde segundos hasta unas cuantas horas. Para el caso de memorias de tipo declarativas, se propone un rango de duración de 4 a 6 horas contadas a partir del momento de la adquisición de la información (Cammarota *et al.* 2004). En un tipo de aprendizaje asociativo conocido como aprendizaje de aversión gustativa, Houpt y Berlin (1999) describieron que la MCP, definida por su independencia de síntesis de proteínas, dura hasta 6 horas, con un tiempo de transición a MLP correspondiente a la fase de consolidación, de las 4.5 a las 6 horas posteriores al condicionamiento. Una vez que la MCP llega a la fase de consolidación, se convierte en MLP, que puede durar días, meses, años, e incluso el resto de la vida (Squire 1986; Bailey *et al.* 1996; Woolf 1998; Ambrogio Lorenzini *et al.* 1999; Albright *et al.* 2000). Para diferentes aprendizajes varía el tiempo en que la información pasa de MCP a MLP (Woolf 1998).

El término consolidación se ha utilizado para referirse a dos fenómenos: el primero tiene que ver con la cascada de eventos moleculares que modifican la comunicación a nivel sináptico, dura unas cuantas horas post entrenamiento y es conocido como consolidación molecular; el segundo se refiere a la transferencia de información de una región (el hipocampo) a otra (la neocorteza), que constituirá el almacén permanente de la MLP (Litvin y Anokhin 2000; Nader *et al.* 2000). Este concepto también recibe el nombre de teoría de transferencia (Nader *et al.* 2000). El tiempo que dura la transferencia puede variar. Se han encontrado evidencias que sugieren que ciertas memorias se transfieren durante dos semanas en roedores, doce semanas en monos y varios años en humanos (Litvin y Anokhin 2000).

Aprendizaje alimenticio

El aprendizaje y la memoria son también indispensables para la supervivencia de los individuos en distintos componentes de la conducta alimenticia (Jan Bures 1998). Resulta evidente que todos los organismos requerimos del consumo de alimentos para mantener nuestra economía fisiológica. En condiciones naturales, tenemos acceso a diversos alimentos cuya ingesta puede beneficiarnos o perjudicarnos. Así, para muchas especies la selección de su comida y la formación de hábitos alimenticios a partir de dicha selección es

de gran importancia.

La selección de alimentos está determinada por varios factores de tipo ecológico (p.ej. la disponibilidad de los alimentos y el costo energético para obtenerlos); predisposiciones innatas (p.ej. en especies como la rata y el humano hay una marcada preferencia por lo dulce y aversión por lo amargo, así como una tendencia general de rechazo por alimentos desconocidos llamada “neofobia”); el estado interno del animal (p.ej. crecimiento, gestación, enfermedad, etc., que a su vez determinan variables como la temperatura corporal, niveles hormonales, reservas de lípidos y proteínas); y la experiencia, es decir, el aprendizaje (Lucas y Sclafani 1995; Kyriazakis *et al.* 1999). Kyriazakis *et al.* (1999) han propuesto un modelo que relaciona el aprendizaje con el estado interno del animal y el consecuente comportamiento alimenticio que da cuenta de lo anterior (figura 2).

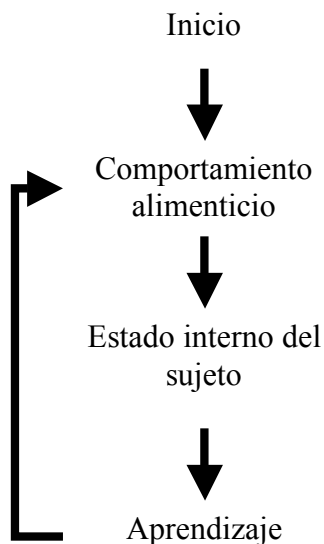


Figura 2. Modelo propuesto por Kyriazakis *et al.* (1999) relacionando el aprendizaje y el estado interno del animal con su conducta alimenticia. La secuencia propuesta se repetiría tantas veces como fuera requerido en la vida del animal.

El aprendizaje es el mecanismo que permite mayor adaptabilidad ante los cambios temporales y espaciales del ambiente alimenticio (Kyriazakis *et al.* 1999); ocurre al asociarse las características organolépticas del alimento (gusto, olor, textura, color) con sus propiedades nutricionales (detectadas posteriormente a su ingestión). Dependiendo de la especie, las características organolépticas pueden ser más o menos efectivas que otras para lograr un buen condicionamiento. En los mamíferos es más importante el sabor (combinación de olor y gusto) y en las aves aparentemente es el color (Kyriazakis *et al.* 1999; Forbes 2001).

Diversos animales como la rata y el ser humano refinan sus preferencias al asociar los sabores de alimentos específicos con las consecuencias postingestivas (Lucas y Sclafani 1995). Si la consecuencia de la ingestión es benéfica (p.ej. saciedad, aporte nutricional) o perjudicial (p.ej. intoxicación, malestar visceral) se producen preferencias o aversiones, respectivamente, condicionadas por el sabor (Lucas y Sclafani 1995; Kyriazakis *et al.* 1999; Forbes 2001).

Si bien existen algunas predisposiciones innatas para ciertos sabores, éstas parecen ser pocas y relativamente débiles: en neonatos de rata y humano se ha visto aceptación por lo dulce y lo moderadamente salado; rechazo hacia lo amargo y lo ácido, así como una tendencia general de rechazo hacia sabores desconocidos (neofobia) (Myers y Sclafani 2006); por otro lado, sujetos adultos demuestran un amplio rango de preferencias y aversiones por una gran variedad de alimentos y sabores, atribuible a los efectos del aprendizaje (Myers y Sclafani 2006). En ratas es posible convertir un sabor “naturalmente” aversivo (ácido cítrico) en preferido, condicionándolo con un estímulo nutricional positivo (infusión intragástrica de nutrientes como glucosa, aceite de maíz u otros) (Sclafani 1997). En cerdos se consigue condicionar un sabor completamente desagradable (amargo) con relativa facilidad (Forbes 2001).

Aprendizaje toxicofóbico

Cuando las consecuencias de la ingesta son desfavorables, tras su recuperación, los animales desarrollan una aversión específica al alimento ingerido, lo que se conoce como condicionamiento toxicofóbico que es un fenómeno natural conservado en casi todas las especies animales desde insectos, e incluso en nemátodos, hasta primates (Lucas y Sclafani 1995; Forbes 2001; Scalera 2002; Desgranges *et al.* 2008). En el aprendizaje toxicofóbico las propiedades organolépticas del alimento (estímulo condicionado, EC) se asocian con las consecuencias viscerales nocivas de su ingesta (estímulo incondicionado, EI) (Chapuis *et al.* 2007). Es una forma de aprendizaje asociativo que pertenece a la categoría de memoria no declarativa o implícita y es crucial para la supervivencia de los individuos, puesto que implica diferenciar los alimentos inocuos de aquellos que son tóxicos y rechazar estos últimos al verlos, olerlos o probarlos sin ingerirlos. Una ventaja en el caso del olfato es que la intoxicación puede evitarse sin probar el alimento (Rusiniak *et al.* 1979).

Debido a que la aversión no se generaliza a otros alimentos, la especificidad del aprendizaje es la base de un comportamiento alimenticio adaptativo (Chapuis *et al.* 2007) lo cual prolonga la supervivencia (Lucas y Sclafani 1995; Jan Bures 1998; Maren 2001) y permite una mayor reproducción, promoviendo así la adecuación directa o indirectamente (Domjan 2005).

Este fenómeno se produce artificialmente en el control de plagas, caso descrito en 1953 por Julian Rzóska, quien observó la evitación de cebos envenenados por ratas y describió el comportamiento de los roedores en la presentación sucesiva de cebos con distintos venenos y alimentos. Rzóska encontró que la discriminación del alimento que se presenta con el veneno (alimento base), es responsable de la evitación y además, como se observó con mayor detalle en estudios posteriores, la aversión se desarrolla en un intervalo amplio de tiempo dependiendo del efecto del veneno, el grado de malestar y la naturaleza del alimento base. Describió también variaciones individuales en el aprendizaje y el comportamiento, que la naturaleza del cebo (consistencia, gusto y sabor) influye en el grado y duración de la memoria, y que las experiencias sucesivas pueden reforzar o superponerse a las previas.

Se ha encontrado que hay una relación directa entre el grado de malestar postingestivo y la persistencia del aprendizaje (Kyriazakis *et al.* 1999), lo cual no resulta extraño si consideramos la importancia de evitar el consumo de toxinas potencialmente mortales.

El término “sabor” implica gusto y olor de un alimento y cualquiera de ellos puede condicionarse para generar un aprendizaje aversivo (Lucas y Sclafani 1995; Myers y Sclafani 2006); pero cada aprendizaje tanto gustativo como olfativo tiene sus peculiaridades.

Aprendizaje Aversivo al Olor (AAO)

El papel de los estímulos olfativos es de particular interés, pues son responsables en gran medida de dar a los alimentos sus sabores distintivos y guían el comportamiento de búsqueda y evitación a distancia (Lucas y Sclafani 1995). La evaluación sensorial de la mayoría de los alimentos depende de la percepción olfativa, lo cual queda evidenciado por las marcadas distorsiones en la percepción de los sabores mostradas en pacientes anósmicos (Yeomans 2006). El AAO también es llamado condicionamiento aversivo al olor, aversión condicionada por el olor o aversión olfativa condicionada.

Para 1970, Lorden *et al.*, con el fin de evaluar el papel de las señales olfativas por sí mismas, asociaron un estímulo exclusivamente olfativo o una combinación de estímulos olfativo y gustativo con un fármaco anticancerígeno, la ciclofosfamida, y encontraron que se puede producir aversión a un olor cuando se asocia de forma selectiva con los efectos tóxicos de la droga; encontraron también que la aversión es específica para dicho olor, como se había observado previamente para los estímulos gustativos (Tapper y Halpern 1968), si bien ya en 1965 García *et al.* habían mencionado la aversión al alimento mediante “un simple olfateo” (García *et al.* 1966). En el AAO el efecto de aversión puede observarse midiendo una respuesta distinta a la consumatoria, es decir, sin que la rata consuma el alimento.

Considerando que el olfato es un telorreceptor externo, Hankins *et al.* (1973) realizaron una serie de experimentos para comparar las características del AAO con las del aprendizaje aversivo al sabor (AAS). Evaluaron la habilidad de ratas intactas para asociar un olor con un malestar interno en diferentes condiciones: con el estímulo olfativo en un disco alrededor del tubo del bebedero (sin contacto directo), con el mismo estímulo olfativo debajo del bebedero (impregnado en el cuarto de experimentación); y utilizando diferentes intervalos en el retraso del malestar. Se evaluó también la habilidad de ratas anósmicas para asociar a) gusto, b) olor y c) gusto y olor (sabor) con un malestar interno y en asociaciones ruido-descarga eléctrica, comparando los efectos de dos métodos de producir anosmia: la ablación del bulbo olfativo (anosmia irreversible) y la aplicación tópica de sulfato de zinc en la mucosa olfativa (anosmia reversible). Encontraron que la aversión al olor se produce sólo cuando el EI se presenta rápida y repetidamente tras el EC, mientras que no se desarrolla aversión cuando el intervalo interestímulos alcanza los 30 minutos; por el contrario, la aversión al sabor se produce con un sólo ensayo, es más evidente que la aversión al olor y persiste con el retraso del EI de 30 minutos, lo que, de acuerdo con ellos, indica que las señales olfativas son menos efectivas que las gustativas para producir un condicionamiento toxicofóbico. En el caso de las ratas anósmicas, bajo ninguno de los procedimientos anteriores presentaron neofobia, es decir, reticencia a consumir una sustancia con un olor nuevo; las ratas bulbectomizadas tuvieron deficiencias en la adquisición de aversión gustativa en comparación con las ratas con anosmia periférica y los animales control. A su vez, los animales con anosmia periférica adquirieron la aversión

ligeramente más rápido que los controles. Para la asociación ruido-descarga eléctrica, encontraron que el desempeño de los animales bulbectomizados fue deficiente en comparación con los otros dos grupos, que no difirieron entre sí; además la extinción de la memoria se presentó más rápido en las ratas bulbectomizadas. También en estas pruebas el desempeño de los animales con anosmia periférica fue ligeramente superior que el de los controles.

De lo anterior Hankins *et al.* (1973) concluyen que el gusto ejerce un control más fuerte y directo que el olor sobre la ingestión, ya que aún cuando los animales son capaces de asociar eventos del ambiente externo con eventos del medio interno, las respuestas condicionadas son cuantitativa y cualitativamente distintas. Argumentando a favor de la mayor importancia del gusto, los mismos autores mencionan que aún cuando los animales pueden usar las señales olfativas para evitar el contacto con la lengua, el olfato no juega un papel indispensable en el ajuste de palatabilidad del alimento. Adicionalmente ofrecen evidencia anatómica sobre la convergencia de aferencias gustativas en el núcleo del tracto solitario, al igual que aferencias desde las vísceras y el área postrema –que monitorean los estados internos y los fluidos corporales–, mientras que las aferencias olfativas no se relacionan con el sistema de retroalimentación interna sino con el sistema límbico que está involucrado en respuestas afectivas, aunque, como se verá más adelante, estudios posteriores contrastan con esta idea (Slotnick *et al.* 1997).

Para 1974 se consideraban como principios inequívocos establecidos que: 1) la aversión inducida por el malestar es mayor cuando el sabor del alimento o la bebida es más fuerte; 2) dado un sabor constante, la aversión por el sabor es más fuerte si el malestar es más severo; 3) dados un sabor constante y la severidad del malestar equivalente, la fuerza de la aversión está inversamente relacionada con el lapso de tiempo entre el consumo y el malestar, considerando que el sabor del alimento es la única señal que las ratas asocian con malestares tardíos (García *et al.* 1974). Se asume además que el gusto, y no la olfacción, es la modalidad primaria y suficiente para la adquisición de aversiones alimenticias, y que, aun cuando el olfato está involucrado en la alimentación por su cercanía con la boca, no desempeña un papel primario en el ajuste de los incentivos alimenticios y más bien está funcionalmente relacionado con el medio externo, la identificación de la comida y la activación del apetito.

Tomando en cuenta tal diferencia en la efectividad del olor cuando éste forma parte del fluido y cuando se encuentra en una ubicación próxima (Bouton *et al.* 1986), Slotnick *et al.* (1997) realizaron pruebas para comparar la efectividad del olor y el gusto cuando ambos constituyen atributos intrínsecos de la ingesta. Encontraron que cuando el olor se encuentra diluido en la bebida, sin propiedades gustativas (por debajo de su umbral de detección), la efectividad del olor está directamente relacionada con su concentración, igual que como ocurre con el gusto; la fuerza de la aversión obtenida con un gusto es equiparable a la de un olor utilizando una concentración apropiada, es decir, un olor puede ser tan efectivo como un gusto con un sólo entrenamiento. Encontraron también que el olor fue tan efectivo como el gusto en pruebas con intervalos interestímulos de una y cuatro horas.

Chapuis *et al.* (2007) complementaron el experimento anterior (Slotnick *et al.* 1997) siguiendo la afirmación de que el olor es una señal menos efectiva para el malestar como consecuencia de un sesgo metodológico al colocar los olores cerca y no en el fluido consumido. Evaluaron el papel de la experiencia olfativa ortonasal (en la cual el olor llega a la mucosa olfativa a través de los nostrilos) y retronasal (cuando el estímulo se introduce en la boca, la estimulación de receptores olfativos se alcanza a través de la nasofaringe) en el AAO, para lo cual compararon las características inducidas por ambas formas de presentación del estímulo: cerca del bebedero (estimulación ortonasal) y tanto cerca del bebedero como mezclado con el agua (ambos tipos de estimulación). Sus experimentos evalúan: 1) el efecto del incremento del intervalo interestímulos y el cambio del modo de presentación del olor durante la adquisición y la evocación; también investigaron la evocación a largo plazo del aprendizaje y la especificidad del olor, y 2) la importancia del modo de presentación del olor en la extinción del AAO y sus consecuencias a largo plazo.

En el primer experimento encontraron un claro condicionamiento aún con intervalos interestímulos largos (hasta 120 minutos) cuando el estímulo olfativo se presenta retronasalmente durante la adquisición y ortonasalmente durante la evocación, sin embargo, la fuerza de la aversión depende del intervalo entre estímulos, siendo mayor con retrasos menores. Cuando el olor no es una característica intrínseca del líquido, el condicionamiento sólo tiene lugar con intervalos cortos, lo que confirma la importancia de la ingestión del EC para el desarrollo de un AAO fuerte y estable. El desarrollo de una aversión resistente a un retraso interestímulos de varias horas depende de la ingestión del olor durante el

condicionamiento, no durante la evocación, ya que el reconocimiento olfativo distal en la sesión de prueba fue suficiente para que la rata evitara el fluido. Una vez adquirido, el AAO es de larga duración (50 días) y específico para el olor condicionado, ya que no se presentó aversión hacia un olor control o inocuo, sin importar la forma en que fue adquirido.

En el segundo experimento Chapuis *et al.* (2007) observaron que la aversión se perdió de forma gradual tanto para la presentación oronasal como la retronasal a lo largo de 5-6 días de pruebas-extinción. La extinción es descrita como el declive en la expresión de una respuesta condicionada consecutivo a la exposición repetida al EC en ausencia del EI; no refleja una pérdida de la memoria o “desaprendizaje”, sino un proceso de reaprendizaje: asociación entre el EC y la ausencia del reforzador original. Ambos grupos recuperaron espontáneamente la aversión al olor 50 días después de su extinción.

Chapuis *et al.* (2007) consideran que el aprendizaje con intervalos interestímulos largos mediante la ingestión del olor está relacionado con la diferente percepción y procesamiento del estímulo durante el consumo del líquido; asimismo, proponen la posibilidad de que existan diferencias en patrones de activación neuronal, considerando que la naturaleza y dirección de la “corriente” del olor a través de la mucosa olfativa pueden ser factores importantes en la discriminación de los olores. Consideran que un olor retronasal es almacenado de forma más efectiva en la memoria de corto plazo que uno oronasal, y apoyan la propuesta de Ferry *et al.* (1997) de que la MCP del EC es la que se asocia con el EI. Su interpretación contrasta con resultados de nuestro laboratorio (Tovar-Díaz *et al.* 2011), en donde la presentación distal del estímulo olfativo genera una clara aversión (evaluada a corto plazo). Según estos autores, posiblemente la diferente percepción y procesamiento del estímulo en la presentación retronasal tengan un efecto sobre la consolidación.

De acuerdo con sus resultados, la olfacción retronasal es importante para asociar el consumo de un alimento con un olor nuevo y el malestar gástrico posterior, mientras que la olfacción oronasal permite la evitación del alimento sin consumirlo. Asimismo, más que una dicotomía que podría implicar sistemas olfativos completamente separados, sus datos resaltan una complementariedad fisiológica entre las dos estimulaciones olfativas creada a través del aprendizaje.

El AAO lo podemos clasificar como un aprendizaje asociativo (condicionamiento clásico) en el cual la pista olfativa que ofrece el alimento es la que reporta la saliencia (notoriedad) - que Kalat y Rozin en 1970 definieron como “la tendencia relativa de una sustancia nueva a ser asociada con envenenamiento” (revisado en Martin y Lawrence 1979).

El procedimiento general es el siguiente: a los animales se les ofrece una bebida con un olor característico que hace las veces de estímulo condicionado (EC); después de beber, se les inyecta por vía intraperitoneal cloruro de litio (LiCl), que hace las veces de estímulo incondicionado (EI); el malestar gastrointestinal ocasionado por el LiCl es la respuesta incondicionada (RI). Al presentar nuevamente el agua con olor (EC), las ratas evitan beberla, lo cual constituye la respuesta condicionada (RC).

Lo anterior podemos entenderlo fácilmente con el siguiente esquema:

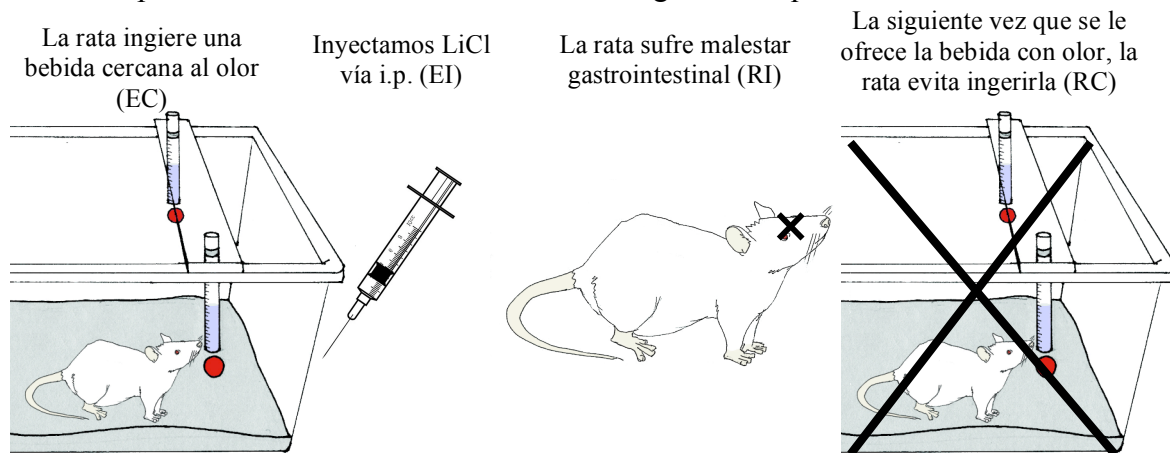


Figura 3. Esquema del aprendizaje aversivo al olor..

Relevancia del modelo de estudio

El condicionamiento clásico es el modelo más utilizado para el estudio del aprendizaje asociativo, ya que involucra la vinculación entre el EC y el EI, que se puede identificar por sus consecuencias conductuales: el surgimiento y/o el cambio de respuestas (respuestas condicionadas) frente al EC (Domjan 2005). En este modelo particular, el decremento significativo del consumo de alimento o agua, en comparación con el grupo control, se interpreta como la demostración conductual de la adquisición de un AAO efectivo.

Aun cuando el AAO puede ser un fenómeno artificial, considerando que en condiciones naturales difícilmente se ingieren alimentos sin propiedades gustativas, éste y otros modelos de aprendizaje olfativo se han utilizado por varias décadas para el estudio de la memoria (Sánchez-Andrade *et al.* 2005), ya que representan una forma relativamente

simple de aprendizaje, que es además rápido, robusto y genera memorias de larga duración que se pueden probar experimentalmente de forma sencilla.

Características del AAO como modelo de estudio de la memoria:

- Identificación de las etapas del proceso mnémico. A nivel conductual, en el AAO pueden identificarse fácilmente la adquisición de información y la evocación (sea MCP o MLP). Con relativa claridad pueden inferirse los periodos de formación de MCP, y de consolidación de MLP. El resultado del condicionamiento se infiere de manera sencilla midiendo el consumo de agua (véase la figura 13 en la sección de Resultados, en la que se muestra el efecto típico de evitación de ingesta de la bebida condicionada). Partiendo de su identificación podemos estudiar experimentalmente cada una de las etapas para conocer sus mecanismos particulares.

