



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE LOS NÚCLEOS CENTRAL Y BASOLATERAL DE LA AMÍGDALA

EN LA MEMORIA DE AVERSIÓN AL SABOR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

CONSUELO PÉREZ SÁNCHEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR: Dr. FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
Dr. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE LOS NÚCLEOS CENTRAL Y BASOLATERAL DE LA AMÍGDALA EN
LA MEMORIA DE AVERSIÓN AL SABOR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

CONSUELO PÉREZ SÁNCHEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR: Dr. FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
Dr. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2013

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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su reunión ordinaria del día 15 de enero de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna, **PÉREZ SÁNCHEZ CONSUELO** con número de cuenta **30202451-1** con la tesis titulada **“Participación diferencial de los núcleos central y basolateral de la amígdala en la memoria de aversión al sabor”**, realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI**.

Presidente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE.
Vocal: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
Secretario: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
Suplente: DR. FRANCISCO XAVIER SOTRES BAYÓN
Suplente: DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de agosto de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Los estudios de maestría realizados por la autora de esta tesis se llevaron a cabo en el programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Federico Bermúdez Rattoni.

La investigación llevada a cabo durante este trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 60478), y por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN216709).

El Comité Tutorial estuvo conformado por los Doctores: Federico Bermúdez Rattoni, José Fernando Peña Ortega y Víctor Ramírez Amaya.

El Jurado del Examen de grado estuvo conformado por los Doctores: Julio Morán Andrade, Martha Lilia Escobar Rodríguez, José Fernando Peña Ortega, Francisco Sotres Bayón y Paola García de la Torre.

Agradecimientos

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su tiempo dedicado en mi formación profesional.

A los miembros del Comité Tutoral, los Doctores: José Fernando Peña Ortega y Víctor Ramírez Amaya, por sus valiosas sugerencias cada reunión semestral, y por contribuir con mi formación académica.

A los miembros del Jurado del Examen de grado, los Doctores: Julio Morán Andrade, Martha Lilia Escobar Rodríguez, José Fernando Peña Ortega, Francisco Sotres Bayón y Paola García de la Torre por sus valiosos comentarios y correcciones en la elaboración de esta tesis.

En especial a la Dra. García de la Torre por todas sus enseñanzas y confianza que ha puesto en mi a lo largo de los años, miles de gracias por todo Paola.

A la Q. F. B. Perla Moreno Castilla por su apoyo técnico

A Oreste Carbajal por su inigualable trabajo en el laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio por la excelente convivencia, comprensión y apoyo durante los momentos de trabajo y la realización de los trámites.

Dedicatorias

A mi mamá Mari, Vale y Pepe por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, los amo mucho.

A mis hermanas, Ale y Ñaña por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mis sobrinas Amélie y Valentina por ser una felicidad en mi vida.

Alejandro, si pudiera convertir los besos en palabras tendría, varias enciclopedias, dos o tres diccionarios y muchas poesías, sólo para ti. Muchas gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, por ser la persona con la que quiero estar todos los días de mi vida y por decidir compartir tu vida conmigo. Te amo mucho

Al Sr. Abel y la Sra. Amalia, muchas gracias por su apoyo incondicional en todo momento y por aceptarme en su familia no como nuera, sino como una hija. Los quiero mucho.

A mis amigas de toda la vida, Chapis, Chispa, Su, Elina, Dosta y Laura el tenerlas de amigas es una de las mayores fortunas de mi vida, las quiero muchísimo.

A mis amigos del lab Dani, Moni, Aketzali, Jorge, Carla, Cristina, Luchis, Kioko, Julio, Azul, Ernesto y Lalito gracias por hacer del día al día en el lab algo muy placentero y por su amistad, los quiero mucho y los extraño.

INDICE

Resumen

Abstract

Abreviaturas

| | | |
|----|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| | 1.1 La consolidación..... | 2 |
| | 1.2 La reconsolidación..... | 5 |
| | 1.3 Memoria gustativa..... | 6 |
| | 1.4 La amígdala y su participación en la memoria gustativa..... | 9 |
| | 1.5 La corteza insular y su participación en la memoria gustativa..... | 11 |
| | 1.6 El glutamato..... | 12 |
| 2. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVO..... | 17 |
| | 2.1 Planteamiento del problema..... | 17 |
| | 2.2 Hipótesis..... | 17 |
| | 2.3 Objetivo..... | 17 |
| 3. | METODOLOGIA..... | 18 |
| | 3.1 Sujetos..... | 18 |
| | 3.2 Cirugía e implantación de cánulas..... | 18 |
| | 3.3 Fármacos..... | 19 |
| | 3.4 Inyecciones..... | 19 |
| | 3.5 Histologías..... | 19 |
| | 3.6 Inyección del fármaco antes de la evocación del CAS..... | 20 |
| | 3.7 Análisis estadístico..... | 22 |
| 4. | RESULTADOS..... | 23 |
| | 4.1 Histologías..... | 23 |
| | 4.2 Participación de los receptores AMPA en la evocación del CAS..... | 25 |
| | 4.3 Participación de los receptores NMDA en la evocación del CAS..... | 27 |
| | 4.4 Inhibición de los receptores AMPA y NMDA en una segunda adquisición del CAS..... | 29 |
| | 4.5 Participación de los receptores a glutamato en la Corteza Insular.... | 30 |
| 5. | DISCUSIÓN..... | 32 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 40 |
| 7. | LITERATURA CITADA..... | 41 |

ABREVIATURAS

ABL: Amígdala basolateral

ACe: Amígdala Central

AMP: Monofosfato de Adenosina

AP5: Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico

AMPA: Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AN: Atenuación de la neofobia