- El AAO sólo requiere una sesión de entrenamiento para generarse. Esta característica evita los inconvenientes de los ensayos múltiples, tales como la difícil identificación de las etapas (p.ej. en una curva de aprendizaje de varias sesiones, es difícil determinar un momento específico de adquisición de información), la consecuente dificultad para decidir el momento adecuado de una manipulación experimental, y finalmente, la interpretación de los resultados.

- Existe una marcada homología en el diseño estructural y el funcionamiento del sistema olfativo entre diferentes clases de organismos –incluyendo insectos y mamíferos– que permite generalizar con cierta seguridad los principios establecidos en el estudio de alguna de ellas (Davis 2004).

Por las razones mencionadas, el AAO resulta un modelo muy conveniente para el estudio de la neurobiología de la memoria olfativa.

A continuación describiremos las vías neuronales involucradas.

Sustrato anatómico y funcional del AAO

Vía emética

El sistema gastrointestinal y el cerebro están altamente conectados, y esta interacción bidireccional desempeña una función importante no sólo en la homeostasis gastrointestinal

y digestión sino también en los estados emocionales, motivacionales y funciones cognitivas, incluyendo la toma de decisiones. El sistema nervioso central se comunica con las vísceras incluyendo el sistema gastrointestinal a través de las dos ramas del sistema nervioso autónomo, el sistema nervioso entérico, el eje hipotálamo-hipófisis y las vías descendentes monoaminérgicas (Mayer 2011).

La vía emética es el conjunto de estructuras y nervios del sistema nervioso encargados de ejecutar y regular la náusea y el vómito. La emesis es la acción de vomitar mientras que el vómito es la expulsión súbita de los contenidos estomacales que comúnmente se produce después del síntoma prodrómico conocido como náusea. Existen diversos agentes que pueden producir náusea o emesis como la ingestión de una toxina, estímulos repugnantes, dolor intenso, emociones intensas, efectos secundarios de medicamentos, movimientos que estimulan el sistema vestibular o incluso la sugestión verbal en humanos.

La manera de estudiar la náusea en sujetos no humanos es a través de la salivación excesiva, deglución constante y diversas conductas que nos permiten inferir un estado parecido a la náusea. En algunos modelos experimentales es relativamente fácil de estudiar el vómito que incluye a *grosso modo* dos fases: las arcadas y la expulsión. Durante la fase de las arcadas, los músculos del diafragma y del abdomen se contraen o relajan simultáneamente. Durante la expulsión, sucede una contracción prolongada de los músculos abdominales coordinada con la actividad de los músculos intercostales y los músculos de la laringe y faringe. La glotis se cierra y el paladar blando se eleva; en los intestinos sucede una contracción retrógrada de gran magnitud y el *fundus* gástrico se relaja; el ritmo cardíaco y la respiración aumentan así como la sudoración (Hornby 2001).

Los roedores como las ratas carecen del reflejo de vómito debido a limitaciones fisiológicas y anatómicas en su aparato gástrico, pero al ser envenenados presentan todos los indicadores conductuales de emesis como las arcadas del abdomen, arqueamiento de la espalda, agachar la cabeza, boqueos y protrucción de la boca (Garcia *et al.* 1985).

La falta del reflejo de vómito en ratas es bien conocida por los agentes de control de plagas quienes utilizan agentes eméticos fuertes que son fácilmente expulsados por niños y mascotas, pero resultan letales al ser consumidos por las ratas. Los roedores tienen otros mecanismos de defensa para lidiar con las posibles toxinas, venenos o agentes nocivos. Uno de ellos es la neofobia (evitación de estímulos novedosos), sin embargo, la neofobia

no explica la aversión producida por la ingesta ya que carece de todo el complejo conductual ya descrito. Una conducta característica de la ingesta de agentes nocivos en roedores es el consumo de tierra y desechos, que según García *et al.* (1985) dicha conducta conocida como “pica” puede servir como quelante o como reporta Mayer (2011), el consumo de comida activa un mecanismo de analgesia asociado a vías serotoninérgicas descendentes lo que disminuye el malestar visceral.

Debido a la ausencia del reflejo de vómito en roedores, el uso del término emesis en ratas no implica vómito sino malestar interno que produce un complejo conductual similar a la náusea o vómito en otros mamíferos.

La coordinación de la extraordinaria combinación de cambios autonómicos que permite el complejo conductual de emesis sucede al nivel de la médula oblonga. La región esencial para la coordinación de las conductas de emesis se localiza entre el obex (apertura del canal central en el cuarto ventrículo) y la porción rostral del núcleo ambiguo. Por lo tanto las neuronas eferentes que controlan los músculos involucrados en la emesis se encuentran dispersas a lo largo de la médula oblonga. Dichas neuronas deben de ser activadas en la secuencia apropiada para producir emesis.

Las señales asociadas a los contenidos luminales en los intestinos son detectadas por aferencias del nervio esplácnico y del décimo par craneal o vago, las cuales cuentan con quimiorreceptores en la mucosa intestinal capaces de detectar diversas sustancias (Hornby 2001).

La información visceral se envía al complejo dorsovagal que se compone de una estructura quimiosensorial llamada área postrema (AP), de un centro encargado de integrar la distensión, mecanosensación y otros estímulos provenientes de las vísceras llamado núcleo del tracto solitario (NTS), y por último, de un centro que integra la reacción motriz y excretora de las vísceras llamado núcleo motor dorsovagal (DMX).

El NTS localizado en la médula oblonga dorsal, es el principal relevo sensorial de las vísceras. La mayor parte de la literatura sobre su neurofisiología se centra en su función en el sentido del gusto y el control cardiorespiratorio ya que integra y transmite señales de los baroreceptores, quimiorreceptores de la carótida y mecanoreceptores pulmonares.

El NTS es una estructura con forma de “hueso de los deseos” que delimita la parte posterior del cuarto ventrículo, extendiéndose aproximadamente 2.5mm anterior y 2.8mm posterior

al obex en ratas. El NTS tiene una organización víscerotópica que generalmente es consistente con sus posiciones anatómicas; las neuronas que inervan el paladar blando se encuentran en el ala anterior del NTS, aquellas que representan la faringe, esófago y estómago se distribuyen progresivamente hacia la porción caudal extendiéndose posterior al obex (ver Figura 4) (Young 2012).

El DMX tiene una forma similar al NTS, sin embargo la viscerotopía se organiza transversalmente, con motoneuronas que proyectan al *cecum* en la parte lateral y aquellas que proyectan al estómago en la porción medial. Las aferencias vagales conducen todas las fibras centrífugas que controlan la motilidad de los intestinos y su secreción (ver figura 4) (Young 2012).

El AP es una estructura anatómicamente discreta, de aproximadamente 0.9mm de diámetro en la rata. Se describió por primera vez a inicios de 1900s y fue poco tiempo después que se describió como órgano circumventricular ya que se teñía con trazadores vitales administrados intravenosamente (Young 2012). A través del análisis ultraestructural se observó la presencia de capilares fenestrados, y además que el área postrema carece de expresión de claudinas y ocludinas, que son proteínas necesarias para las uniones ocluyentes presentes en las regiones aledañas.

De 9 órganos circumventriculares sólo 3 (el órgano subfornical, el órgano vasculoso de la lamina terminal y el AP) se conocen como órganos circumventriculares sensoriales.

A inicios de la década de los 50s, el AP se identificó como la zona quimiorreceptora responsable de desencadenar el vómito (Bernstein *et al.* 1992). Otras funciones cardiopulmonares y de homeostasis de fluidos se identificaron en los siguientes 40 años. Su posición dentro del cerebro, su falta de barrera hematoencefálica y otras peculiaridades ultraestructurales sugieren una alta especialización para sensar sustancias en la sangre o el líquido cefalorraquídeo. Recibe aferencias sensoriales de vísceras torácicas y abdominales a través del nervio vago y contiene una amplia variedad de receptores para un gran número de compuestos neuroactivos (Young 2012).

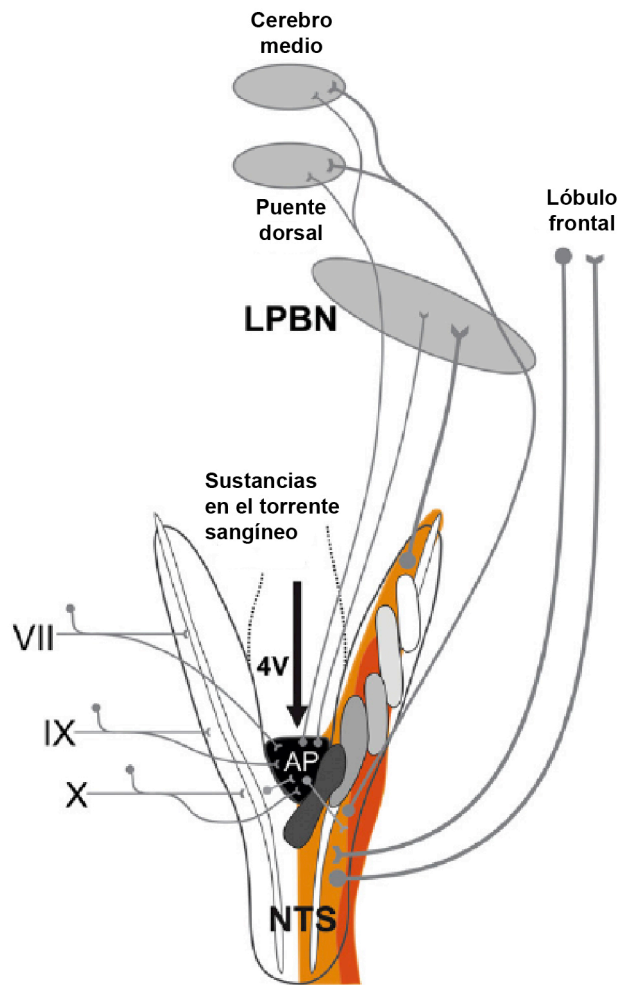


Figura 4. Diagrama de las interconexiones locales entre el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo dorsal del vago (DMX) y el área postrema (AP) en la rata. LPBN, núcleo lateral parabraquial; 4V, cuarto ventrículo; VII, nervio facial; IX, nervio glosofaríngeo; X, nervio vago. El DMX presenta una viscerotopia transversal (p ej. estómago (naranja claro) a *cecum* (naranja oscuro), mientras que el NTS presenta una viscerotopia rostrocaudal (p ej. paladar (blanco) a *cecum* (gris oscuro))(Young 2012).

Las tres estructuras (DMX, NTS y AP) tienen dos tipos de aferencias enteroreceptivas: la distensión, la estimulación mecánica o química del vago y otros pares craneales hacia el NTS, o la activación de los quimiorreceptores en el AP a través de sustancias en la sangre.

Las eferencias más importantes del DMX son las vagales que regulan las respuestas motrices y secretoras de los intestinos.

Las proyecciones ascendentes desde el NTS se dirigen hacia el núcleo parabraquial lateral (IPBN) (Young, 2012) el cual se encarga de integrar la señal y enviarla hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), el núcleo supraóptico del hipotálamo y el núcleo central de la amígdala (Mayer 2011). Adicionalmente, del NTS se envía la información a

núcleos ventromediales del tálamo que después mandan la información al núcleo accumbens (ver Figuras 4 y 5).

Tanto la corteza prefrontal como la orbitofrontal reciben aferencias a través del tálamo, hipotálamo y la amígdala (Mayer 2011).

La corteza insular por su parte también recibe aferencias de la amígdala, tálamo e hipotálamo. Las aferencias viscerales y sensoriales son representadas en las regiones posteriomediales de la corteza insular, y los estímulos olfativos y gustativos son representados en la corteza insular anterior y medial, respectivamente, lo que sugiere que subregiones cercanas pero distintas son responsables de la representación primaria de distintos aspectos de los inputs interoceptivos relacionados a la ingesta (Mayer 2011).

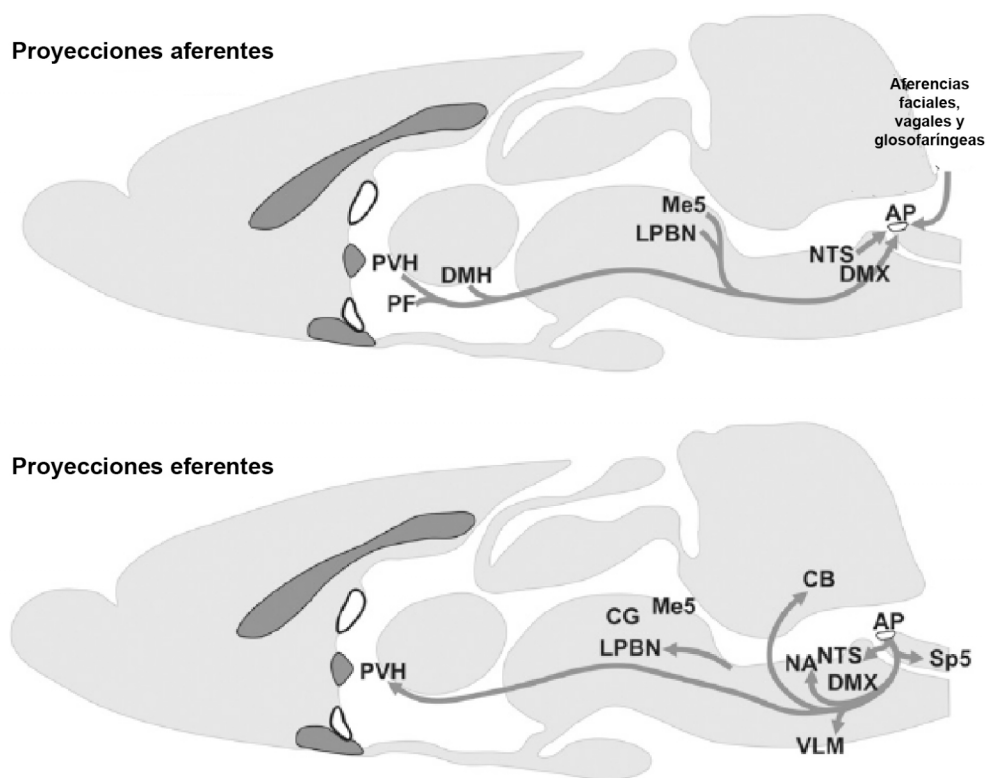


Figura 5. Interconexiones aferentes y eferentes a gran escala del AP, NTS y DMX. CB, cerebelo; CG, “central gray”; DMH núcleo dorsomedial del hipotálamo; Me5 núcleo mesencefálico trigeminal; NA, núcleo ambiguo; PF, área perifornical; PVH, núcleo paraventricular del hipotálamo; Sp5, núcleo espinal trigeminal; VLM, médula ventrolateral (Young 2012).

El LiCl es uno de los agentes eméticos más comúnmente empleados en investigación para establecer condicionamientos aversivos. Una inyección intraperitoneal isotónica (0,15M) de LiCl (2% del peso corporal) después del estímulo a condicionar permite establecer un

fuerte condicionamiento aversivo. Los signos de malestar visceral después de la inyección de LiCl son la hipoactividad, diarrea, enuresis, postrarse sobre el vientre, decremento de la temperatura corporal, y decremento del ritmo cardiaco y presión arterial entre otros (Ferguson y Smith 1991; Bernstein *et al.* 1992).

Cuando se administra LiCl a la rata ya sea intraperitoneal o intragástricamente se activa la rama sensorial del nervio vago y el nervio esplácnico que mandan la información a través de las dos vías ya descritas anteriormente; la vía del NTS y la vía del AP por medio de la sangre (Niiijima y Yamamoto 1994).

Al realizar una lesión del AP, Bernstein *et al.* (1992) demostraron que todas las conductas asociadas al malestar visceral desaparecían. Diversos estudios han demostrado que al lesionar el AP se bloquea la adquisición del AAS con LiCl en ratas (Spencer *et al.* 2012). Dicha lesión no bloquea la adquisición al emplear otras drogas como anfetamina, apomorfina o mediante mareos por movimientos de rotación lo que parece indicar que el AP participa en la percepción del estímulo aversivo dependiendo del agente farmacológico y la dosis (Spencer *et al.* 2012).

La administración de LiCl sistémico genera la expresión de c-Fos (marcador genético de actividad neuronal) en el NTS, AP, IPBN, el núcleo central de la amígdala, el núcleo supraóptico y el núcleo paraventricular del hipotálamo (Spencer *et al.* 2012), las mismas estructuras implicadas en la vía emética (Young 2012).

La farmacodinamia y el mecanismo por el cual el LiCl genera descargas de las aferencias viscerales no se ha descrito aún; sin embargo, Niiijima y Yamamoto (1994) sugieren que el LiCl depolariza las terminales axónicas de tipo C (nocicepción) al acumularse el litio intracelularmente y debido a que no pueden ser expulsados por la bomba de sodio.

Vía olfativa

Los estímulos olfativos pueden ser procesados por dos sistemas separados. El primero es conocido como el sistema olfativo principal y el segundo como sistema olfativo accesorio o sistema vomeronasal (véase figura 6). Puesto que éste último no participa en el AAO no ahondaré en su funcionamiento.

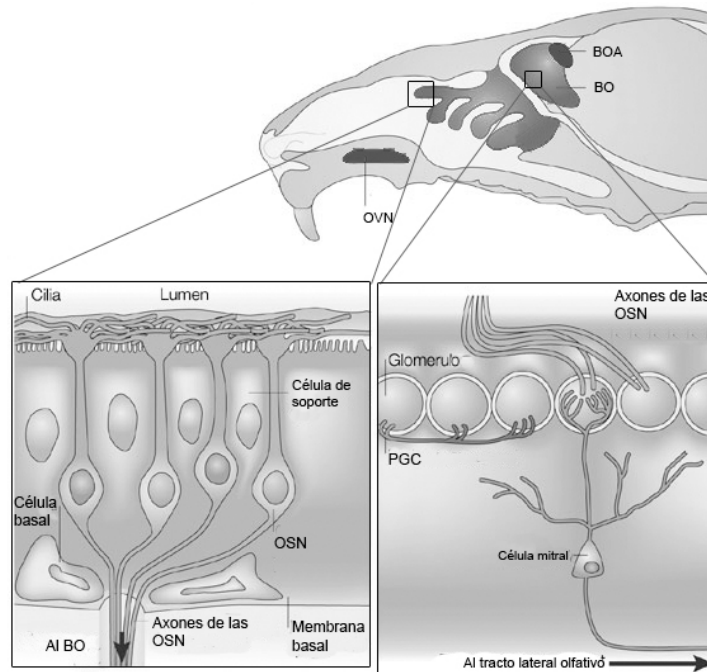


Figura 6. Sistemas olfativos principal y accesorio. Accesorio: órgano vomeronasal (OVN) y bulbo olfatorio accesorio (BOA) en negro. Principal: epitelio olfatorio y bulbo olfatorio principal (BO) en gris oscuro. En el recuadro izquierdo una ampliación del epitelio y en el recuadro derecho una ampliación del bulbo olfatorio. Modificado de Lledo *et al.* (2005).

El sistema olfativo principal está constituido por un conjunto de estructuras y vías nerviosas responsables de transducir señales moleculares a potenciales de acción a partir de los cuales se genera la experiencia olfativa. De esta forma, la entrada sensorial primaria está dada por los axones de las neuronas sensoriales olfatorias (OSN), cuyo neurotransmisor principal es el glutamato. En mamíferos, entre seis y diez millones de ellas forman un neuroepitelio o mucosa olfatoria (Firestein 2001), que recubre una serie de láminas cartilagosas situadas en la parte superior de la cavidad nasal, llamadas turbinas. Si bien la estructura de la mucosa olfatoria aparenta ser homogénea, las células que la forman muestran una gran heterogeneidad molecular con relación a los receptores que expresan. Del 75 al 80% de las células en el epitelio olfativo son OSN y se caracterizan por expresar una proteína llamada OMP por sus siglas en inglés (olfactory marker protein). Las OSN de la mucosa olfatoria poseen cilios en cuya superficie se localizan los receptores odoríferos, los cuales pertenecen a una gran familia multigénica cuyos miembros codifican para aproximadamente 1000 subtipos en la rata. Cada OSN expresa un receptor entre varios cientos a miles (dependiendo de la especie). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Buck y Axel 1991).

Topográficamente, la mucosa olfatoria puede dividirse en cuatro cuadrantes dependiendo del tipo de receptor que expresan las OSN (Moon y Ronnett 2003).

Antes de que los odorantes activen los receptores localizados en los cilios de las OSN, existen unas proteínas conocidas como proteínas de unión a odorantes (OBP por sus siglas en inglés) las cuales se cree, se unen a los odorantes para ser transportados hacia las OSN o para removerlos del moco en el epitelio olfativo. Dichas proteínas son homodímeros de 19KDa y se han descrito varios tipos dependiendo de la especie estudiada.

Los axones de las OSN atraviesan la lámina basal del neuroepitelio olfatorio, atraviesan la lámina cribosa del etmoides, entran al BO y llegan a los glomérulos olfatorios (~2400 glomérulos; en rata, ver figura 6 y 7a) para formar parte de los mismos. Los glomérulos son estructuras esféricas ricas en neuropilo que tienen entre 40 y 100 μm de diámetro que, además de recibir a la aferencia sensorial primaria, contienen las dendritas apicales de las neuronas mitrales y en penacho. Los axones de las OSN no contactan a cualquier glomérulo sino que proyectan de manera específica a ciertos glomérulos, en los que incluso se expresa el RNA mensajero de su subtipo de receptor (Vassar *et al.* 1994).

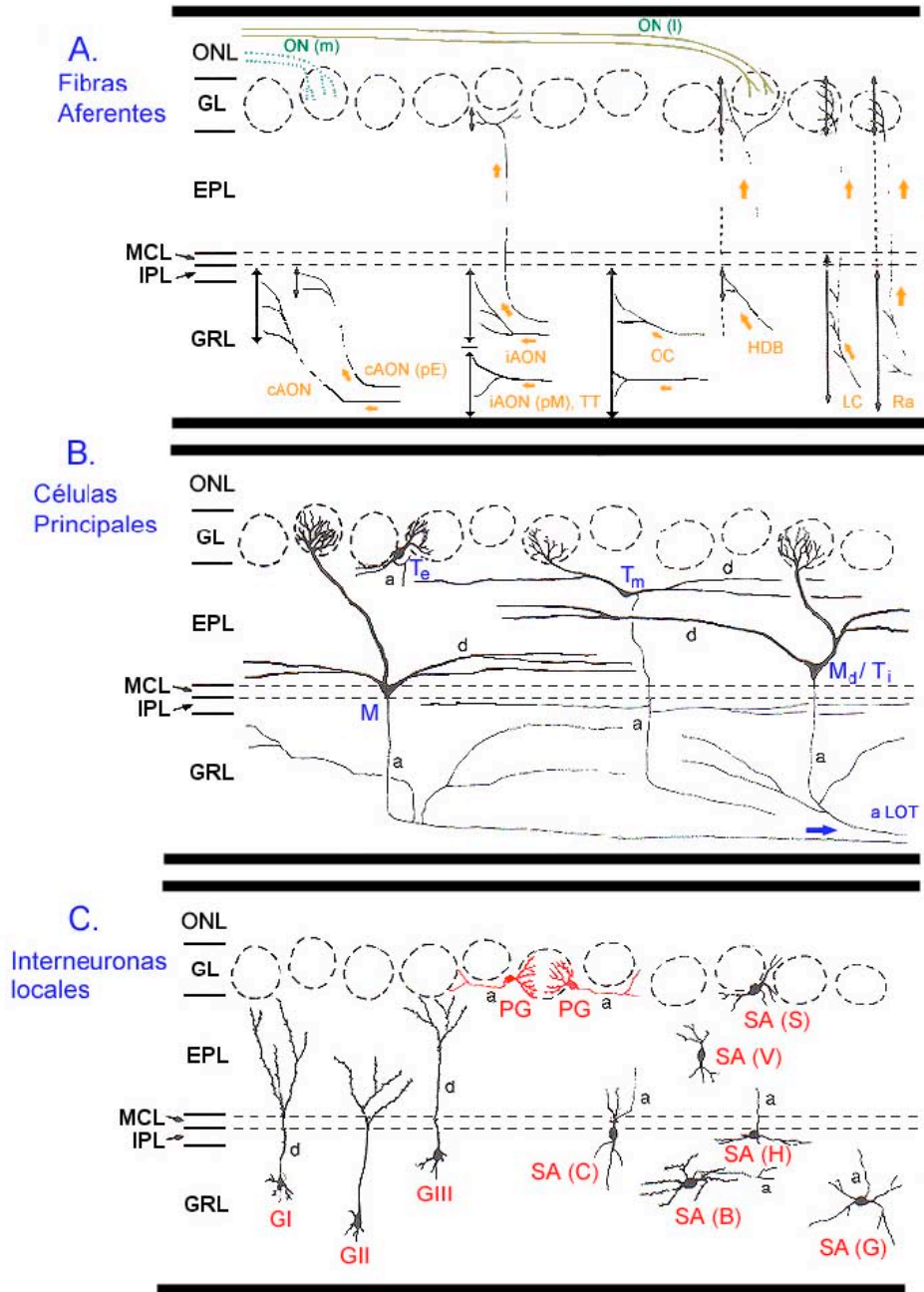


Figura 7 Esquema de los elementos neuronales del BO. Esquema que ilustra la citoarquitectura del bulbo olfatorio, de arriba abajo, capa del nervio olfatorio (ONL), capa glomerular (GL), capa plexiforme externa (EPL), capa de las células mitrales (MCL), capa plexiforme interna (IPL) y capa granular (GRL). Además, se ilustra la distribución de los distintos elementos neuronales presentes en el bulbo olfatorio, clasificados en (I) fibras aferentes, (II) células principales e (III) interneuronas locales; En (I), las aferencias provenientes de la mucosa olfatoria se muestran en color verde, mientras que las que provienen de centros cerebrales superiores en color naranja; en (II) se esquematizan las células mitrales (M, Md) y las en penacho internas (Ti), mediales (Tm) y externas (Te); en (III) se muestran las interneuronas granulares (tres subtipos, GI-III), de axón corto (SA, seis subtipos, Schwann (S), van Gehuchten (V), Hensen (H), Clandins (C), Blanes (B) y Golgi (G)) y las periglomerulares (PGC). Abreviaturas: (ON)m, nervio olfatorio, región medial; (ON)l, nervio olfatorio, región lateral; núcleo olfatorio anterior ipsilateral (AONI), contralateral (AONc), (pE), pars externa, (pM), pars medialis; TT, tenia tecta; OC, corteza olfatoria; HDB, porción horizontal de la banda diagonal; LC, locus coeruleus; Ra, núcleos del raphé. (adaptado de Kratskin y Belluzzi 2003).

Alrededor de los glomérulos se encuentra un grupo heterogéneo de neuronas que en conjunto se conocen como neuronas yuxtaglomerulares (JGC). Las JGC se clasifican en tres tipos distintos de neuronas: 1) células periglomerulares (PGC); 2) células superficiales de axón corto y 3) células en penacho externas. De las JGC, las PGC y las células en penacho externas mandan dendritas hacia el interior de los glomérulos, mientras que las células superficiales de axón corto mandan sus dendritas hacia la región glomerular, mas no hacia los glomérulos (figura 7c) (Lledo *et al.* 2008).

Las PGC son interneuronas con tamaño similar a las neuronas granulares que serán descritas más adelante (GRC; 6-8 μm de diámetro). Cada PGC posee una pequeña y tupida dendrita que arboriza dentro de un glomérulo; siendo muy raras las PGC que inervan a dos glomérulos. Sus ramas dendríticas se conectan con otras PGC, las terminales de los axones olfatorios o las ramas de las células mitrales y en penacho (figura 7c). El axón de las PGC se distribuye lateralmente dentro de regiones extraglomerulares, extendiéndose hasta aproximadamente cinco glomérulos posteriores.

Las PGC son neuronas GABAérgicas que presentan una gran heterogeneidad química y anatómica (Panzanelli *et al.* 2007). Así como las PGC son heterogéneas químicamente, también lo son estructuralmente debido al número y extensión de ramificaciones dendríticas varía entre ellas; los sitios en donde establecen contactos sinápticos; y finalmente, pueden o no formar uniones comunicantes con las dendritas de las células mitrales y en penacho (Kosaka *et al.* 1997).

Es importante destacar que la heterogeneidad química y estructural de las PGC, se traduce en heterogeneidad fisiológica, aunque podríamos decir de forma general que las PGC inhiben principalmente la sinapsis entre el axón de las OSN y las células mitrales (primera sinapsis de la vía olfativa).

Después del procesamiento dentro del circuito glomerular, la salida de información del BO está dada por los axones de las células mitrales y las células en penacho, ambas glutamatérgicas (figura 7b). En mamíferos, los somas de las células mitrales se localizan en una lámina delgada (capa de las células mitrales). Cada célula mitral origina una dendrita primaria o apical la cual atraviesa la capa plexiforme externa (EPL) y termina dentro de un glomérulo elaborando un penacho. Las células en penacho son más pequeñas que las células mitrales, están localizadas más superficialmente en la EPL (figura 7b) y se pueden

clasificar como externas, mediales o profundas dependiendo de la localización de su cuerpo celular. Todas ellas tienen en común una dendrita primaria que termina dentro de un glomérulo elaborando un penacho relativamente limitado y sus dendritas laterales pueden interactuar con las dendritas de las células granulares. Además sus axones también constituyen una fracción del tracto olfativo lateral junto a los axones de las células mitrales que forman una fracción vecina (Shepherd *et al.* 2010).

Debajo de la capa de células mitrales se encuentra una capa gruesa que contiene los somas de las células granulares (figura 7c), las cuales se encargan de inhibir a las células mitrales y a las células en penacho contribuyendo en los procesos de discriminación sensorial (figura 7b y 7c). Las células granulares (GRC) poseen un proceso superficial que se extiende radialmente a través de la superficie y se ramifica y termina en la EPL. Las GRC poseen otro proceso que se ramifica discretamente dentro de la capa granular. Existe una diversidad de subtipos de las GRC, sin embargo todas poseen la característica notable de la ausencia de axón. Las GRC son GABAérgicas y glicinérgicas; su principal función es inhibir a las células mitrales. Se han descrito tres tipos de células granulares en hamsters, conejos y ratones. Las GRC tipo 1 (G1) localizan sus somas en una zona intermedia y sus dendritas periféricas terminan en todos los niveles de la EPL. Las células granulares de tipo 2 y tipo 3 (G2 y G3) tienen sus cuerpos celulares en la parte profunda y superficial de la capa granular respectivamente. Las dendritas periféricas de las células granulares profundas (G2) y superficiales (G3) terminan en zonas profundas y superficiales de la EPL respectivamente; lo que sugiere que hay una segregación de los microcircuitos locales en la EPL (Kratskin y Belluzzi 2003).

De manera breve, es importante destacar la tasa de convergencia de la unidad sensorial olfativa en ratas que le confiere su alta sensibilidad olfativa. Existen alrededor de ~20, 000, 000 de OSN que proyectan a ~2400 glomérulos, lo que significa una tasa de 8000:1 mientras que en humanos es de 750:1, casi un orden de magnitud menor (Kratskin y Belluzzi 2003).

Después del BO, la información se proyecta por las células mitrales y en penacho a las estructuras secundarias olfativas. Todas las estructuras secundarias son pares y a excepción de las comisuras interhemisféricas, no hay evidencia de asimetrías en la anatomía o función de cualquiera de estas áreas.

Los axones de las células mitrales y una parte de las células en penacho emergen del BO y forman el pedúnculo olfatorio, parte de esta estructura es también la ruta de la corriente rostral migratoria a lo largo de la cual las nuevas neuronas o los neuroblastos migran a lo largo de la vida desde la zona subventricular al BO (Cleland y Linster 2003).

El núcleo olfativo anterior (AON) se localiza dentro del pedúnculo olfativo, normalmente cuenta con dos capas (capa superficial plexiforme y capa celular profunda) pero gradualmente asume una organización trilaminar cerca de su extremo caudal adyacente a la comisura anterior (Cleland y Linster 2003). El AON recibe proyecciones de las neuronas mitrales y de las células en penacho provenientes del BO que hacen sinapsis en la capa superficial plexiforme (capa 1a); las aferencias bulbares atraviesan a lo largo de la capa superficial hacia las capas plexiformes superficiales de la *tenia tecta ventral* y la corteza anterior piriforme, esta última forma el tracto lateral olfativo (LOT).

El AON es la principal fuente de conexiones de retroalimentación hacia BO desde cualquier fuente; todas las subdivisiones del AON proyectan ipsilateralmente y contralateralmente al BO. El AON también proyecta a la corteza piriforme, tubérculo olfatorio, *tenia tecta ventral*, corteza orbitofrontal e hipotálamo; y recibe proyecciones de diversas estructuras incluyendo la corteza entorrinal así como de la región CA1 del hipocampo. No existe una proyección topográfica aparente en la mayoría de las estructuras pero algunas son claramente topográficas (Cleland y Linster 2003).

Se conoce poco acerca del papel funcional del AON, entre algunas de sus posibles funciones se encuentra la mediación de las comunicaciones interhemisféricas entre los bulbos olfatorios en mamíferos a través de la comisura anterior, lo que podría ser importante para realizar comparaciones bilaterales de la información olfativa.

A través de estudios para detectar la expresión de c-Fos, se observó la activación de neuronas en el AON de ratas sometidas a un condicionamiento aversivo entre un olor y un shock eléctrico demostrando que la expresión de c-Fos en el BO y el AON puede ser modificada a través de un condicionamiento aversivo (Cleland y Linster 2003).

Dorsomedial al núcleo olfativo anterior y medial al LOT se ubican varias estructuras olfativas secundarias que colectivamente se denominan cortezas olfativas rostromediales: el *induseum griseum* (continuación dorsal hipocampal o el giro supracaloso), la *tenia tecta ventral* que colinda medialmente con el núcleo olfativo anterior.

El tubérculo olfatorio también se suele incluir dentro del grupo al igual que la corteza peduncular dorsomedial.

El tubérculo olfatorio en mamíferos es una protuberancia prominente en la base del cerebro caudal al pedúnculo olfatorio y medial al LOT. Recibe aferencias de las neuronas mitrales y en penacho del BO y presenta una capa plexiforme superficial como las cortezas laterales (corteza piriforme, corteza entorrinal y corteza periamigdalina) y rostromediales, pero su arquitectura celular varía, ya que medialmente se asemeja al estriado o globo pálido, mientras que lateralmente (cerca de la corteza piriforme) presenta una organización trilaminar. El tubérculo olfatorio a diferencia de la corteza piriforme, no manda proyecciones al BO o a cualquiera de las estructuras secundarias olfativas, sus proyecciones se dirigen hacia los núcleos mediodorsales y submediales del tálamo, al pálido ventral, núcleo accumbens y (en monos) a la corteza orbitofrontal.

Lateralmente los axones de las neuronas mitrales y en penacho salen de la región peduncular siguiendo el LOT. Algunas colaterales de dichos axones entran a la corteza piriforme anterior y posterior y a la corteza entorrinal lateral.

La corteza piriforme, la corteza entorrinal y la corteza periamigdalina se suelen denominar las cortezas olfativas laterales.

La corteza piriforme es una allocorteza de tres capas, la capa plexiforme superior y dos capas celulares que han sido estudiadas extensamente en el contexto de la función olfativa. En lo profundo de la corteza piriforme se ubica el núcleo endopiriforme que algunos autores consideran como la cuarta capa de la corteza piriforme sólo o junto con la porción profunda de la capa III (Illig y Haberly 2003).

La corteza piriforme recibe aferencias del BO y de otras estructuras secundarias olfativas a excepción del tubérculo olfativo. Las neuronas mitrales y las células en penacho mandan sus proyecciones a través del LOT y arborizan de manera extensa en la capa 1a. La corteza piriforme también recibe aferencias de la corteza orbitofrontal y de la corteza insular, la formación hipocampal, el cerebro basal colinérgico, el tallo cerebral, el hipotálamo y el tálamo; y manda eferencias de regreso al BO que terminan en la capa de células granulares. Además de proyectar al BO, la corteza piriforme manda proyecciones a la corteza insular, a la corteza perirrinal, corteza entorrinal, tubérculo olfativo y amígdala (ver figura 9).

Las interneuronas GABAérgicas se localizan en la capa I y III de la corteza piriforme. A

pesar de la gran precisión y topografía de las aferencias del nervio olfativo hacia la capa glomerular del BO, las neuronas mitrales y en penacho proyectan a la corteza piriforme de forma no topográfica. Las proyecciones hacia la corteza piriforme anterior pueden presentar un patrón espacial donde axones individuales se agrupan y terminan en zonas en lugar de dispersarse uniformemente, pero en general cualquier región del BO puede proyectar a cualquier región de la corteza piriforme.

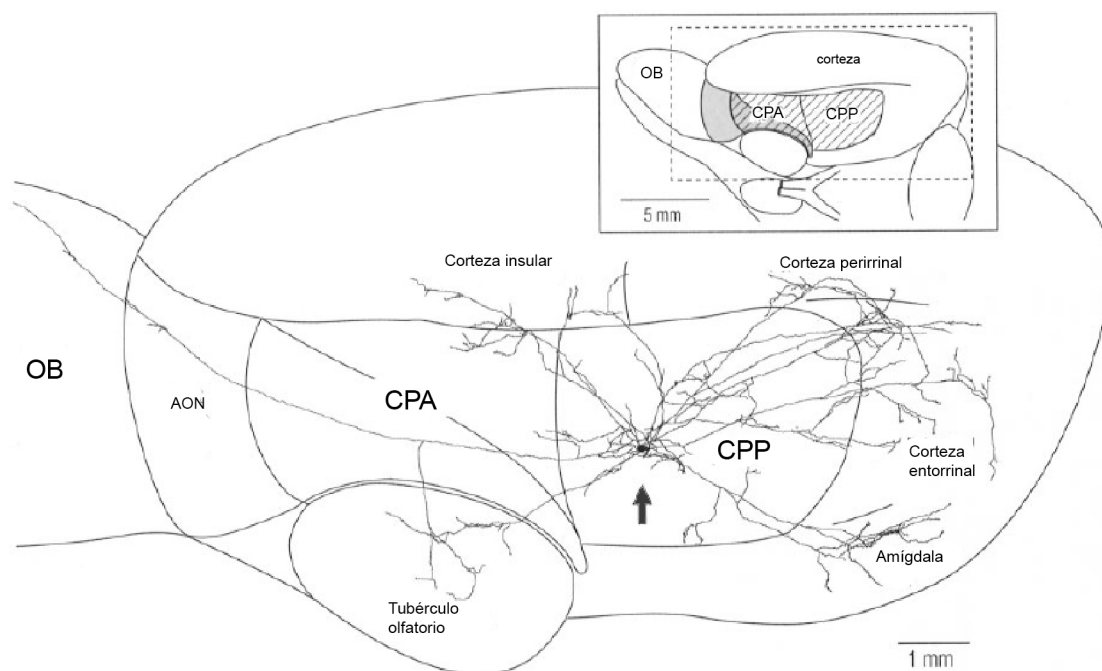


Figura 8. Esquema de la corteza piriforme. Diagrama del cerebro de ratona rotado 45° hacia arriba en el eje rostrocaudal que demuestra la ubicación de la corteza piriforme anterior (CPA) y posterior (CPP), así como la distribución de las proyecciones de un axón de una neurona piramidal de la capa II en la CPP hacia estructuras no olfativas y olfativas. Arriba a la derecha se muestra la porción del cerebro de la ratona ilustrada en el esquema. El área con líneas diagonales es la corteza piriforme y el área sombreada es el tracto lateral olfativo (Johnson *et al.* 2000).

No existe consenso acerca de la función de la corteza piriforme en la función olfativa pero se ha demostrado su participación en procesos de habituación perceptual, discriminación de alcanos, discriminación de mezclas de olores y es posible que tenga un papel en la lateralización espacial de los olores (Hasselmo y Bower 1992; Wilson 1998, 2001; Zinyuk *et al.* 2001; Fletcher y Wilson 2002). Johnson *et al.* (2000) proponen que la corteza piriforme se encarga de sintetizar las características del estímulo olfativo y relacionarlas con otras funciones cerebrales.

La corteza entorrinal es otra de las cortezas involucradas en la vía olfativa; se divide en

tres: la división medial, la división lateral y la división intermedia (ver figura 10). Tiene seis capas, en contraste con la corteza piriforme que tiene 3 o 4 dependiendo del autor, y se considera una corteza de transición entre las allocortezas olfativas y la isocorteza.

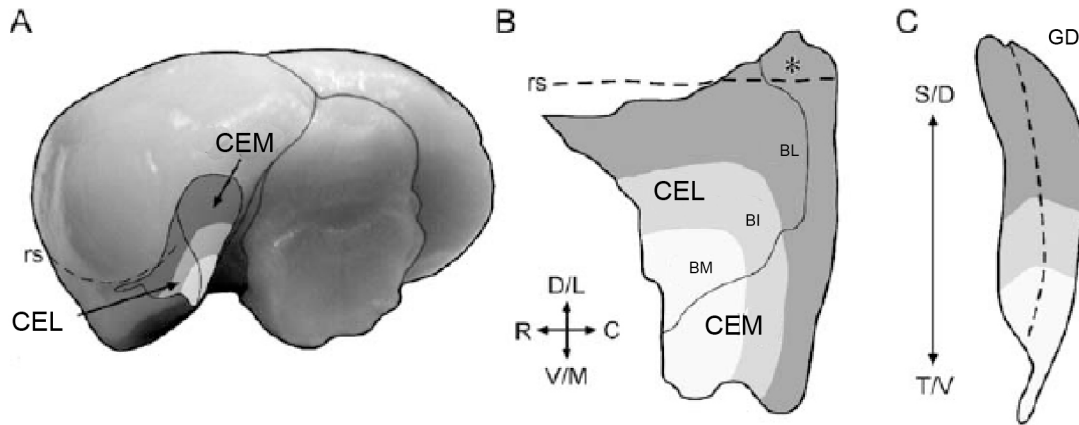


Figura 9. Esquema de la corteza entorrinal. A. Vista ventroposterior del cerebro de rata sin el cerebelo. La imagen muestra una sobreposición esquemática que muestra la posición de la corteza entorrinal lateral (CEL) y medial (CEM). En cada panel, la banda lateral (BL) se muestra en gris oscuro, la banda intermedia (BI) en gris, y la banda medial (BM) en gris claro. B. Mapa extendido de la superficie cortical de la corteza entorrinal. C. Mapa extendido del giro dentado (GD) mostrando la topografía de las proyecciones entorrinales. La proyección de las bandas se muestra con las tonalidades de gris. C, acudal; D, dorsal; L, lateral; M, medial; R, rostral; rs, sulco rhinal; S, septal; T, temporal; V, ventral. (Kerr *et al.* 2007).

La corteza entorrinal proyecta al BO, al AON, *tenia tecta ventral*, *indusium griseum*, corteza piriforme, núcleo endopiriforme, tubérculo olfatorio, cortezas amigdalinas y su principal objetivo de proyección es la formación hipocampal.

La corteza entorrinal lateral (CEL) recibe considerablemente más aferencias de la corteza piriforme y la corteza insular, y menos proyecciones de las cortezas visuales, parietales y retrospleniales. Adicionalmente, la CEL recibe considerables aferencias de la amígdala y estructuras olfativas. Dichos inputs, así como los provenientes de la corteza insular pueden participar proveyendo información no espacial acerca del contexto incluyendo el significado emocional (Kerr *et al.* 2007).

En contraste con la CEL, la corteza entorrinal medial (CEM) recibe sus principales aferencias de cortezas de asociación visuales, de la corteza parietal, de la corteza del cíngulo y del tálamo. La CEM proyecta a la corteza piriforme, corteza temporal ventral, corteza del cíngulo y corteza parietal (Kerr *et al.* 2007).

A partir de diversos estudios (Ferry *et al.* 1996; Ferry *et al.* 2006; Ferry *et al.* 2007) podemos concluir que la corteza entorrinal lateral tiene un papel importante en la memoria

olfativa a corto plazo al controlar la actividad GABAérgica de la amígdala basolateral por medio de eferencias colinérgicas (muscarínicas) y al ser la principal vía de entrada de información al hipocampo.

La corteza entorrinal y en específico su porción medial participa en la creación de mapas espaciales topográficos a través de las células “grid” (la ubicación de las células “grid” se muestra con un asterisco en la Figura 10) (Kerr *et al.* 2007).

La corteza periamigdalina proyecta a la corteza piriforme, la corteza entorrinal, el área infralímbica, la corteza insular ventral agranular y el área perirhinal.

Vías de integración del AAO

Una vez descritas las dos vías involucradas en el AAO es importante destacar las estructuras en dónde convergen ambas para poder hablar de una vía de la integración de este aprendizaje.

Como ya mencionamos, a partir de la transducción sensorial en el epitelio olfativo de la cavidad nasal, las neuronas olfativas primarias mandan sus axones a la capa glomerular del bulbo olfativo principal (BO). A partir del BO las neuronas mitrales envían sus axones directamente al tubérculo olfatorio, a la corteza piriforme, la corteza entorrinal y la amígdala (Isaacson 2010).

La información del malestar gástrico, inducido por LiCl, es llevada por el X par craneal (nervio vago) o por el área postrema al núcleo del tracto solitario (NTS) y luego al núcleo parabraquial lateral (IPBN), el cual se conecta con la amígdala y otras estructuras.

Debido a la convergencia de información olfativa y visceral, se considera que es en la amígdala y en específico en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) donde ocurre la asociación de ambos estímulos (Ferry y Di Scala 1997) (figura 11). Sin embargo, existe la posibilidad de que otras áreas (tálamo ventroposteromedial, hipotálamo lateral o incluso la corteza insular) también se encarguen de este procesamiento. Se considera que el alertamiento hacia un estímulo condicionado es el resultado de los cambios en los sistemas sensoriales primarios, mientras que el valor hedónico de esa memoria –acercamiento o evitación– involucra a la amígdala (Wilson y Sullivan 1994; Raineki *et al.* 2009). Una teoría alternativa señala que la amígdala desempeña una función moduladora en la formación de la memoria, facilitando su almacenamiento, y no almacenándola propiamente

(Wilson y Sullivan 1994). Parte de estos conocimientos, principalmente respecto al procesamiento del malestar visceral, se han tomado de experimentos que involucran al gusto y no al olor, o al complejo olor-gusto (sabor) por lo que aún se requieren más estudios para poder describir con precisión las estructuras de asociación en el AAO.

Además de la vía olfativa y emética, existen diversos sistemas de neurotransmisión involucrados que modulan la actividad de ambas vías. Las aferencias neuromoduladoras de las estructuras olfativas secundarias y primarias provienen de cuatro fuentes principales: el núcleo del rafé dorsal y medial (serotonina), el locus coeruleus (norepinefrina), la sustancia nigra y el área ventral tegmental (dopamina), y los núcleos del cerebro basal colinérgico o prosencéfalo basal (acetilcolina) (Wilson y Sullivan 1994). El sistema de neurotransmisión relevante para el presente estudio es el colinérgico debido a su participación en procesos de aprendizaje, memoria y atención (Linster y Hasselmo 2001).

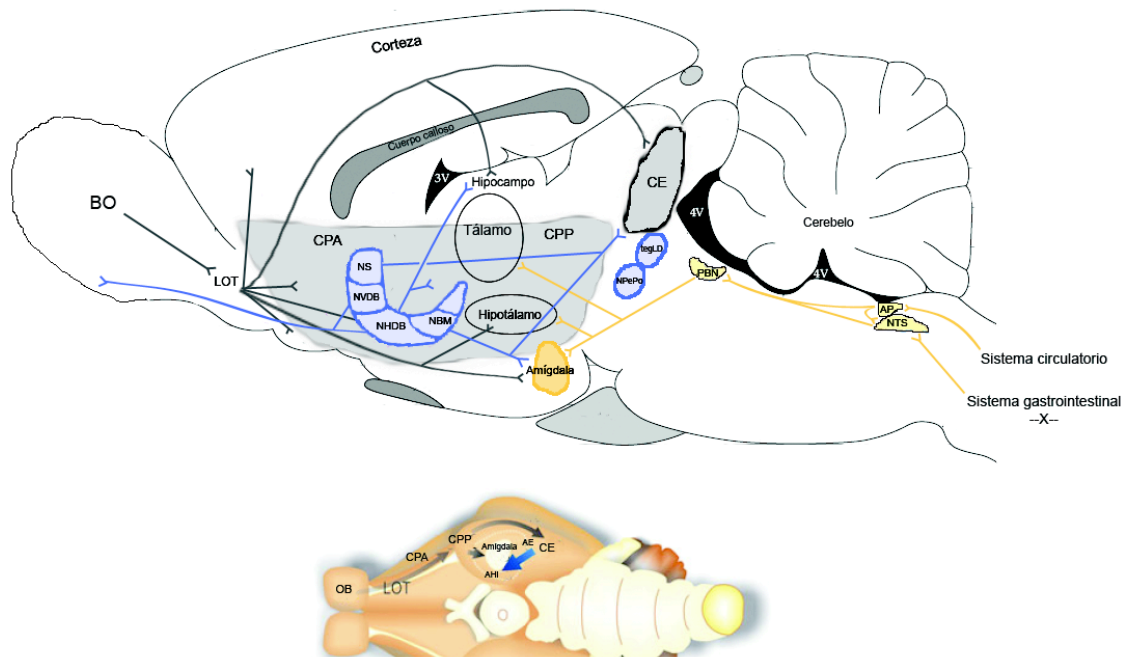


Figura 10. Vías de integración del AAO. La vía olfativa es representada en gris, la vía colinérgica en azul y la vía emética en amarillo. Abreviaciones: BO, bulbo olfatorio; LOT, tracto lateral olfativo; CPA, corteza piriforme anterior; CPP, corteza piriforme posterior; CE, corteza entorrinal; IPBN, núcleo lateral parabraquial; AP, área postrema; NTS, núcleo del tracto solitario; NS, núcleo septal; NVDB, brazo vertical de la banda diagonal de Broca; NHDB, brazo horizontal de la banda diagonal de Broca; NBM, núcleo basal magnocelular; tegLD, tegmental laterodorsal; NPePo, núcleo pedunculo pontino; AE, corteza amígdala entorrinal; Ahí, corteza amígdala hipocámpal.

Sistema colinérgico

Historia

La acetilcolina (ACh) fue la primera molécula identificada como neurotransmisor. En 1921, Otto Loewi confirmó la transmisión química del impulso nervioso con su clásico experimento en corazón de rana. La ACh es sintetizada en las terminales de los axones por la enzima colina acetiltransferasa, tomando como sustrato acetil coenzima A (del ciclo respiratorio de la mitocondria) y colina (una molécula obtenida de la dieta). La ACh es el neurotransmisor empleado por las neuronas motoras de la médula espinal y es liberada en las uniones neuromusculares. En el sistema nervioso autónomo es el transmisor para todas las neuronas preganglionares y para las posganglionares parasimpáticas. Además es un neurotransmisor fundamental en varias regiones del cerebro. Cuando un potencial de acción excita la terminal colinérgica, la ACh es liberada en la sinapsis donde interactúa con sus receptores (nicotínicos o muscarínicos); posteriormente es degradada por la enzima acetilcolinaesterasa, que se ubica generalmente en la membrana postsináptica produciendo los metabolitos acetato y colina (Kandel 2001).

Receptores colinérgicos

Existen dos tipos de receptores para ACh, los nicotínicos y los muscarínicos. Los receptores nicotínicos son ionotrópicos y se ubican tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico. En el SNC se localizan en posición presináptica donde modulan la liberación de neurotransmisor (Lucas-Meunier *et al.*, 2003). La carencia de antagonistas muy selectivos ha impedido la caracterización precisa de sus diferentes subtipos (Lucas-Meunier *et al.* 2003).

Por el contrario, los receptores muscarínicos son metabotrópicos. Inicialmente se identificaron en el SNC gracias al uso clínico de la gálamina como un agente preanestésico. Entonces, utilizando como parámetro la afinidad de un antagonista llamado pirenzepina, se demostró la existencia de varios subtipos, y se agruparon en dos clases: los tipo M1 con alta afinidad por la pirenzepina, y los tipo M2 con media a baja afinidad. Actualmente se conocen cinco receptores distintos (M1-M5), cuyos genes han sido clonados (m1-m5), y cuatro de ellos (M1-M4) han sido caracterizados farmacológicamente. Cada uno de ellos se

acopla a distintas proteínas G modulando, vía segundos mensajeros, la activación de canales iónicos.

Los de la familia M1 (M1, M3 y M5) se localizan principalmente a nivel postsináptico, mientras que los de la familia M2 (M2 y M4) se localizan en la presinapsis como autoreceptores implicados en la retro estimulación (Lucas-Meunier *et al.* 2003). Las rutas de señalización mediadas por proteínas G no están bien caracterizadas ya que se sabe que hay intercambios entre ellas y existe un gran número de proteínas que interaccionan con los receptores que hace difícil definir sus mecanismos de acción (Lucas-Meunier *et al.* 2003; Borroto-Escuela *et al.* 2012). De manera general podríamos decir que los receptores de tipo M1 se acoplan a la proteína $G_{\alpha q/11}$ que estimula la PLC y produce IP_3 o DAG, mientras que los receptores de tipo M2 se acoplan a la proteína $G_{\alpha i/o}$ que inhibe la AC y por consiguiente la producción de ATP (Brown 2010).

La farmacología selectiva incluye solamente antagonistas. No existen agonistas específicos para los subtipos particulares (aunque se ha utilizado arecolina como agonista no selectivo). Una gran cantidad de datos muestran que el bloqueo con escopolamina (antagonista no selectivo) induce deterioros en el aprendizaje y la memoria, mientras que drogas procolinérgicas, especialmente inhibidoras de la acetilcolinesterasa, pueden aminorar tales deterioros (Shiple y Ennis 1996). La pirenzepina y el biperideno son antagonistas selectivos para receptores M1 que se distinguen en que el primero no cruza la barrera hematoencefálica mientras que el segundo sí (Lucas-Meunier *et al.* 2003). Diversos trabajos en los que se han utilizado dichos antagonistas –en paradigmas no olfativos– han generado el consenso de que el bloqueo de M1 se relaciona con deterioro cognitivo, en tanto que el bloqueo de M2 induce mejoría, incluyendo la atenuación de los efectos provocados por bloqueo de M1, probablemente por incremento de la liberación de ACh (Quirion *et al.* 1995; Shiple y Ennis 1996).

A pesar de lo mencionado, todavía se considera que no existen drogas altamente selectivas, por lo cual sigue siendo difícil la interpretación de las funciones individuales (Wess 2004). La generación de cepas de ratones carentes de los genes (knockout) que codifican para los distintos receptores muscarínicos, en general indican lo mismo que los estudios farmacológicos, que los ratones carentes de m1 presentan deterioros cognitivos severos y por lo tanto se sostiene que realiza funciones críticas para el aprendizaje y la memoria.

Aquellos carentes de m2 muestran resultados contradictorios, pues a pesar de la información obtenida por medios farmacológicos, en estos ratones se observa deterioro del aprendizaje en pruebas de evitación pasiva, en memoria de trabajo medida en el laberinto circular de Barnes y en la prueba de retraso alternado en laberinto T (Wess 2004).

Sistemas colinérgicos del Sistema Nervioso Central y su innervación a estructuras de la vía olfativa

Los dos grandes sistemas colinérgicos del SNC son: el del prosencéfalo basal o cerebro basal anterior, conformado por los núcleos Ch1 (núcleo septal), Ch2 (brazo vertical de la banda diagonal de Broca), Ch3 (NHDB brazo horizontal de la banda diagonal de Broca), y Ch4 (*sustantia innominata* y núcleo basal magnocelular preóptico); y el del tallo cerebral, conformado por los núcleos Ch5 (núcleo pedunculopontino) y Ch6 (tegmental laterodorsal) (Lucas-Meunier *et al.* 2003) (ver figura 12).

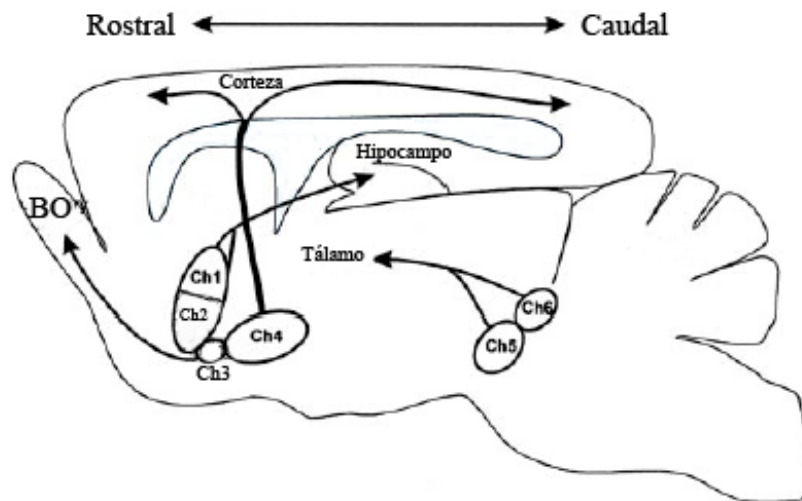


Figura 11. Vías colinérgicas centrales en el cerebro de rata. Modificado de Lucas-Meunier *et al.* (2003).

El sistema colinérgico inerva una gran extensión si no es que todo el sistema nervioso central. Cada uno de los núcleos colinérgicos inerva distintas estructuras y a pesar de que la mayoría de las neuronas colinérgicas se encuentran concentradas en los 6 núcleos principales, existen evidencias de presencia de neuronas colinérgicas en otras estructuras. En el caso de las estructuras olfativas, existen varios estudios que reportan no haber encontrado neuronas inmunopositivas para ChAT en el BO pero algunos autores han

observado neuronas ChAT+ en el BO de la rata (Kratskin y Belluzzi 2003). Sin embargo, el número de dichas neuronas es extremadamente bajo lo que sugiere que las fibras colinérgicas en el BO se originan principalmente de fuentes externas. La principal fuente de aferencias colinérgicas al BO es el brazo horizontal de la banda diagonal de Broca (NHDB) que también manda eferencias hacia la neocorteza y el hipocampo. El NHDB en ratas se divide en dos compartimientos, el compartimiento medio que contiene células de tamaño pequeño y medio, y el compartimiento lateral compuesto de neuronas grandes y comúnmente conocido como núcleo magnocelular preóptico. En la rata, el NHDB contiene aproximadamente 20% de neuronas colinérgicas de proyección al BO y la mayoría de ellas se localizan en la porción rostral del compartimiento medio del NHDB (Kratskin y Belluzzi 2003).

Las fibras colinérgicas del NHDB llegan al bulbo olfatorio ipsilateral a través del haz prosencefálico medial y el tracto lateral olfativo, ambos tienen proyecciones restringidas y sin solapamiento. Las fibras colinérgicas terminan en la capa glomerular, EPL y en un menor grado, en la capa plexiforme interna y la capa granular. Estudios ultraestructurales han demostrado que las fibras colinérgicas hacen sinapsis principalmente con las dendritas y somas de las neuronas intrínsecas (células PG, de axón corto, GRC y con neuronas en penacho externas) (Kratskin y Belluzzi 2003).

Tanto los receptores muscarínicos como los nicotínicos se expresan en el BO (ver ANEXO 1). La EPL tiene la más alta concentración de receptores muscarínicos en el cerebro. La capa glomerular contiene una densidad baja de receptores muscarínicos. En contraste, los receptores nicotínicos se concentran en capas más superficiales del BO incluyendo la capa glomerular. A nivel ultraestructural, los dos tipos de receptores muscarínicos se encuentran en neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas que reciben información de las OSN, en las dendritas de las células granulares en la capa EPL, y en las somas y dendritas de células profundas de axón corto (Kratskin y Belluzzi 2003). Existe una pequeña contribución de fibras colinérgicas que provienen del brazo vertical de la banda diagonal de Broca, *sustancia inominata* y globo pálido ventral (Kratskin y Belluzzi 2003).

Por otro lado, la corteza entorrinal recibe una inervación colinérgica profusa del núcleo basal magnocelular y el séptum que terminan principalmente en las capas II y V quienes representan el input y output del hipocampo respectivamente (Xiao *et al.* 2009).

La principal inervación colinérgica a la amígdala proviene del Ch4 *substantia innominata* y núcleo basal magno celular y se ha reportado que se expresan receptores M1, M2, M3 y M4 (McDonald y Mascagni 2010).

El interés en las funciones de los sistemas colinérgicos centrales incrementó enormemente a partir de las demostraciones neuropatológicas de la reducción de marcadores colinérgicos en la corteza cerebral en personas que habían muerto padeciendo la enfermedad de Alzheimer, y que este decremento correlacionaba con el grado de deterioro cognitivo (Everitt y Robbins 1997; Gold 2003). Además de la enfermedad mencionada, en otros desórdenes caracterizados por deterioro de la memoria (enfermedad de Parkinson, de Creutzfeldt-Jacob, síndrome de Down, de Korsakoff, etc.) también se ha encontrado degeneración del sistema colinérgico del cerebro basal anterior (Zola-Morgan y Squire 1993; Everitt y Robbins 1997; Castillo *et al.* 1999; Lucas-Meunier *et al.* 2003).

Actualmente sabemos que la ACh actúa en varias funciones cognitivas, tales como atención, aprendizaje y memoria. Además participa en procesos de sueño, vigilia y modulación cortical de la información sensitiva (Gold 2003; Lucas-Meunier *et al.* 2003; Klinkenberg y Blokland 2010). Existe evidencia de que estas acciones son ejercidas controlando la relación señal/ruido del procesamiento sensitivo (Everitt y Robbins 1997; Lucas-Meunier *et al.* 2003). En general, todas las evidencias han llevado a señalar que interferir las funciones colinérgicas impide el aprendizaje y que facilitarlas lo promueve (Gold 2003). Se ha sugerido que el proceso cognitivo más importante en el que interviene la ACh es la atención (Woolf 1998; Pepeu y Giovannini 2004). Lo anterior debido a los resultados en experimentos de microdiálisis (Pepeu y Giovannini, 2004), en adquisición de tareas operativas simples, donde los incrementos de liberación de ACh cortical se limita a los momentos iniciales, cuando la demanda de procesos de atención son altos. La estimulación visual, auditiva, olfativa y táctil incrementa la liberación de ACh en la corteza cerebral primaria correspondiente y en el hipocampo. Así, se ha supuesto que el sistema colinérgico se activa en respuesta a la entrada sensorial de cualquier tipo (Pepeu y Giovannini 2004).

Etapas del aprendizaje y Acetilcolina

Respecto a las etapas del aprendizaje en las que interviene la ACh, existen demostraciones de que es esencial para la adquisición de una nueva tarea y para su consolidación, pero no para su evocación. En el paradigma de condicionamiento aversivo al sabor, el bloqueo temporal por la administración de tetrodotoxina en el núcleo basal magnocelular (Ch4) previo a la adquisición de los estímulos impide la aversión, mientras que la administración previa a la evocación no tiene efectos (Miranda y Bermudez-Rattoni 1999). Jerusalinsky *et al.* (1997) encuentran que la administración de escopolamina vía sistémica, o directamente en la amígdala, en el septo medial o en el hipocampo, poco tiempo después del entrenamiento –una vez que ha pasado la etapa de adquisición y comenzado la consolidación– causa amnesia en el paradigma de evitación pasiva (“step-down inhibitory avoidance”). Sus resultados los llevan a argumentar que la neurotransmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos es necesaria para la consolidación. Por otro lado, existen trabajos en los que la MLP para una tarea de discriminación espacial requiere de tres horas para volverse resistente a los efectos amnésicos de la administración de escopolamina (Woolf 1998), implicando cierta participación colinérgica durante ese tiempo.

Como vimos al inicio de este apartado, Miranda *et al.* (1999) concluyen que la transmisión colinérgica no es necesaria para la evocación del condicionamiento aversivo gustativo. Sin embargo, Woolf (1998) refiere varios trabajos que contradicen los resultados de Miranda Y Bermudez-Rattoni. Menciona un trabajo en humanos, en el que la administración sistémica de escopolamina interfiere la evocación de objetos en un paradigma de libre evocación (Rusted y Warburton, 1989; revisado en Woolf 1998). Menciona también estudios en animales con resultados de interferencia de la evocación ocasionada por administración de escopolamina así como por lesión del cerebro basal anterior (Beatty y Bierley 1986; Molinengo 1993; revisados en Woolf 1998). Empleando abejas como sujetos experimentales, Cano-Lozano y Gauthier (1998) realizan un paradigma de condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de la probóscide que consiste en la estimulación de las antenas con esencia de vainilla seguida de estimulación con una gota de agua azucarada a la misma antena, lo cual provoca la extensión de la probóscide; entonces se le permite a la abeja tomar del agua azucarada por tres segundos; en subsecuentes presentaciones de la esencia sola, la abeja que aprendió extenderá la probóscide. Mediante

este paradigma Cano-Lozano y Gauthier demuestran que la administración de escopolamina, así como de atropina (ambos bloqueadores de todos los subtipos de receptores muscarínicos) diez minutos antes de la prueba de evocación induce su deterioro; en las mismas condiciones experimentales, la pirenzepina no bloquea la evocación (Cano-Lozano y Gauthier 1998).

Por lo tanto, con base en la información revisada, no podemos concluir que la participación de la transmisión colinérgica se limite a la etapa de adquisición de la información, como algunos autores han sugerido.

Aprendizaje olfativo y Acetilcolina

A pesar de que los estudios a nivel conductual han revelado la importancia de las eferencias colinérgicas en la memoria olfativa, los sitios y mecanismos de acción siguen sin estar bien definidos. En la mayoría de los estudios farmacológicos se han utilizado agonistas colinérgicos generales (ACh), agonistas muscarínicos no selectivos (arecolina) y antagonistas muscarínicos no selectivos (escopolamina, atropina) (Everitt y Robbins 1997; Castillo *et al.* 1999; Wess 2004). Los estudios de aprendizaje olfativo que incluyen agentes colinérgicos se han realizado principalmente en modelos de contexto social o reproductivo (Lévy *et al.* 1997; Anglade *et al.* 1999) que sabemos requieren principalmente del procesamiento del sistema olfativo accesorio.

Doty *et al.* (2003) demostraron que al administrar sistémicamente ESC las ratas no presentaron una disminución de la sensibilidad a etil éster ni una disminución en el desempeño de la tarea conductual. Por otro lado, Lévy *et al.* (1997) observaron que la administración sistémica de ESC en ovejas no afectaba el rechazo de alimento contaminado con heces de perro. Por su parte, Wirth *et al.* (2000) lesionaron las vías colinérgicas que inervan al BO con IgG-saporina y probaron la discriminación de olor a avellana y vainilla, sin observar deterioro.

Carballo-Máquez *et al.* (2007) reportaron que la microinfusión de ESC en la corteza infralímbica inmediatamente después del EC en una tarea de discriminación olfativa producía un deterioro en la retención medida por el número de errores a las 24 horas y al igual que Doty *et al.* (2003) no encontraron problemas perceptuales ocasionados por la ESC.

El bloqueo de los receptores muscarínicos tiene un efecto negativo tanto en la memoria asociativa como en la no asociativa (Hunter y Murray 1989; Ravel *et al.* 1992). Un estudio relevante, debido a la semejanza con nuestro acercamiento farmacológico, es el de Ravel *et al.* (1994), quienes administran escopolamina intraperitoneal, y encuentran deterioro de memoria de corto plazo en una tarea de pareo retrasado (“delayed matching”) con olores.

Estudios fisiológicos *in vitro* demostraron que un agonista muscarínico reduce la adaptación de la tasa de disparo de las neuronas piramidales en la corteza piriforme después de una estimulación repetida (Barkai y Hasselmo 1994), suprime selectivamente la activación sináptica de las células piramidales por las fibras de asociación (Hasselmo y Bower 1992), e incrementa la plasticidad sináptica de la corteza piriforme (Hasselmo y Barkai 1995). La inhibición de las fibras asociativas mediada por la activación de los receptores muscarínicos se ha replicado *in vivo* al estimular el brazo horizontal de la banda diagonal de Broca para producir la liberación de ACh en la corteza piriforme (Linster y Hasselmo 2001). Al aplicar escopolamina (antagonista no selectivo muscarínico) sistémicamente y en la superficie de la corteza piriforme, se reduce la discriminación de olores al incrementar la habituación cruzada (Wilson 2001). Los estudios anteriores sobre los efectos de la ACh en la función de la corteza piriforme sugieren que la ACh reduce la interferencia entre patrones similares de input olfativo, mejorando la discriminación de olores y el reconocimiento de olores aprendidos (Hasselmo 2006).

A pesar de la información respecto a la modulación colinérgica en tareas de discriminación en el BO y la corteza piriforme, aún se desconoce el significado funcional de la modulación colinérgica de los mecanismos de formación de la memoria y más específicamente del AAO. Muchos consideran que al estudiar el efecto de las manipulaciones colinérgicas durante AAS estamos describiendo a su vez el efecto en el AAO, pero como ya hemos descrito, existen diferencias anatómicas, funcionales e incluso ecológicas que nos llevan a cuestionarnos el papel del sistema colinérgico en el AAO.

II. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN

La ACh participa en procesos de atención, aprendizaje y memoria pero aún se carece de estudios que evalúen la participación de la ACh en el AAO. En vista de que diversas estructuras primarias y secundarias de la vía olfativa (BO, corteza piriforme, amígdala y corteza entorrinal) reciben una profusa inervación colinérgica, resulta importante analizar el papel de la ACh a lo largo de las distintas etapas del AAO.

Por lo tanto, el **objetivo** de este proyecto es caracterizar el papel de la acetilcolina y en específico de los receptores muscarínicos en el AAO mediante el bloqueo de los receptores en las distintas etapas de este condicionamiento.

La importancia de este estudio radica en aportar las primeras evidencias experimentales sobre la participación de los receptores muscarínicos durante el AAO. Esto nos permitirá integrar nuestros hallazgos con lo que se sabe del componente gustativo, es decir del AAS, además de compararlos con otras formas de aprendizaje olfativo o estados patológicos.

III. HIPOTESIS

H1: El antagonismo no selectivo de los receptores muscarínicos aumentará el índice de preferencia en la adquisición y evocación del AAO.

H2: El antagonismo selectivo de los receptores M1 aumentará el índice de preferencia en la adquisición y evocación del AAO.

IV. MÉTODO

Animales

Para realizar los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300g) provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM (n= ~10). Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (12 horas luz / 12 horas oscuridad) controladas. Fueron privadas de agua 24 horas antes del inicio del protocolo conductual y tuvieron acceso *ad libitum* a alimento. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales siguieron la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH).

En cada experimento procuramos mantener una n de aproximadamente 10 ratas excepto en casos donde algunos individuos murieron debido a infecciones previas o tuvimos más sujetos debido a que nos suministraron más animales en el bioterio.

Dispositivos de Pruebas Conductuales

Se utilizaron cajas de acrílico rectangulares de 50x40x18.5cm, con 4 perforaciones circulares de 1.8 cm de diámetro en los lados largos, situadas a 4.5 cm de la arista y a 11 cm de altura desde la base (ver ANEXO 2). Al exterior de estos orificios se colocaron cilindros de plástico de tres cm de diámetro conteniendo los papeles filtro circulares embebidos de olor (en los casos correspondientes). El agua se colocó en pipetas graduadas de 10 mL sostenidas verticalmente por barras de acrílico, con la punta a 2 cm frente a las perforaciones de la caja. Esta disposición permite la exposición continua al olor durante el consumo de agua. Las pruebas se realizaron en una habitación separada del bioterio, aislada acústicamente y con extractor de aire (encendido entre sesiones).

Condicionamiento

Como mencionamos anteriormente, las ratas se privaron de agua 24 horas previas al experimento. El día 1, se les permitió beber agua simple en las cajas de condicionamiento (habitación). El segundo día se les permitió beber agua en presencia de olor a vainilla sin consecuencias viscerales (olor inocuo, OI). El tercer día (sesión de condicionamiento) se les dio agua en presencia de olor a almendra (olor aversivo, OA); cinco minutos después se les administró por vía intraperitoneal (ip) LiCl 0.15M, en un volumen de 2% de su peso corporal, como agente inductor de malestar visceral; las pruebas de memoria a corto plazo (MCP) se hicieron 4 horas después de la sesión de entrenamiento permitiéndoles beber agua en presencia de ambos olores (OI contra OA) colocados al azar en las cuatro tapas cercanas a los bebederos. El día 4 (recuperación) se les ofreció agua nuevamente, y el día 5 (48 horas post-entrenamiento), se hizo la prueba de memoria a largo plazo (MLP) de la misma manera que la prueba a corto plazo. Se registró la cantidad de agua consumida en cada pipeta durante 10 min (ver ANEXO 2).

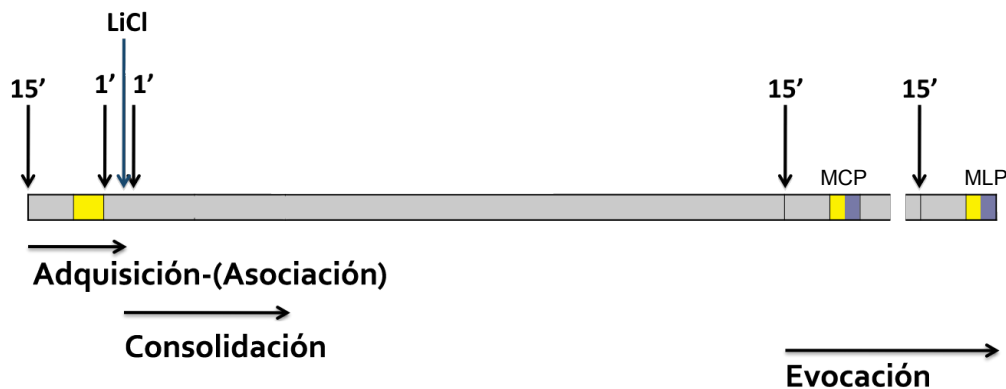


Figura 12: Esquema que muestra los diferentes momentos de administración. Los cuadros amarillos denotan la presentación del olor a almendra y los azules a vainilla. 15 minutos de la presentación del olor a vainilla (adquisición), inmediatamente después del olor a vainilla y antes del LiCl. (asociación), inmediatamente después del LiCl (consolidación), y finalmente 15 minutos antes de las pruebas de memoria a corto plazo (MCP 4 horas) y a largo plazo (MLP 48 horas) (evocación).

Análisis de datos

A partir del registro de la cantidad de agua consumida se obtuvo un índice de preferencia (IP) al olor aversivo mediante la fórmula siguiente: $IP (\%) = [ml\ OA / (ml\ OI + ml\ OA)] \times 100$, donde OA: olor aversivo (almendra), OI: olor inocuo (vainilla). Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguidas de la prueba *post hoc* de Dunnet contra el grupo control (0mg/Kg) o de múltiples comparaciones de Newman-Keuls (* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$). Los análisis estadísticos fueron realizados después de comprobar que los datos cubrieran los supuestos de cada una de las pruebas.

V. RESULTADOS

En la figura 13 podemos observar el efecto típico del AAO en la preferencia al olor a almendras. La barra sin condicionar demuestra que no existe una preferencia por ninguno de los olores empleados en nuestros experimentos como se puede observar por el índice de preferencia cercano a 50% ($IP = (\text{agua cerca al olor a almendra} / \text{agua total}) \times 100$). Por otro lado, al realizar los procedimientos para establecer un AAO y condicionar a las ratas podemos observar una disminución del índice de preferencia del olor a almendras lo que

demuestra una aversión. Mientras más cercano se encuentre el índice de preferencia a 0 mayor será la aversión y mientras más se acerque a 50 menor será la aversión lo cual indicaría que no aprendió.

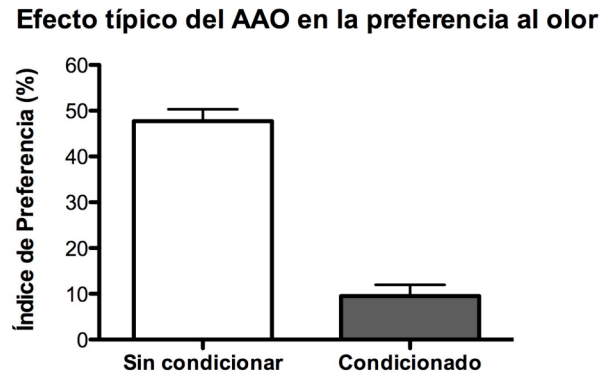


Figura 13. Efecto del AAO sobre la preferencia del olor a almendras. Se grafica media \pm EEM.

FASE 1 Efecto del bloqueo sistémico de los receptores muscarínicos sobre las distintas etapas del AAO

Serie experimental 1. Grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de escopolamina (ESC, 0, 5 y 10 mg/kg, disuelta en solución salina fisiológica) en las distintas etapas del proceso de aprendizaje (ver figura 13):

- 15 min antes (**adquisición**; experimento 1.1);
- inmediatamente después del estímulo condicionado (**asociación**; experimento 1.2);
- inmediatamente después del estímulo incondicionado (**consolidación**; experimento 1.3),
- 15 min antes de la prueba de **evocación** a corto plazo a las 4hrs (experimento 1.4);
- 15 min antes de la prueba de **evocación** a largo plazo a las 48 hrs (experimento 1.5);
- y
- 15 minutos antes de la prueba de **evocación** a las 4 horas y evocación tanto a las 4 como a las 48 horas (experimento 1.6).

A partir de esta serie experimental se determinaron las dosis efectivas de escopolamina y las etapas sensibles al bloqueo de los receptores muscarínicos.

En el experimento 1.1 observamos un efecto amnésico provocado por la inyección de 5 y 10 mg/Kg de escopolamina ip sobre la adquisición (ver figura 14). La dosis de 5 mg/Kg puede ser considerada como la dosis efectiva ya que la dosis de 10 mg/Kg no aumenta el efecto amnésico, pero decidimos utilizar ambas dosis para los experimentos posteriores debido a que Shimura *et al.* (1995) en la corteza insular e Inglis *et al.* (1994) en la corteza frontal describen una mayor liberación de ACh al presentar el estímulo condicionado, por lo que necesitaríamos una mayor cantidad de antagonista para competir con el aumento de la liberación de acetilcolina.

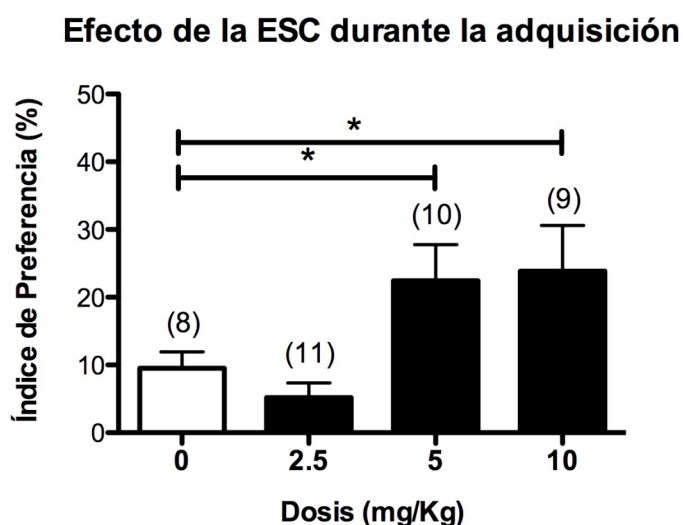


Figura 14. Efecto de la ESC sobre la adquisición. Se administró escopolamina 15 min antes del estímulo olfativo para evaluar su efecto sobre la adquisición. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnett contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

Experimento 1.2 (asociación): no observamos ningún efecto al administrar 5 o 10 mg/Kg de escopolamina inmediatamente después del estímulo condicionado (ver figura 15).

Efecto de la ESC durante la asociación

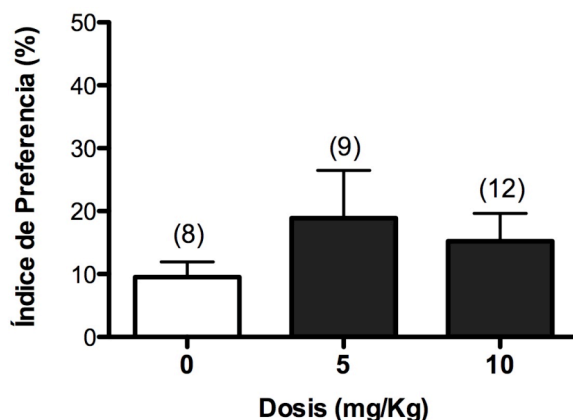


Figura 15. Efecto de la ESC sobre la asociación. Se administró escopolamina inmediatamente después del estímulo olfativo y antes del LiCl para evaluar su efecto sobre la asociación de estímulos. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM.

Experimento 1.3 (consolidación): Al igual que el experimento anterior no observamos ningún efecto al inyectar 5 y 10 mg/Kg inmediatamente después de la inyección de cloruro de litio para probar la consolidación (ver figura 16).

Efecto de ESC durante la consolidación

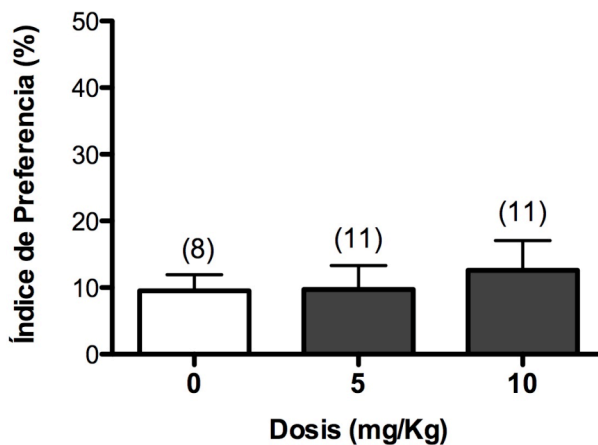


Figura 16. Efecto de la ESC sobre la consolidación. Se administró escopolamina inmediatamente después del LiCl para evaluar el efecto sobre la consolidación. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM.

Experimento 1.4 (corto plazo 4 horas) y Experimento 1.5 (largo plazo 48 horas): Al inyectar escopolamina 15 minutos antes de las pruebas de evocación encontramos déficit

significativo en la prueba de memoria de corto plazo (ver figura 17) y una tendencia similar en la memoria a largo plazo. Cuando realizamos la inyección 15 minutos antes de la prueba de corto plazo y evocamos tanto a corto como a largo plazo el déficit significativo se mantuvo en ambas pruebas de memoria (ver figura 18).

Efecto de la ESC durante la evocación

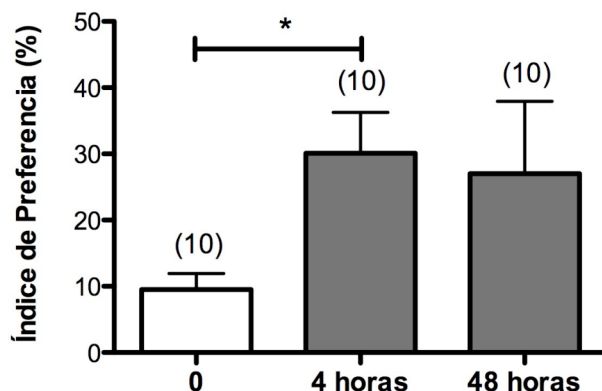


Figura 17. Efecto de la ESC sobre la evocación. Se administró 10mg/Kg de escopolamina 15 min antes de la prueba de evocación a corto plazo (4 horas) y largo plazo (48 horas) para evaluar su efecto sobre la evocación. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

Efecto de la ESC antes del EI y evocación a las 4 y 48 horas

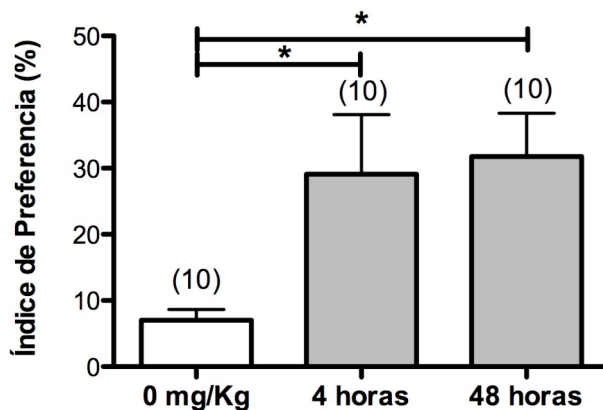


Figura 18. Efecto de la ESC a las 4 horas con evocación a las 4 y 48 horas. Se administró 10mg/Kg de escopolamina 15 min antes de la prueba de evocación a corto plazo (4 horas) y se evocó tanto a corto (4 horas) como a largo plazo (48 horas) para evaluar la permanencia del efecto sobre la evocación a corto plazo. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

Existía la posibilidad de que el efecto significativo durante la adquisición se debiera a un efecto conocido como aprendizaje dependiente de estado donde los animales deben de estar en el mismo estado psicofisiológico en el que adquirieron la información para poder evocarla.

Experimento 2 El efecto de la administración de escopolamina en la adquisición no es un aprendizaje dependiente de estado.

Un grupo de 10 ratas recibió una inyección intraperitoneal de escopolamina (10 mg/Kg ip) 15 minutos antes de la presentación del estímulo condicionado, una inyección de solución salina en la prueba de evocación a las 24 horas, una inyección de escopolamina 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 48 horas, y finalmente una inyección de solución salina 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 72 horas. Esta manipulación se hizo con el objeto de corroborar que el efecto amnésico de la escopolamina se debe a la incapacidad de adquirir la información y no a la incapacidad de evocarla sin estar bajo el efecto de dicha droga.

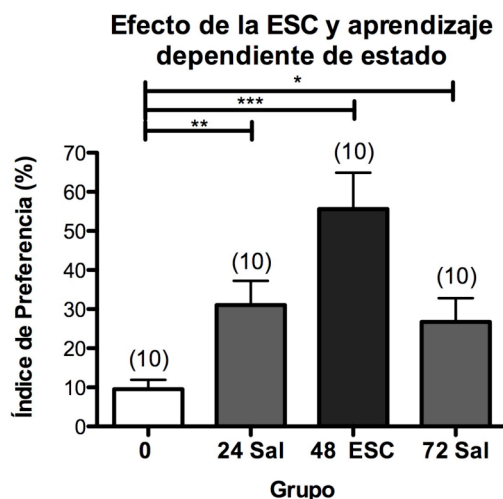


Figura 19. ESC y aprendizaje dependiente de estado. Se administró 10mg/Kg de ESC 15 min antes del estímulo olfativo durante la adquisición y 15 min antes de la prueba de evocación a largo plazo (48 horas) para evaluar la dependencia de estado. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$.

Descartamos que los resultados encontrados con la inyección durante la adquisición en el experimento 1.1 se debieran a un efecto dependiente de estado al realizar la inyección de ESC antes de la adquisición y antes de la evocación a las 48 horas. Como se puede ver en la figura 19, al administrar ESC antes de la adquisición y evocar a las 24 horas después del estímulo condicionado aumenta el índice de preferencia (segunda barra de izquierda a derecha), lo cual concuerda con los resultados del experimento 1.1. Al volver a administrar ESC 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 48 horas (tercer barra de izquierda a derecha) el índice de preferencia aumenta hasta un ~50%. Al volver a evocar a las 72 horas sin administrar ESC, observamos que el índice de preferencia regresa a los mismos valores obtenidos al administrar ESC antes de la adquisición.

Los principales hallazgos de la fase 1 durante la adquisición y la evocación pudieron deberse a una interferencia de la ESC el malestar visceral provocado por el LiCl. Debido a lo anterior realizamos la fase 2 del presente proyecto con el propósito de evaluar los efectos del antagonismo periférico de los receptores muscarínicos en el AAO.

FASE 2 Contribución del bloqueo periférico de los receptores muscarínicos en el AAO

Experimento 3.1 Existe una tendencia a desaparecer el efecto amnésico provocado por la ESC (antagonista) al inyectar carbacol (agonista).

Grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de escopolamina (antagonista muscarínico no selectivo) y distintas dosis de carbacol (agonista muscarínico no selectivo que no cruza la barrera hematoencefálica) (ESC 10 mg/Kg y CCh 0, 0.1, 1, 10 mg/Kg), disueltas en solución salina fisiológica durante la adquisición 15 minutos antes del estímulo condicionado.

Para comprobar que el efecto amnésico se debía principalmente al antagonismo de los receptores muscarínicos periféricos realizamos un experimento de agonismo-antagonismo en donde mantuvimos constante la concentración de ESC (antagonismo) y administramos dosis crecientes de carbacol (agonismo).

El efecto que observamos fue una disminución paulatina del índice de preferencia sin que llegase a ser significativa la diferencia, aunque la tendencia es muy clara (ver figura 20). Lo anterior nos llevó a probar los efectos del antagonismo periférico de los receptores muscarínicos mediante la mESC.

Efecto de varias dosis de Carbacol y 10 mg/Kg ESC durante la adquisición

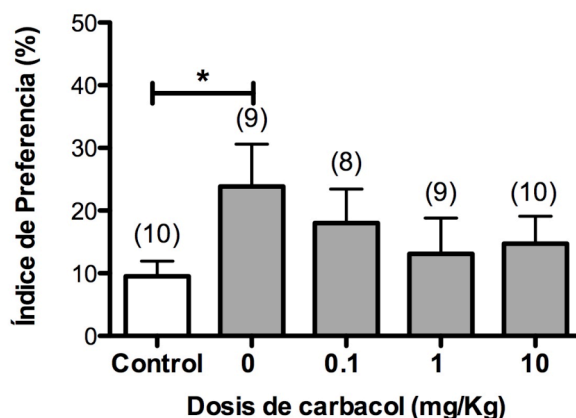


Figura 20. Efecto de la ESC y distintas dosis de carbacol sobre la adquisición (agonismo/antagonismo). Se coadministraron distintas dosis de carbacol y la misma dosis de ESC (10 mg/Kg) 15 min antes de del estímulo olfativo. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

Experimento 3.2.1 y 3.2.2 La mESC produce el mismo efecto amnésico que la ESC durante la adquisición pero no durante la evocación

Grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de metil escopolamina (mESC, 0, 0.1, 1 y 10 mg/Kg, disuelta en solución salina fisiológica):

- 15 minutos antes del estímulo condicionado (adquisición; experimento 3.2.1); y
- 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 4 horas y 48 horas (experimento 3.2.2).

El control farmacológico más adecuado del efecto de la ESC sobre el sistema nervioso central es la mESC ya que no pasa la barrera hematoencefálica y por ende su efecto se restringe a la periferia del sistema.

Al inyectar 10 mg/Kg de mESC ip. durante la adquisición (experimento 3.2.1) observamos una deficiencia significativa en el índice de preferencia (ver figura 21), sin embargo al inyectar 20 mg/Kg antes de la evocación a las 4 y 48 horas (experimento 3.2.2) no observamos ningún efecto (ver figura 22).

Efecto de la mESC durante la adquisición

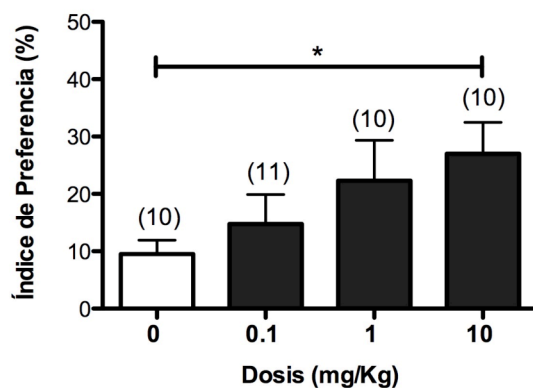


Figura 21. Efecto de la mESC sobre la adquisición. Se administraron varias dosis de mESC 15 min antes del estímulo olfativo para evaluar su efecto sobre la adquisición. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

Efecto de mESC durante la evocación a las 4 y 48 horas

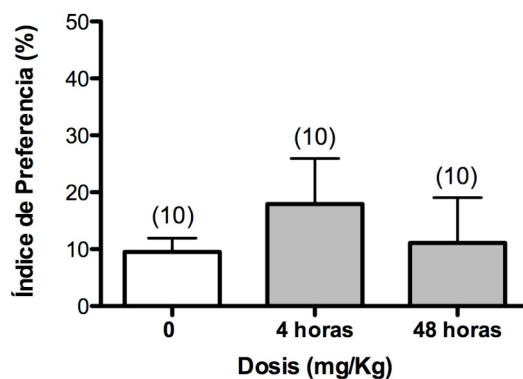


Figura 22. Efecto de la mESC sobre la evocación. Se administró 20mg/Kg de mESC 15 min antes de la prueba de evocación a corto (4 horas) y largo plazo (48 horas) para evaluar su efecto sobre la evocación. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM.

Una vez descritos los efectos periféricos y centrales del bloqueo de los receptores muscarínicos durante el AAO, proseguimos a evaluar si dichos efectos se debían a los receptores M1.

FASE 3 Efecto del bloqueo sistémico de los receptores muscarínicos M1 sobre la adquisición y evocación del AAO

Experimento 4.1 y 4.2 El antagonismo de los receptores M1 no produce ningún efecto sobre la adquisición del AAO.

Grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de biperideno (BIP, 0, 10 y 20 mg/Kg, disuelta en solución salina fisiológica):

- 15 minutos antes del estímulo condicionado; y
- 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 4 horas y 48 horas.

Al administrar BIP (antagonista de los receptores M1) que cruza la barrera hematoencefálica, no encontramos efectos significativos en la adquisición del aprendizaje pero se puede observar una tendencia en la curva dosis-respuesta de la figura 23.

Efecto del biperideno (M1) durante la adquisición

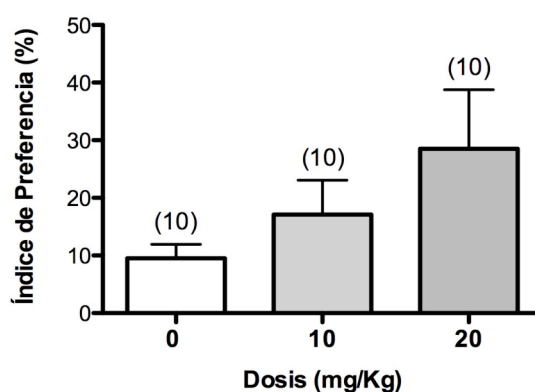


Figura 23. Efecto del BIP sobre la adquisición. Se administraron distintas dosis de BIP 15 min antes del estímulo olfativo para evaluar su efecto sobre la adquisición. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM.

Al igual que en el experimento 4.1, en el experimento 4.2 grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de pirenzepina (PIR, 0, 10 y 20 mg/Kg, disuelta en solución salina fisiológica):

- 15 minutos antes del estímulo condicionado; y
- 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 4 horas y 48 horas.

Al igual que con el BIP, al administrar pirezepina (antagonista de los receptores tipo M1) que no cruza la barrera hematoencefálica tampoco encontramos efectos significativos y a diferencia de la curva dosis-respuesta del BIP no se observa una relación directamente proporcional como se puede observar en la figura 24.

Efecto de la pirenzepina (M1) durante la adquisición

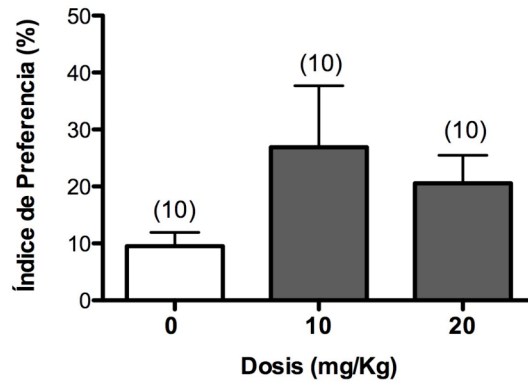


Figura 24. Efecto de la PIR sobre la adquisición. Se administraron distintas dosis de PIR 15 min antes del estímulo olfativo para evaluar su efecto sobre la adquisición. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM.

Experimento 4.3 El antagonismo de los receptores muscarínicos centrales durante la memoria a corto plazo produce un efecto amnésico significativo en la memoria a largo plazo.

Grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de BIP (BIP, 20 mg/Kg, disuelto en solución salina fisiológica) o pirenzepina (PIR, 20 mg/Kg, disuelta en solución salina fisiológica) 15 minutos antes de la prueba de evocación a corto plazo y evocadas tanto a las 4 horas como a las 48 horas.

La inyección de ambos antagonistas M1 15 minutos antes de la prueba de evocación a corto plazo no produjo ningún efecto significativo durante la evocación a las 4 horas ni existen diferencias entre los grupos de ambos fármacos. Al volver a someter al mismo grupo de ratas a la prueba de evocación a las 48 horas observamos un efecto amnésico significativo en el grupo al que se le administró BIP, mientras que el grupo al que se le administró PIR permanece sin cambios como se puede observar en la figura 25.

Efecto de antagonistas M1 durante la evocación a las 4hr en la memoria a corto y largo plazo

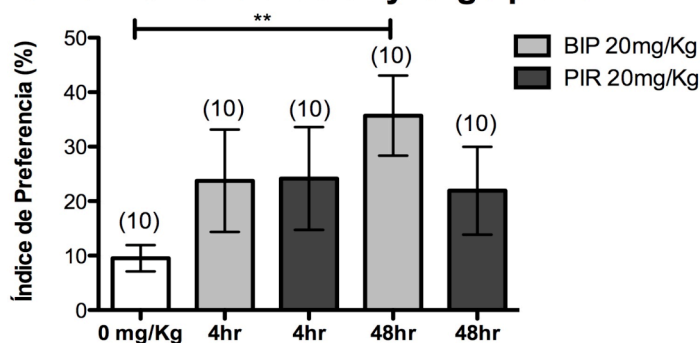


Figura 25. Efecto de los antagonistas M1 sobre la evocación a corto plazo. Se administraron antagonistas M1 (BIP y pirenzepina) 15 min antes de la prueba de evocación a corto plazo (4 horas) y evocados tanto a corto como a largo plazo (48 horas) para evaluar la permanencia del efecto sobre la evocación a corto plazo. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnett contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. ** = $p \leq 0.01$.

Experimento 4.4 El antagonismo de los receptores muscarínicos M1 centrales tiene un efecto amnésico en la memoria a largo plazo

Grupos independientes de 10 ratas recibieron inyecciones intraperitoneales de BIP (BIP, 20 mg/Kg, disuelta en solución salina fisiológica) o pirenzepina (PIR, 20 mg/Kg, disuelta en solución salina fisiológica) 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 48 horas.

Se administró BIP y PIR 15 minutos antes de la prueba de evocación a las 48 horas para evaluar su efecto sobre la memoria a largo plazo. Como se puede ver en la figura 26, sólo el BIP provoca una pérdida significativa de la capacidad de evocar la memoria adquirida normalmente.

Efecto de antagonistas M1 en la memoria a largo plazo

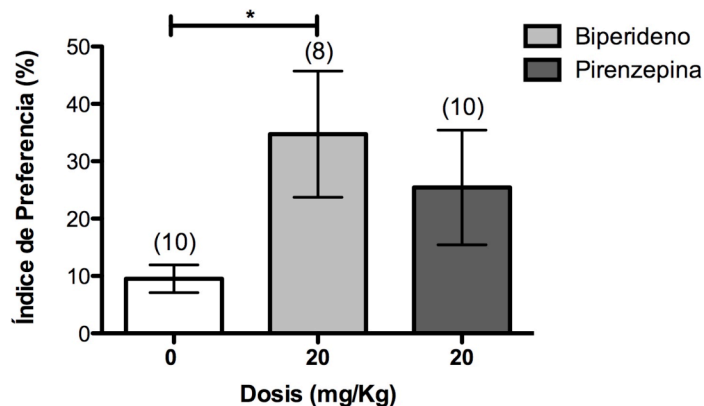


Figura 26. Efecto de los antagonistas M1 sobre la evocación a largo plazo. Se administraron antagonistas M1 (BIP y PIR) 15 min antes de la prueba de evocación a largo plazo (48 horas) para evaluar su efecto sobre la evocación. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Dunnet contra el grupo control (0mg) ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

VI. DISCUSIÓN

Son dos los hallazgos principales de nuestra investigación: el primero es que la neurotransmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos, principalmente M1, es necesaria para la fase de adquisición y evocación (tanto a corto como a largo plazo), pero no para la asociación de los estímulos ni para la consolidación de la memoria, en el modelo de AAO; el segundo es que el bloqueo de receptores muscarínicos fuera de la barrera hematoencefálica deteriora la adquisición en un modelo de AAO.

Los receptores muscarínicos participan en la adquisición y evocación del AAO.

Nuestros resultados concuerdan con las descripciones de la literatura general sobre la participación de los receptores muscarínicos en procesos de aprendizaje y memoria (para una revisión, (van der Zee y Luiten 1999). Diversos estudios, incluyendo algunos en el condicionamiento de aversión gustativa, modelo similar al AAO, demuestran que el bloqueo muscarínico con ESC durante la adquisición deteriora el aprendizaje (Inglis *et al.* 1994; Naor y Dudai 1996; Orsetti *et al.* 1996; Shipley y Ennis 1996; Miranda y Bermudez-Rattoni 1999; Berman y Dudai 2001; Lucas-Meunier *et al.* 2003; Hasselmo 2006).

En el condicionamiento de aversión gustativa se ha demostrado que diversas manipulaciones antagonistas de la actividad colinérgica previas al estímulo gustativo

impiden el aprendizaje, pero no tienen efecto cuando se realizan posteriormente. Así, la inactivación de Ch4 (núcleo colinérgico que inerva a la corteza insular) con tetrodotoxina previa a la estimulación gustativa impide la aversión, mientras que la inactivación previa a la evocación no afecta este proceso (Miranda y Bermudez-Rattoni 1999). De igual forma, la administración local de ESC (30 µg) en la corteza insular previa al estímulo gustativo impide la aversión, mientras que la misma dosis administrada en el intervalo interestímulos (después del estímulo gustativo, pero antes del estímulo aversivo) o antes de la evocación no tiene ningún efecto (Naor y Dudai 1996).

En nuestra investigación, el bloqueo general y sistémico de todos los subtipos de receptores muscarínicos con 5mg/Kg y 10mg/Kg b/w de ESC previo a la presentación de los estímulos disminuyó la aversión al olor condicionado, aumentando el I.P. a un valor estadísticamente diferente del control (ver figura 14).

Si bien nuestros resultados concuerdan con los estudios previos respecto al deterioro del aprendizaje debido a la administración durante la adquisición y la ausencia de efectos sobre la asociación o consolidación, es importante destacar que a diferencia de los estudios ya mencionados nuestra investigación sí encuentra efectos significativos durante la evocación tanto a corto como a largo plazo (ver figura 17 y 18 respectivamente). Es importante destacar que obtuvimos diferencias significativas al administrar ESC antes de la evocación a corto plazo (ver figura 17) que perduran en la evocación a largo plazo al volver a evocarlas a las 48 horas. A pesar de que al administrar ESC antes de la prueba de largo plazo no alcanza el criterio estadístico (ver figura 17) se observa una tendencia clara a incrementar el índice de preferencia. Lo anterior sugiere que la memoria a corto plazo en el AAO es más susceptible que la memoria a largo plazo a las manipulaciones colinérgicas de los receptores muscarínicos.

Haciendo a un lado las diferencias evidentes con otras investigaciones (tipo de aprendizaje, estructuras cerebrales involucradas, metodología, etc.) creemos que los efectos se pueden deber a la dosis empleada durante la evocación (10 mg/Kg b/w) ya que como lo demostraron Shimura et al (1995) e Inglis *et al.* (1994), durante la presentación del estímulo condicionado se registra una liberación de ACh ~200% mayor que la observada durante la adquisición, lo que requeriría una dosis mayor de antagonista para poder competir con un incremento tan importante de ACh. La dosis efectiva durante la adquisición no es la misma

que la dosis efectiva necesaria para la evocación. Hasta el día de hoy, no existen datos similares a los nuestros en la literatura que reporten los efectos de antagonismo muscarínico durante la evocación en el AAO. Carballo-Máquez *et al.* (2007) reportaron que la microinfusión de ESC en la corteza infralímbica inmediatamente después del EC en una tarea de discriminación olfativa producía un deterioro en la retención medida por el número de errores a las 24 horas y al igual que Doty *et al.* (2003) no encontraron problemas perceptuales ocasionados por la ESC.

Debido a que el deterioro del aprendizaje se limita a la administración de los fármacos previa a la presentación del olor, lo primero que debemos descartar es un efecto sobre la capacidad de procesamiento sensorial. Ya que sabemos que una de las funciones de la ACh es incrementar el contraste de la señal olfativa por activación de las interneuronas GABAérgicas del BO, refinando la discriminación de diferentes odorantes (Saghatelian *et al.* 2003; Davis 2004), sería fácil suponer que los sujetos fueron incapaces de procesar adecuadamente el estímulo olfativo. Sin embargo, diversas evidencias sugieren lo contrario ya que los animales son capaces de detectar y discriminar entre varios estímulos olfativos después de una administración sistémica de ESC o por daño a las vías colinérgicas del BO previo a la tarea. Por ejemplo, Doty *et al.* (2003) demostraron que al administrar sistémicamente ESC las ratas no presentaron una disminución de la sensibilidad a etil éster ni una disminución en el desempeño de la tarea conductual. Por otro lado, Lévy *et al.* (1997) observaron que la administración sistémica de ESC en ovejas no afectaba el rechazo de alimento contaminado con heces de perro. Por su parte, (Wirth *et al.* 2000) lesionaron las vías colinérgicas que inervan al BO con IgG-saporina y probaron la discriminación de olor a avellana y vainilla, sin observar deterioro. En una tarea de igualdad retrasada a la muestra (“delayed matching to simple”) olfativa, Ravel *et al.* (1994), encontraron que la administración de ESC en el BO afecta la MCP sin deteriorar el reconocimiento entre los olores de cineol y acetato de isoamilo. Se sabe que las ratas no pueden discriminar entre etil-ésteres que difieren sólo en un carbono, pero discriminan bien entre dos etil-ésteres que difieren en 4 carbonos y un etil-éster y olor de menta, y que el condicionamiento aversivo de un etil-éster incrementa la discriminación hacia otro éster diferente solo en un carbono (Fletcher y Wilson 2002). La administración de ESC previa al aprendizaje asociativo impide la discriminación entre esteroides diferentes sólo en un carbono, mientras que no la

impide entre dos ésteres que difieren en 4 carbonos o entre un éster y otra molécula (olor de menta) (Fletcher y Wilson 2002). Por estas razones, pensamos que en nuestros experimentos el efecto de los fármacos no alteró la detección de los estímulos ni impidió la discriminación de los olores utilizados.

Diferentes autores han señalado la importancia de la liberación de ACh en los procesos específicos de alertamiento y atención ante la estimulación sensorial. Con especial interés debemos señalar que la estimulación táctil, visual, auditiva y olfativa incrementa la liberación de ACh en las cortezas sensoriales respectivas, así como en el hipocampo (Inglis *et al.* 1994; Inglis y Fibiger 1995; Shimura *et al.* 1995; Orsetti *et al.* 1996; Miranda *et al.* 2000; Pepeu y Giovannini 2004). Específicamente, en el condicionamiento de aversión gustativa se ha demostrado por microdiálisis que la estimulación gustativa incrementa la liberación de ACh en la corteza insular de forma inversamente proporcional al grado de novedad del estímulo, es decir, a mayor familiaridad del sujeto con el estímulo (más presentaciones) menor liberación de ACh (Miranda *et al.* 2000; ver figura 12). Incluso se ha demostrado que el condicionamiento con un sabor familiar es menos efectivo ya que no disminuye significativamente el consumo del sabor condicionado en exposiciones subsecuentes al compararlo con un sabor nuevo (Berman y Dudai 2001), lo cual sugiere que la elevación de ACh es necesaria para el aprendizaje.

Es de suponer que el mismo patrón de liberación de ACh sucede en las cortezas olfativas ante la presentación de un estímulo olfativo nuevo o condicionado.

La asociación con el estímulo aversivo es independiente de la actividad muscarínica en el AAO.

Con respecto a la falta de efectos del bloqueo de receptores muscarínicos durante el intervalo interestímulos en el AAO, existen reportes de efectos similares en el aprendizaje de aversión gustativa. La administración de ESC (30 μ g) en corteza insular previa al estímulo gustativo impide la generación de la aversión mientras que la misma dosis administrada en el intervalo interestímulos no tiene ningún efecto (Naor y Dudai 1996). Es posible que una vez que la estimulación sensorial incrementa la liberación de ACh en la corteza correspondiente, la activación de los receptores muscarínicos permita la

codificación de la información o de la “señal de almacenamiento” para instruir a los circuitos necesarios para la codificación a largo plazo, como Naor y Dudai (1996) sugieren. Algunos estudios (Ferry *et al.* 1996; Ferry *et al.* 1999; Ferry *et al.* 2006; Ferry *et al.* 2007) han demostrado que la transmisión colinérgica a través de los receptores muscarínicos en la corteza entorrinal participa en la memoria olfativa a corto plazo regulando la actividad GABAérgica de la amígdala basolateral, aunado a lo anterior, la corteza entorrinal es la principal vía de entrada de información al hipocampo por lo que la corteza entorrinal es una de las posibles estructuras responsables de la modulación muscarínica durante la evocación. Kajiwara *et al.* (2007) a través de registros electrofisiológicos *in vitro* del cerebro completo de rata observaron distintas vías de activación al estimular el nervio olfativo, una que se propagaba de la corteza piriforme a la corteza amigdalina a la que llamaron vía medial, y la vía lateral de la corteza piriforme a la corteza entorrinal lateral a lo largo del sulco rhinal. Además de ser activada por la vía medial, la corteza amigdalina es activada una segunda vez a través de la actividad de la corteza entorrinal lateral.

Es probable que en la evocación del AAO participen estructuras como la amígdala (Jerusalinsky *et al.* 1997; Desgranges *et al.* 2008), la corteza entorrinal (Ferry *et al.*, 1996; 1999; 2006; 2007), o la corteza piriforme posterior (Raineke *et al.* 2009), en donde se han reportado cambios a consecuencia de diferentes modelos de aprendizaje de aversión olfativa, incluyendo al LiCl como estímulo incondicionado.

Los receptores muscarínicos no participan en la consolidación del AAO.

El bloqueo en la fase de consolidación (inmediatamente después del estímulo incondicionado) con ESC no produjo efectos significativos sobre el AAO (ver figura 16). Este resultado sugiere que los receptores muscarínicos no son necesarios para la fase de consolidación, sin embargo, en la literatura existen reportes sobre su participación en los procesos de consolidación, en otras estructuras. Se ha descrito que la administración de ESC vía sistémica, o directamente en la amígdala, en el septo medial o en el hipocampo, poco tiempo después del entrenamiento causa amnesia en el paradigma de evitación pasiva (“step-down inhibitory avoidance”) (Jerusalinsky *et al.* 1997), lo cual sugiere que la neurotransmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos es necesaria para la consolidación. La participación de la amígdala en la consolidación del AAO también está

descrita. La administración de anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) en la amígdala previa al condicionamiento afecta la formación de la memoria, pero no tiene efecto cuando se administra inmediatamente después del entrenamiento (Desgranges *et al.* 2008). Sin embargo, en este trabajo se evaluó la MCP del AAO (4 h después de la adquisición), mostrándose intacta, mientras que la MLP (3 días después de la adquisición) estaba deteriorada, por lo cual los autores sugieren que la amígdala es importante para la consolidación de la memoria. Es muy probable que la participación de ACh durante la consolidación involucre primordialmente a la amígdala, que se considera una estructura moduladora de la memoria. Otra estructura viable, en la que la transmisión colinérgica podría modular la consolidación del AAO es la corteza piriforme posterior, en donde se han reportado cambios como consecuencia de diferentes modelos de aprendizaje de aversión olfativa, incluyendo al LiCl como estímulo incondicionado (Raineke *et al.* 2009).

Al no obtener resultados administrando ESC inmediatamente después del LiCl para intervenir en la consolidación inmediata o temprana de la memoria decidimos no probar la consolidación intermedia o tardía ya que muy probablemente no obtendríamos resultados diferentes.

El efecto durante la adquisición no es dependiente de estado

Mediante la realización del Experimento 2 queríamos descartar que el efecto observado al administrar ESC durante la adquisición fuera dependiente del estado alterado en la percepción debido al fármaco. Como se puede ver en la figura 18, a las 24 horas después del EC el índice de preferencia es parecido al observado el día de la evocación al administrar la misma dosis (10 mg/Kg) durante la adquisición (ver figura 14); al administrar ESC antes de la prueba de evocación observamos que el efecto amnésico incrementó indicando que nuestros resultados durante la adquisición no eran dependientes de estado; y finalmente al evocar nuevamente a las 72 horas el índice de preferencia vuelve a ser como en la prueba de evocación a las 24 horas.

De lo anterior concluimos, que el efecto amnésico provocado por la administración de ESC durante la adquisición no es dependiente de estado y se debe a una modificación de la actividad muscarínica en dicha etapa del aprendizaje.

El antagonismo de los receptores muscarínicos fuera del sistema nervioso central provoca un efecto amnésico durante la adquisición

Una posibilidad que debíamos descartar es que la ESC interfiriera con los efectos generados por la inyección de LiCl durante la adquisición y que debido a ello se observó un deterioro en el aprendizaje. En el ANEXO 3 mostramos que ninguno de los antagonistas empleados tienen efecto sobre la cantidad de agua que consumen los animales ni en el muestreo de los bebederos.

Diversos grupos de investigación han demostrado que al realizar una vagotomía subdiafragmática las ratas aún presentan un AAS al inyectar LiCl (Martin *et al.* 1978), lo que sugiere que aun cuando la ESC pueda afectar la transmisión parasimpática o la función del nervio vago el AAO aun sucedería. Aunado a lo anterior, recordemos que el LiCl no sólo es procesado por el nervio vago sino que también pasa al torrente sanguíneo y es procesado por el AP. Lesiones del AP previenen la mayoría de los efectos producidos por la administración de LiCl (postramiento sobre el abdomen, vaciado estomacal, hipotermia, hipoactividad motriz) lo que indica que el AP es necesaria y suficiente para el procesamiento del LiCl como agente aversivo (Bernstein *et al.* 1992).

Decidimos realizar un experimento de agonismo-antagonismo (Experimento 3.1) en donde coadministramos la misma dosis de ESC (antagonista de los receptores muscarínicos) y diferentes dosis de carbacol (agonista competitivo de los receptores muscarínicos) que se caracteriza por no cruzar la barrera hematoencefálica, lo cual nos permitiría eliminar los efectos periféricos de la ESC y mantener sus efectos centrales. Como se pudo observar en la figura 19, dosis crecientes de carbacol tienden a disminuir el efecto amnésico producido por 10 mg/Kg de ESC durante la adquisición.

Estos resultados indican que el efecto que obtuvimos durante la adquisición se debe en parte al antagonismo de los receptores muscarínicos fuera de la barrera hematoencefálica. Para poder tener una mayor certeza de lo anterior, administramos un análogo de la ESC (mESC) que se caracteriza por ser el control farmacológico de sus efectos sobre el sistema nervioso periférico, ya que al igual que el carbacol no cruza la barrera hematoencefálica. En los experimentos 3.2.1 y 3.2.2, administramos mESC durante la adquisición y evocación.

La mESC reproduce el efecto que obtuvimos con la ESC durante la adquisición (ver la figura 21). De manera interesante, sin embargo, al inyectar mESC en la evocación no

obtuvimos los mismos resultados que con la ESC (ver figura 22) lo cual podría indicar que los receptores muscarínicos regulan estos dos procesos de manera distinta. Así, durante la adquisición los receptores muscarínicos fuera de la barrera hematoencefálica podrían tener un papel determinante en el proceso de aprendizaje; por el contrario, durante la evocación, los receptores muscarínicos “centrales” (dentro de la barrera hematoencefálica) podrían ser esenciales para el acceso a la información almacenada y a la expresión conductual del AAO.

Los efectos en la evocación a corto y largo plazo se deben a los receptores M1 principalmente.

La ESC es empleada como la droga de referencia para producir déficits cognitivos en humanos y roedores siendo el agente amnésico por excelencia. Sin embargo, como proponen Klinkenberg y Blokland (2010, 2011) el empleo de antagonistas de los receptores muscarínicos M1 (p.ej. BIP) son modelos farmacológicos más efectivos para producir déficits cognitivos debido a su mayor selectividad farmacológica, efectos cognitivos más específicos y limitada expresión en la periferia.

Por lo tanto, se realizaron para determinar si el antagonismo de los receptores M1 era el responsable del déficit en el aprendizaje. En la figura 23 y 24 se observa el efecto dosis-respuesta de la administración de varias dosis de BIP (antagonista de los receptores M1) y PIR (antagonista de los receptores M1 que no cruza la barrera hematoencefálica) sobre la adquisición del AAO. En ambos casos no observamos un cambio significativo en el desempeño de las ratas pero sí una tendencia a aumentar el índice de preferencia; debido a lo anterior no podemos concluir que los receptores M1 sean los responsables del efecto reportado durante la adquisición.

Sin embargo, al administrar ambos fármacos antes de la evocación a corto plazo y evocar tanto a corto como a largo plazo, pudimos observar un deterioro en el desempeño durante la prueba de evocación a largo plazo administrando BIP. Esto indica que los receptores “centrales” M1 podrían ser responsables del bloqueo observado en la evocación aunque es necesario destacar que al administrar BIP, el efecto sobre el índice de preferencia se presenta solamente a las 48 horas.

Al administrar los mismos fármacos durante la evocación a largo plazo encontramos los mismos resultados significativos en el grupo inyectado con BIP lo que refuerza nuestra idea de que en la evocación tanto a corto como largo plazo participan de los receptores áficamuscarínicos centrales y en particular los M1.

Estudios previos en nuestro laboratorio (Tovar-Díaz *et al.* 2011) demuestran que la administración de escopolamina (60 µg) o PIR (30 µg) en el BO no afecta la evocación del AAO, lo cual sugiere que los receptores muscarínicos de esta estructura, especialmente los M1, no participan en la evocación. Dichos resultados son similares a los reportados para el AAS, en los que la administración de ESC (30µg) en la corteza insular previa a la evocación no tiene ningún efecto (Naor y Dudai 1996). Sin embargo, se ha demostrado el aumento en la liberación de ACh durante la evocación de estímulos previamente condicionados, ya sea por asociación positiva (Inglis *et al.* 1994) o negativa (Shimura *et al.* 1995; Acguas *et al.* 1996). En este sentido Inglis *et al.* (1994; 1995) proponen que existe un componente de liberación de ACh relacionado a la evocación de experiencias previas, que promueve la liberación de ACh en corteza frontal, aunque no en hipocampo. Cabe aclarar que esta liberación no se demuestra en la corteza sensorial primaria correspondiente, lo cual sugiere papeles diferenciales de las estructuras supuestamente involucradas en el aprendizaje de una tarea específica durante la evocación. Por su parte, Shimura *et al.* (1995) encuentran que el incremento de la liberación de ACh en la corteza insular durante la estimulación con un sabor previamente condicionado, es del doble respecto al aumento con un sabor nuevo. Tal incremento podría estar asociado a la relevancia del estímulo cuando representa un peligro conocido. Esta evidencia plantea la posibilidad de que las dosis de ESC y BIP utilizadas en nuestros experimentos hayan sido suficientes para antagonizar las cantidades extras de ACh liberadas durante la evocación. Aunado a lo anterior, dichos estudios nos hacen pensar que nuestra aproximación experimental afectó diversas estructuras involucradas en la vía olfativa que podrían estar involucradas en el proceso de evocación y ser susceptibles de modulación colinérgica muscarínica.

VII. CONCLUSIONES

De lo anterior podemos concluir que los receptores muscarínicos centrales en áreas que carecen de la barrera hematoencefálica (probablemente el área postrema) son responsables

del efecto amnésico observado durante la adquisición del AAO, mientras que el encontrado durante la evocación probablemente se deba al antagonismo de receptores muscarínicos centrales, principalmente los M1.

Por lo tanto, la neurotransmisión colinérgica parece estar involucrada en diferentes etapas del AAO (adquisición y evocación) y a distintos niveles de la vía olfativa y la vía visceral.

ANEXO 1

Tablas de expresión de la enzima de síntesis y vesiculador colinérgico en el cerebro

Table 1
Regional distribution of ChAT- and VAcHT-positive neurons detected by in situ hybridization histochemistry (ISHH) and immunohistochemistry (IHC), and preterminal axons and terminals detected by IHC

	Neurons				Preterminal axons and terminals	
	ChAT		VAcHT		ChAT	VAcHT
	ISHH	IHC	ISHH	IHC		
Olfactory brain						
Olfactory bulb	-	-	-	-	+	+
Olfactory tubercle	+	+	+	+	+	+
Nucleus of the lateral olfactory tract	-	-	-	-	+	+
Basal forebrain						
Nucleus of the diagonal band of Broca	+	+	+	+	-	-
Medial septal nucleus	+	+	+	+	-	-
Lateral septal nucleus	-	-	-	-	+	+
Substantia innominata	+	+	+	+	-	-
Magnocellular preoptic nucleus	+	+	+	+	-	-
Amygdala	-	-	-	-	+	+
Hippocampal formation						
Ammon's horn	-	-	-	-	+	+
Dentate fascia	-	-	-	-	+	+
Neocortex	-	+	-	-	+	+
Basal ganglia						
Caudate-putamen	+	+	+	+	+	+
Nucleus accumbens	+	+	+	+	+	+
Globus pallidus	+	+	+	+	-	-
Habenular complex						
Medial habenular nucleus	+	+	+	+	-	-
Lateral habenular nucleus	-	-	-	-	+	+
Thalamus	-	-	-	-	+	+
Hypothalamus						
Arcuate nucleus	-	+	-	-	-	-
Median eminence	-	-	-	-	+	+
Superior colliculus	-	-	-	-	+	+
Interpeduncular nucleus	-	-	-	-	+	+
Parabigeminal nucleus	+	+	+	+	-	-
Pedunculo-pontine tegmental nucleus	+	+	+	+	-	-
Laterodorsal tegmental nucleus	+	+	+	+	-	-
Cerebellum						
Cerebellar cortex	-	-	+	+	+	-
Cerebellar nuclei	-	-	-	-	-	+
Cranial nerve nuclei						
Oculomotor nucleus	+	+	+	+	-	-
Trochlear nucleus	+	+	+	+	-	-
Trigeminal motor nucleus	+	+	+	+	+	+
Abducent nucleus	+	+	+	+	-	-
Facial nucleus	+	+	+	+	+	+
Nucleus ambiguus	+	+	+	+	+	+
Dorsal nucleus of the vagus	+	+	+	+	-	-
Hypoglossal nucleus	+	+	+	+	+	+
Spinal cord						
Ventral horn	+	+	+	+	+	+

+, Present; -, absent.

(Ichikawa *et al.* 1997)

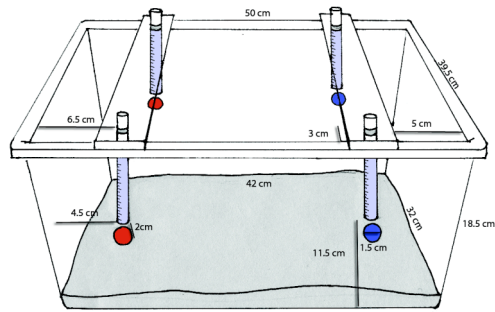
	Cholinergic terminals			Muscarinic receptors	
	ChAT	VAcHT [³ H]vesa- micol	HACU [³ H]hemi- cholinium-3	M1-like [³ H]piren- -zepine	M2-like [³ H]AF- DX 384
ONL					
GL	+++	+++	+++	++	++
EPL	+++	++	++	+++	+++
MCL	+++	+++	+++		
IPL	++	++	++	++	++
GCL	++	+	+	++	++
Pv					

Fig. 1. Neuroanatomical organization and distribution of cholinergic markers within the adult rat olfactory bulb. A. Photomicrograph of a rat olfactory bulb coronal section stained with cresyl violet. ONL : olfactory nerve layer, GL : glomerular layer, EPL : external plexiform layer, MCL : mitral cell layer, IPL : internal plexiform layer, GCL : granular cell layer, Pv : paraventricular layer. Size bar : 100 μ m. B. Distribution and relative densities of cholinergic elements in the different layers of rat olfactory bulb (after Le Jeune *et al.*, 1995⁵³). + : low labelling; ++ : moderate labelling; +++ : intense labelling.

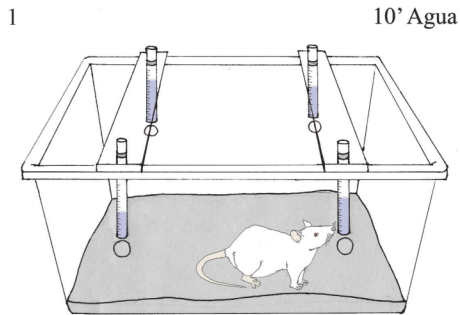
(Durand *et al.* 1998)

ANEXO 2

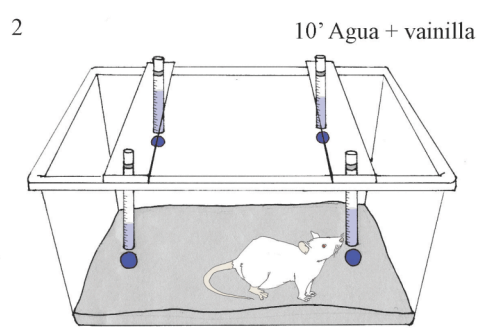
Procedimiento conductual para establecer el aprendizaje aversivo al olor



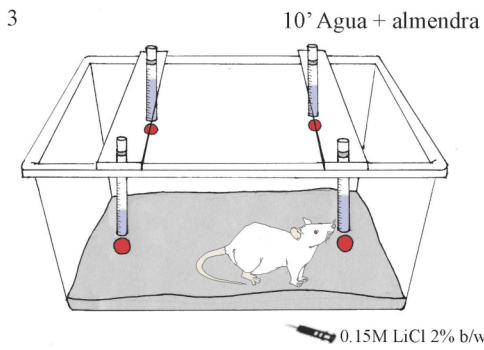
Día 1



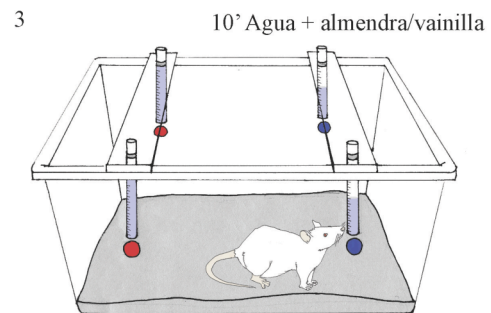
Día2



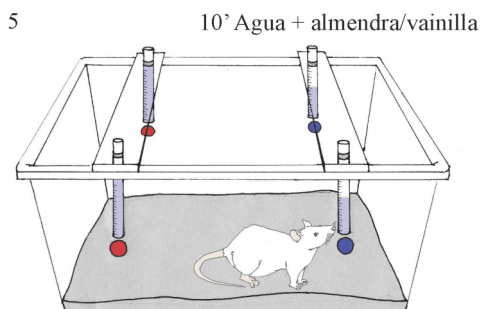
Día 3



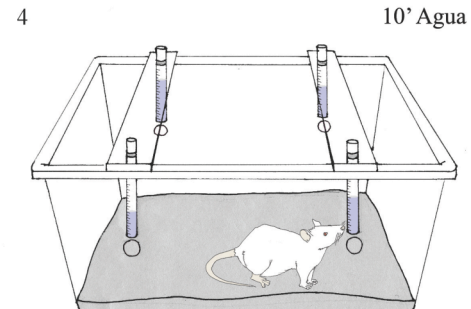
Prueba de evocación 4 horas



Día 4



Día 5 Prueba de evocación 48 horas



ANEXO 3

Efecto de los antagonistas muscarínicos en el consumo de agua y la motricidad.

OBJETIVOS:

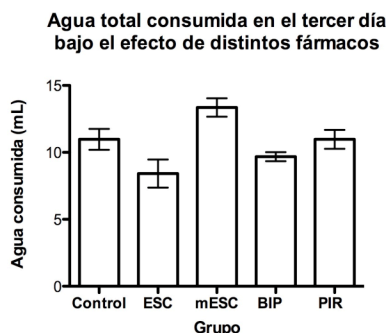
- Caracterizar la conducta de muestreo durante la sesión experimental.
- Determinar si los diferentes antagonistas muscarínicos tienen un efecto motriz.
- Determinar si los diferentes antagonistas muscarínicos tienen un efecto sobre el consumo de agua.

HIPÓTESIS:

- Los antagonistas muscarínicos no tienen efecto sobre la motricidad.
- Los antagonistas muscarínicos no tienen efecto sobre el consumo de agua.

PROCEDIMIENTO: Se realizaron grabaciones digitales de las sesiones conductuales durante la adquisición y bajo el efecto de diversos antagonistas muscarínicos (mESC, escopolamina, BIP y PIR) para evaluar el efecto sobre la motricidad de las ratas durante la tarea conductual. Se analizó el número de visitas por cada bebedero y se registró la cantidad de agua que consume cercana a cada bebedero.

RESULTADOS:



Gráfica 1. Agua total consumida en el tercer día bajo el efecto de distintos fármacos (ESC, metil ESC, BIP y PIR). No hay ninguna diferencia significativa al realizar una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Dunnet contra el grupo de control ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM.

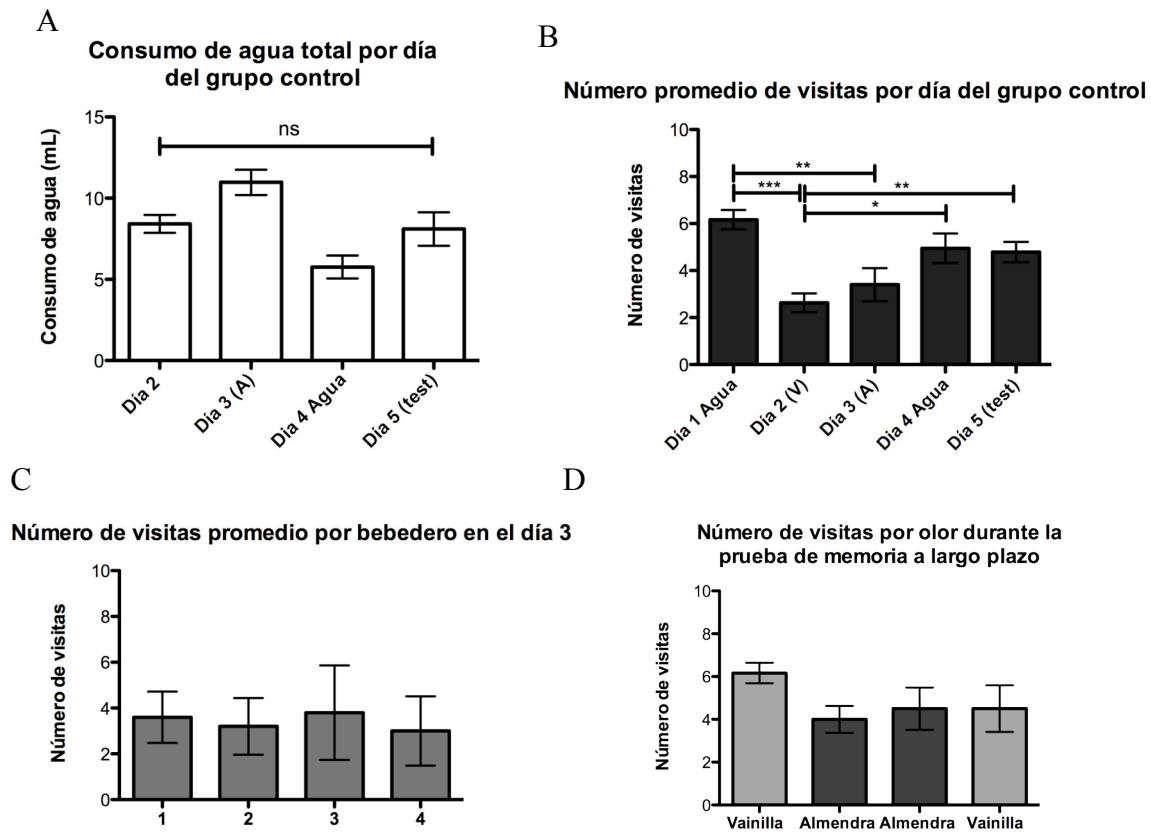


Figura 2. Caracterización del grupo control. A. Agua total consumida por día. La única diferencia no significativa es entre el día 2 y el 5. B. Número de visitas promedio por día. No existen diferencias significativas solamente entre el día 2 y 3; 1 y 5; 4 y 5. Todas las demás comparaciones fueron significativas. C. Número de visitas promedio por bebedero en el día 3. No hay diferencias. D. Número de visitas promedio por bebedero en el día 5 durante la prueba de memoria a largo plazo. No hay diferencias. En todos se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Newman-Keuls de comparaciones múltiples ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. ns= no significativa, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$.

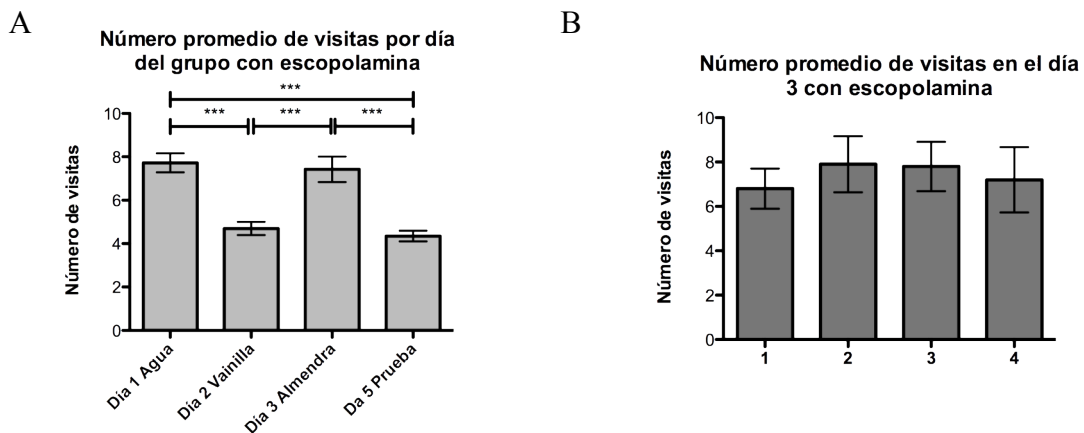


Figura 3. Grupo con ESC (10mg/Kg). A. Número promedio de visitas por día. Se muestran las diferencias significativas. B. Número promedio de visitas por bebedero en el día 3. No hay diferencias significativas. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Newman-Keuls de comparaciones múltiples ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. *** = $p \leq 0.001$.

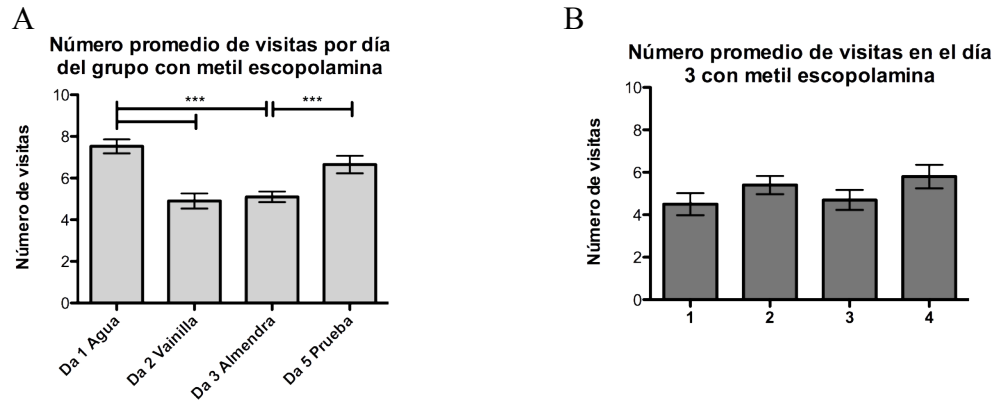


Figura 4. Grupo con metil ESC (10mg/Kg). A. Número promedio de visitas por día. Se muestran las diferencias significativas. B. Número promedio de visitas por bebedero en el día 3. No hay diferencias significativas. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Newman-Keuls de comparaciones múltiples ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. *** = $p \leq 0.001$.

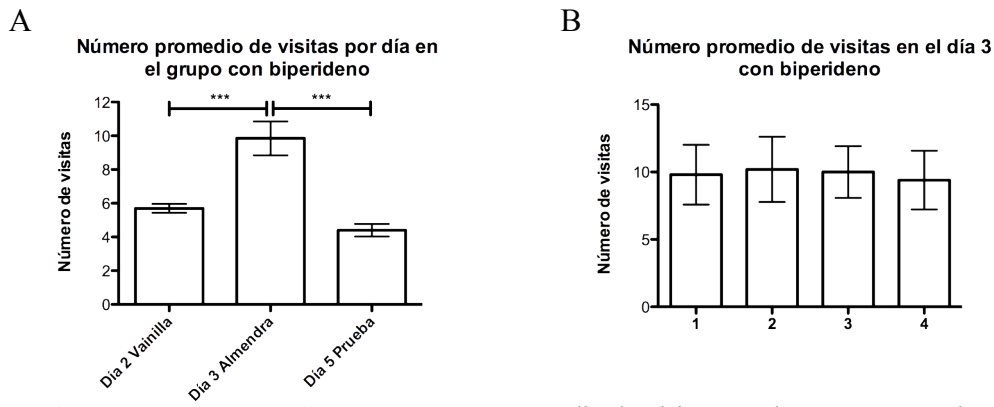


Figura 5. Grupo con BIP (10mg/Kg). A. Número promedio de visitas por día. Se muestran las diferencias significativas. B. Número promedio de visitas por bebedero en el día 3. No hay diferencias significativas. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Newman-Keuls de comparaciones múltiples ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. *** = $p \leq 0.001$.

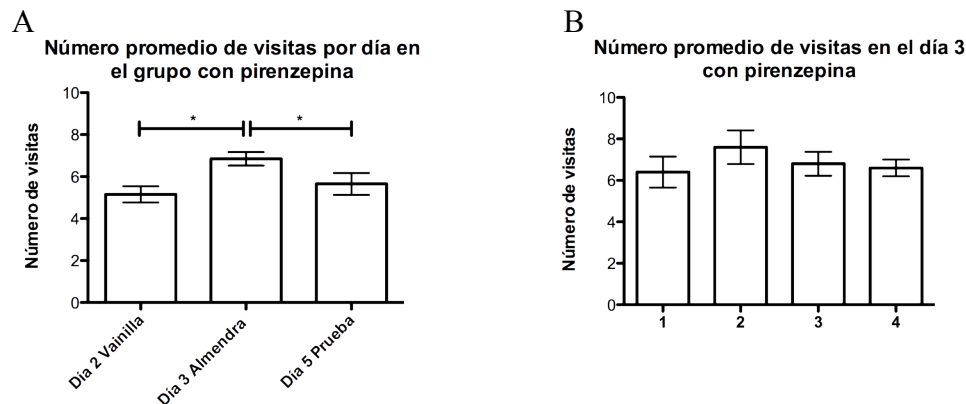


Figura 6. Grupo con PIR (10mg/Kg). A. Número promedio de visitas por día. Se muestran las diferencias significativas. B. Número promedio de visitas por bebedero en el día 3. No hay diferencias significativas. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Newman-Keuls de comparaciones múltiples ($\alpha < 0.05$). Se grafica media \pm EEM. * = $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: No hay efectos significativos de los cuatro fármacos en el consumo de agua durante la administración de los mismos al comparar los grupos contra el grupo control lo que implica que no tienen ningún efecto dipsogénico o dipsolítico significativo en las ratas bajo las dosis empleadas.

Al realizar un análisis del número de visitas en el grupo control pudimos constatar que las ratas visitan todos los bebederos independientemente de la condición experimental, por lo general lo hacen de manera secuencial y tienden a evitar realizar cruces transversales lo que ya se ha reportado ampliamente como una tendencia natural de los roedores a evitar espacios abiertos y bien iluminados. Ninguno de los fármacos afectó dicha conducta de muestreo como se puede observar en las gráficas B de cada figura ya que no encontramos efectos significativos entre los bebederos el día de la administración.

La reducción en el número de visitas del día uno al día dos y tres se debe en parte al fenómeno de neofobia. Lo interesante es que al administrar ESC no existen diferencias significativas entre las visitas del día uno y el día 3 lo cual se podría deber a un efecto de atenuación de la neofobia debida al fármaco.

Únicamente la metil ESC no produjo un aumento en el número de visitas durante el día tres al compararlo con el día dos. Los demás fármacos producen un aumento en el número de visitas en el día tres al compararlo con el día dos, la magnitud de la diferencia al administrar ESC y BIP ($p < 0.001$) es mucho mayor que con PIR ($p < 0.05$) lo cual podría deberse a que ambas pueden cruzar la barrera hematoencefálica.

CONCLUSIÓN: Podemos concluir que todos los fármacos excepto la metil ESC tienen un efecto sobre el número de visitas a los bebederos el cual no se ve reflejado en diferencias en la cantidad de agua que consumen. Finalmente, consideramos que dichos efectos motrices no tienen ningún impacto sobre el aprendizaje aversivo al olor debido a que no hay cambios en el muestreo ni en la cantidad de agua que consumen.

VIII. REFERENCIAS

1. Acquas, E, Wilson, C y Fibiger, H C (1996). "Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear." Journal of Neuroscience **16**(9): 3089-96.
2. Albright, T D, Kandel, E R y Posner, M I (2000). "Cognitive neuroscience." Current Opinion in Neurobiology **10**(5): 612-624.
3. Ambrogì, C, Baldi, E, Bucherelli, C, Sacchetti, B y Tassoni, G (1999). "Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings." Neurobiology of Learning and Memory **71**(1): 1-18.
4. Ambrogì Lorenzini, C, Baldi, E, Bucherelli, C, Sacchetti, B y Tassoni, G (1999). "Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings." Neurobiology of learning and memory **71**(1): 1-18.
5. Anglade, F o, Chapouthier, G, Dodd, R H y Baudoin, C (1999). "Olfactory memory in rats, cholinergic agents and benzodiazepine receptor ligands." Journal of Physiology **93**(3): 225-232.
6. Bailey, C, Bartsch, D y Kandel, E (1996). "Toward a molecular definition of long-term memory storage." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(24): 13445-13452.
7. Barco, A, Bailey, C H y Kandel, E R (2006). "Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory." Journal of Neurochemistry **97**(6): 1520-1533.
8. Barkai, E y Hasselmo, M (1994). "Modulation of the input/output function of rat piriform cortex pyramidal cells." Journal of neurophysiology **72**(2): 644-658.
9. Berman, D y Dudai, Y (2001). "Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex." Science **291**(5512): 2417-2419.
10. Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, R (2001). Memoria. Dónde reside y cómo se forma. México, Editorial Trillas.
11. Bernstein, I, Chavez, M, Allen, D y Taylor, E (1992). "Area postrema mediation of physiological and behavioral effects of lithium chloride in the rat." Brain Research **575**: 132-137.
12. Borroto-Escuela, D, Agnati, L, Fuxe, K y Ciruela, F (2012). "Muscarinic Acetylcholine Receptor-Interacting Proteins (mAChRIPs): Targeting the Receptorsome." Current Drug Targets **13**(1): 53-71.
13. Bouton, M, Jones, D y McPhillips, S (1986). "Potentiation and overshadowing in odor-aversion learning: Role of method of odor presentation, the distal-proximal cue distinction, and the conditionability of odor." Learning and Behavior **15**: 433-438.
14. Bouton, M y Moody, E (2004). "Memory processes in classical conditioning." Neuroscience and Biobehavioral Reviews **28**(7): 663-674.
15. Brown, D (2010). "Muscarinic Acetylcholine Receptors (mAChRs) in the Nervous System: Some Functions and Mechanisms." Journal of Molecular Neuroscience **41**(3): 340-346.
16. Buck, L y Axel, R (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.
17. Cammarota, M n, Barros, D, Vianna, M n, Bevilaqua, L, Coitinho, A, Szapiro, G n, Izquierdo, L, Medina, J y Izquierdo, I n (2004). "The transition from memory retrieval to extinction." Anais da Academia Brasileira de Ciências **76**(3): 573-582.

18. Cano- Lozano, V y Gauthier, M (1998). "Effects of the Muscarinic Antagonists Atropine and Pirenzepine on Olfactory Conditioning in the Honeybee." Pharmacology Biochemistry and Behavior **59**(4): 903-907.
19. Carballo-Máquez, A, Vale-Martínez, A, Guillazo-Blanch, G, Torras-Garcia, M, Boix-Trelis, N y Martí-Nicolovius, M (2007). "Differential effects of muscarinic receptor blockade in prelimbic cortex on acquisition and memory formation of an odor-reward task." Learning & Memory **14**(9): 616-624.
20. Castillo, P, Carleton, A, Vincent, J y Lledo, P (1999). "Multiple and opposing roles of cholinergic transmission in the main olfactory bulb." The Journal of Neuroscience **19**(21): 9180-9191.
21. Chapuis, J, Messaoudi, B, Ferreira, G y Ravel, N (2007). "Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats." Behavioral Neuroscience **121**(6): 1383-1392.
22. Cleland, T y Linster, C (2003). Central olfactory structures. Handbook of Olfaction and Gustation. Doty, R. New York, Marcel Dekker Inc.: 1-16.
23. Davis, R (2004). "Olfactory learning." Neuron **44**(1): 31-48.
24. Davis, R (2005). "Olfactory memory formation in Drosophila: from molecular to systems neuroscience." Annual Review of Neuroscience **28**: 275-302.
25. Desgranges, B, Levy, F y Ferreira, G (2008). "Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory." Brain Research **1236**: 166-175.
26. Domjan, M (2005). "Pavlovian conditioning: a functional perspective." Annual Review of Psychology **56**: 179-206.
27. Doty, R, Bagla, R, Misra, R, Mueller, E y Kerr, K-L (2003). "No influence of scopolamine hydrobromide on odor detection performance of rats." Chemical Senses **28**(9): 761-765.
28. Durand, M, Coronas, V, Jourdan, F y Quirion, R (1998). "Developmental and aging aspects of the cholinergic innervation of the olfactory bulb." International Journal of Developmental Neuroscience **16**(7-8): 777-785.
29. Eisenstein, E M (1997). "Selecting a model system for neurobiological studies of learning and memory." Behavioural brain research **82**(2): 121-132.
30. Everitt, B J y Robbins, T W (1997). "Central cholinergic systems and cognition." Annual Review of Psychology **48**: 649-84.
31. Ferguson, A y Smith, P (1991). "Autonomic mechanisms underlying area postrema stimulation-induced cardiovascular responses in rats." American Journal of Physiology **261**(1 Pt 2): R1-8.
32. Ferry, B y Di Scala, G (1997). "Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat." Neurobiology of Learning and Memory **67**(1): 80-83.
33. Ferry, B, Ferreira, G, Traissard, N y Majchrzak, M (2006). "Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat." Behavioral Neuroscience **120**(5): 1180-1186.
34. Ferry, B, Herbeaux, K, Cosquer, B, Traissard, N, Galani, R y Cassel, J-C (2007). "Immunotoxic cholinergic lesions in the basal forebrain reverse the effects of entorhinal cortex lesions on conditioned odor aversion in the rat." Neurobiology of Learning and Memory **88**(1): 114-126.

35. Ferry, B, Oberling, P, Jarrard, L y Di Scala, G (1996). "Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat." Behavioral Neuroscience **110**(3): 443-450.
36. Ferry, B, Wirth, S y Di Scala, G (1999). "Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the rat." Behavioral Neuroscience **113**(1): 118-25.
37. Firestein, S (2001). "How the olfactory system makes sense of scents." Nature **413**(6852): 211-218.
38. Fletcher, M y Wilson, D (2002). "Experience modifies olfactory acuity: acetylcholine-dependent learning decreases behavioral generalization between similar odorants." The Journal of Neuroscience **22**(2): 1-5.
39. Forbes, J M (2001). "Consequences of feeding for future feeding." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **128**(3): 461-468.
40. Garcia, J, Ervin, F y Koelling, R (1966). "Learning with prolonged delay of reinforcement." Psychonomic Science **5**(3): 121-122.
41. Garcia, J, Hankins, W y Rusiniak, K (1974). "Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat." Science **185**(4154): 824-31.
42. Garcia, J, S., L P, Bermudez-Rattoni, F y Deems, D A (1985). "A General Theory of Aversion Learning." Annals of the New York Academy of Sciences **443**: 8-21.
43. Gold, P (2003). "Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory." Neurobiology of Learning and Memory **80**(3): 194-210.
44. Gutiérrez-Mecinas, M, Crespo, C, Blasco-Ibáñez, J, Gracia-Llanes, F, Marqués-Mari, A y Martínez-Guijarro, F (2005). "Characterization of somatostatin- and cholecystikinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb." The Journal of Comparative Neurology **489**(4): 467-479.
45. Hasselmo, M y Bower, J (1992). "Cholinergic suppression specific to intrinsic not afferent fiber synapses in rat piriform (olfactory) cortex." Journal of Neurophysiology **67**(5): 1222-9.
46. Hasselmo, M E (2006). "The role of acetylcholine in learning and memory." Current Opinion in Neurobiology **16**(6): 710-5.
47. Hasselmo, M E y Barkai, E (1995). "Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation." Journal of Neuroscience **15**(10): 6592-604.
48. Hornby, P (2001). "Central neurocircuitry associated with emesis." The American Journal of Medicine **111**(8A): 106-112.
49. Hunter, A y Murray, T (1989). "Cholinergic mechanisms in a simple test of olfactory learning in the rat." Psychopharmacology **99**(2): 270-275.
50. Ichikawa, T, Ajiki, K, Matsuura, J y Misawa, H (1997). "Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry." Journal of Chemical Neuroanatomy **13**(1): 23-39.
51. Illig, K y Haberly, L (2003). "Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex." The Journal of Comparative Neurology **457**(4): 361-373.
52. Inglis, F M, Day, J C y Fibiger, H C (1994). "Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal." Neuroscience **62**(4): 1049-56.

53. Inglis, F M y Fibiger, H C (1995). "Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli." Neuroscience **66**(1): 81-6.
54. Isaacson, J S (2010). "Odor representations in mammalian cortical circuits." Current Opinion in Neurobiology **20**(3): 328-331.
55. Jan Bures, F B-R, and T. Yamamoto (1998). Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind Oxford University Press.
56. Jerusalinsky, D, Kornisiuk, E y Izquierdo, I (1997). "Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing." Neurochemical Research **22**(4): 507-515.
57. Johnson, D, Illig, K, Behan, M y Haberly, L (2000). "New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary" olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems." The Journal of Neuroscience **20**(18): 6974-6982.
58. Kajiwar, R, Tominaga, T y Takashima, I (2007). "Olfactory information converges in the amygdaloid cortex via the piriform and entorhinal cortices: observations in the guinea pig isolated whole-brain preparation." The European Journal of Neuroscience **25**(12): 3648-3658.
59. Kandel, E R (2001). Principles of Neural Science. New York, McGraw-Hill.
60. Kerr, K, Agster, K, Furtak, S y Burwell, R (2007). "Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas." Hippocampus **17**(9): 697-708.
61. Klinkenberg, I y Blokland, A (2010). "The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **34**(8): 1307-1350.
62. Klinkenberg, I y Blokland, A (2011). "A comparison of scopolamine and biperiden as a rodent model for cholinergic cognitive impairment." Psychopharmacology **215**(3): 549-566.
63. Kosaka, K y Kosaka, T (2004). "Organization of the main olfactory bulbs of some mammals: musk shrews, moles, hedgehogs, tree shrews, bats, mice, and rats." The Journal of Comparative Neurology **472**(1): 1-12.
64. Kosaka, K, Toida, K, Margolis, F y Kosaka, T (1997). "Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals." Neuroscience **76**(3): 775-786.
65. Kratskin, I y Belluzzi, O (2003). Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. Handbook of Olfaction and Gustation. Doty, R. New York, Marcel Dekker Inc.: 1-26.
66. Kyriazakis, I, Tolkamp, B J y Emmans, G (1999). "Diet selection and animal state: an integrative framework." Proceedings of the Nutrition Society **58**(04): 765-772.
67. Lévy, F, Richard, P, Meurisse, M y Ravel, N (1997). "Scopolamine impairs the ability of parturient ewes to learn to recognise their lambs." Psychopharmacology **129**(1): 85-90.
68. Linster, C y Hasselmo, M (2001). "Neuromodulation and the functional dynamics of piriform cortex." Chemical Senses **26**(5): 585-594.
69. Litvin, O O y Anokhin, K V (2000). "Mechanisms of Memory Reorganization during Retrieval of Acquired Behavioral Experience in Chicks: the Effects of Protein

Synthesis Inhibition in the Brain." Neuroscience and Behavioral Physiology **30**(6): 671-678.

70. Lledo, P-M, Merkle, F y Alvarez-Buylla, A (2008). "Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity." Trends in Neurosciences **31**(8): 392-400.

71. Lucas, F y Sclafani, A (1995). "Carbohydrate-conditioned odor preferences in rats." Behavioral Neuroscience **109**(3): 446-454.

72. Lucas-Meunier, E, Fossier, P, Baux, G y Amar, M (2003). "Cholinergic modulation of the cortical neuronal network." European Journal of Physiology **446**(1): 17-29.

73. Maren, S (2001). "Neurobiology of Pavlovian fear conditioning." Annual Review of Neuroscience **24**: 897-931.

74. Martin, J R, Cheng, F Y y Novin, D (1978). "Acquisition of learned taste aversion following bilateral subdiaphragmatic vagotomy in rats." Physiology & Behavior **21**(1): 13-17.

75. Martin, L y Lawrence, C (1979). "The importance of odor and texture cues in food aversion learning." Behavioral Neural Biology **4**: 503-15.

76. Mayer, E (2011). "Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication." Nature Reviews. Neuroscience **12**(8): 453-466.

77. McDonald, A y Mascagni, F (2010). "Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala." Brain Structure & Function **215**(1): 37-48.

78. Miranda, M I y Bermudez-Rattoni, F (1999). "Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories." Proceedures of the National Academy of Science **96**(11): 6478-82.

79. Miranda, M I, Ramirez-Lugo, L y Bermudez-Rattoni, F (2000). "Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus." Brain Research **882**(1-2): 230-5.

80. Moon, C y Ronnett, G (2003). "Molecular neurobiology of olfactory transduction." Neurological Disease and Therapy **57**: 75-92.

81. Myers, K P y Sclafani, A (2006). "Development of learned flavor preferences." Developmental Psychobiology **48**(5): 380-388.

82. Nader, K, Schafe, G E y LeDoux, J E (2000). "Reply - Reconsolidation : The labile nature of consolidation theory." Nature Reviews Neuroscience **1**(3): 216-219.

83. Naor, C y Dudai, Y (1996). "Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion." Behavioral Brain Research **79**(1-2): 61-7.

84. Nijijima, A y Yamamoto, T (1994). "The effects of lithium chloride on the activity of the afferent nerve fibers from the abdominal visceral organs in the rat." Brain Research Bulletin **35**(2): 141-145.

85. Nuñez-Farfán, J y Eguiarte, L (1999). Evolución biológica. México, Universidad Nacional Autónoma de México.

86. Orsetti, M, Casamenti, F y Pepeu, G (1996). "Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior." Brain Research **724**(1): 89-96.

87. Panzanelli, P, Fritschy, J, Yanagawa, Y, Obata, K y Sasso Pognetto, M (2007). "GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb." The Journal of Comparative Neurology **502**(6): 990-1002.
88. Pepeu, G y Giovannini, M G (2004). "Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes." Learning & Memory **11**(1): 21-7.
89. Puopolo, M y Belluzzi, O (1998). "Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb." The European Journal of Neuroscience **10**(3): 1073-1083.
90. Quirion, R, Wilson, A, Rowe, W, Aubert, I, Richard, J, Doods, H, Parent, A, White, N y Meaney, M J (1995). "Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M(2)-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired." J Neurosci **15**(2): 1455-62.
91. Raineke, C, Shionoya, K, Sander, K y Sullivan, R M (2009). "Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: Similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence." Learning & Memory **16**(2): 114-121.
92. Ravel, N, Vigouroux, M, Elaagouby, A y Gervais, R (1992). "Scopolamine impairs delayed matching in an olfactory task in rats." Psychopharmacology **109**(4): 439-443.
93. Rusiniak, K, Hankins, W, Garcia, J y Brett, L (1979). "Flavor-illness aversions: Potentiation of odor by taste in rats." Behavioral and Neural Biology **25**(1): 1-17.
94. Saghatelian, A, Carleton, A, Lagier, S, de Chevigny, A y Lledo, P-M (2003). "Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb." Journal of Physiology **97**(4-6): 517-528.
95. Salamon, E (2002). "Mechanisms of knowledge learning and acquisition." Medical Science Monitor **8**(7): 9.
96. Sánchez-Andrade, G, James, B y Kendrick, K (2005). "Neural encoding of olfactory recognition memory." The Journal of Reproduction and Development **51**(5): 547-558.
97. Scalera, G (2002). "Effects of conditioned food aversions on nutritional behavior in humans." Nutritional Neuroscience **5**(3): 159-188.
98. Sclafani, A (1997). "Learned controls of ingestive behaviour." Appetite **29**(2): 153-158.
99. Shepherd, G M, Migliore, M y Willhite, D C (2010). Olfactory Bulb. Handbook of Brain Microcircuits. Shepherd, G y Grillner, S. New York, Oxford University Press: 251-262.
100. Shimura, T, Suzuki, M y Yamamoto, T (1995). "Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study." Brain Research **679**(2): 221-6.
101. Shipley, M T y Ennis, M (1996). "Functional organization of olfactory system." Journal of Neurobiology **30**(1): 123-76.
102. Slotnick, B, Westbrook, F y Darling, F (1997). "What the rat's nose tells the rat's mouth: long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors." Animal Learning & Behavior **25**(3): 357-369.
103. Spencer, C, Eckel, L, Nardos, R y Houpt, T (2012). "Area postrema lesions attenuate LiCl-induced c-Fos expression correlated with conditioned taste aversion learning." Physiology & Behavior **105**(2): 151-160.
104. Squire, L (1986). "Mechanisms of memory." Science **232**: 1612-1619.
105. Tapper, D N y Halpern, B P (1968). "Taste stimuli: a behavioral categorization." Science **161**(3842): 708-10.

106. Tovar-Díaz, J, González-Sánchez, H y Roldán-Roldán, G (2011). "Association of stimuli at long intervals in conditioned odor aversion." Physiology & Behavior **103**(2): 144-147.
107. van der Zee, E y Luiten, P (1999). "Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory." Progress in Neurobiology **58**(5): 409-471.
108. Vassar, R, Chao, S K, Sitcheran, R, Nuñez, J M, Vosshall, L B y Axel, R (1994). "Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb." Cell **79**(6): 981-991.
109. Wess, J (2004). "Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **44**: 423-50.
110. Wess, J r (2004). "Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications*." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **44**(1): 423-450.
111. Wilson, D (1998). "Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex." Journal of Neurophysiology **79**(3): 1425-40.
112. Wilson, D (2001). "Scopolamine enhances generalization between odor representations in rat olfactory cortex." Learning & Memory **8**(5): 279-285.
113. Wilson, D y Sullivan, R (1994). "Neurobiology of associative learning in the neonate: early olfactory learning." Behavioral Neural Biology **61**(1): 1-18.
114. Wirth, S, Lehmann, O, Bertrand, F, Lazarus, C, Jeltsch, H l n y Cassel, J-C (2000). "Preserved olfactory short-term memory after combined cholinergic and serotonergic lesions using 192 IgG-saporin and 5,7- dihydroxytryptamine in rats." NeuroReport **11**(02).
115. Woolf, N J (1998). "A structural basis for memory storage in mammals." Progress in Neurobiology **55**(1): 59-77.
116. Xiao, Z, Deng, P-Y, Yang, C y Lei, S (2009). "Modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in the entorhinal cortex of juvenile rats." Journal of Neurophysiology **102**(2): 659-669.
117. Yeomans, M (2006). "Olfactory influences on appetite and satiety in humans." Physiology & Behavior **89**(1): 10-14.
118. Young, A (2012). "Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis." Neuropharmacology **63**(1): 31-45.
119. Zinyuk, L, Datiche, F y Cattarelli, M (2001). "Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat." Behavioural Brain Research **124**(1): 29-32.
120. Zola-Morgan, S y Squire, L R (1993). "Neuroanatomy of memory." Annual Reviews in Neuroscience **16**: 547-63.