ARN: Ácido ribonucleico

CaMKII: Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina

CAS: Condicionamiento de aversión al sabor

CI: Corteza Insular

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico

EC: Estimulo condicionado

EI: Estimulo incondicionado

LTP: Potenciación a largo plazo

MCP: Memoria de corto plazo

MCPG: (RS)-alpha-metil-4-carboxifenilglicina

MLP: Memoria de largo plazo

mTOR: Blanco de la rapamisina en mamíferos

NBQX: 6-nitro-2,3-dioxo-1,4-dihydrobenzo [f]quinoxalina-7-sulfonamida

NF: Neofobia

NMDA: N-metil-D-aspartato

NR1: Subunidad 1 del receptor NMDA

NR2: Subunidad 2 del receptor NMDA

NR2A: Subunidad 2A del receptor NMDA

NR2B: Subunidad 2B del receptor NMDA

NR3: Subunidad 3 del receptor NMDA

PKC: Proteína cinasa C

PKA: Proteína cinasa A

PI3K: Cinasa del inositol trifosfato-3

PLP: Potenciación a largo plazo

Resumen

Aprendizaje y memoria son los procesos por los cuales los organismos adquieren y retienen información del entorno. La consolidación proceso mediante el cual se almacena la información adquirida a largo plazo, requiere de la síntesis de proteínas y del fortalecimiento de la comunicación entre grupos de neuronas para la formación de ensamblajes los cuales serán activados nuevamente durante la evocación. Los ensamblajes formados durante el aprendizaje pueden modificarse cada vez que se activan gracias a un proceso llamado reconsolidación, el cual también depende de la síntesis de proteínas. La potenciación a largo plazo (PLP) se utiliza como un modelo de los eventos sinápticos y celulares subyacentes a la formación de memorias asociativas. La PLP depende de la activación de receptores a glutamato y consta de dos etapas; en la primera, la activación de los receptores glutamatérgicos participa en la transmisión sináptica y promueve su facilitación de manera transitoria. La segunda etapa es resultado de la entrada de calcio a través de los receptores NMDA, lo cual desencadena la activación de diversas vías de señalización, y en consecuencia, induce la síntesis de proteínas requeridas para los cambios plásticos característicos de la formación de la memoria.

El condicionamiento de aversión al sabor (CAS) es un paradigma conductual muy importante en el estudio de memorias asociativas ya que permite observar los efectos conductuales a largo plazo, es un aprendizaje fuerte, duradero y de rápida adquisición. Adicionalmente, se ha demostrado que la corteza insular (CI) y la amígdala son las estructuras que regulan las memorias gustativas y aversivas, respectivamente. Más aún, se sabe que la CI y la amígdala central (ACe) participan en la consolidación y reconsolidación de la memoria del CAS, mientras que la amígdala basolateral (ABL) participa en el almacenamiento de todas las memorias aversivas. Se ha sugerido que el procesamiento de la memoria del CAS es semejante a la PLP, y teniendo en cuenta que la activación de los receptores NMDA es esencial para la inducción de la PLP, y mientras que la inhibición de los receptores de tipo AMPA sólo disminuye la transmisión sináptica en este modelo, es posible sugerir que la consolidación, reconsolidación y la evocación de la memoria del CAS requieren la activación de distintos receptores glutamatérgicos. Por lo anterior, es necesario determinar si la activación de los receptores a glutamato del tipo AMPA y/o del tipo NMDA es necesaria para el procesamiento de la memoria del CAS, y si difiere en los núcleos de la amígdala y la CI durante la evocación, la consolidación y reconsolidación de la memoria del CAS. Mediante la inhibición farmacológica de los receptores del tipo AMPA (usando NBQX) y NMDA (usando AP5), en este estudio demostramos que: 1) los receptores del tipo AMPA en la ABL son necesarios para la evocación del CAS, pero no para su reconsolidación, 2) la activación de los receptores de tipo NMDA de la ABL es necesaria para la reconsolidación, y 3) la activación de los receptores NMDA de la ACe y la CI se requiere para la consolidación de la memoria de aversión al sabor. En conclusión, los resultados de esta tesis demuestran que existe una participación diferencial de la ACe y de la ABL en el procesamiento de la memoria del CAS. Nuestros resultados sugieren que la ABL actúa como un primer relevo en los procesos de evocación, consolidación y reconsolidación de la memoria, los cuales son mediados por los receptores AMPA y NMDA, respectivamente.

Abstract

Learning and memory are the process by which organisms acquire and retain information from the environment. The process by which the acquired information is stored (consolidation) requires protein synthesis and strengthening communication between groups of neurons to form assemblies that will be activated again during the expression of behavior (retrieval). Assemblies formed during learning may be modified each time they are activated, by a process called reconsolidation, which also depends on protein synthesis. In this regard, long term potentiation (LTP) has been proposed as model synaptic and cellular events underlying the formation of associative memories. LTP depend on the activation of glutamate receptors and comprises two phases, in the first phase, activation of glutamate receptors is involved in synaptic transmission and promotes facilitation transiently. The second stage is the result of the calcium entry through NMDA receptors, which triggers the activation of various signaling pathways, and therefore, induces protein synthesis required for plastic changes characteristic of memory formation. Conditioned taste aversion (CTA) is a well-known memory paradigm that allow us observe the effects on the long term, CTA is strong, easy to learn and the structures participating in the CTA formation are known. Additionally, it has been shown that the insular cortex (CI) and the amygdala are regulating structures and aversive taste memories respectively. Moreover, it is known that the CI and the central amygdala (CeA) participate in the consolidation and reconsolidation of CTA, while the basolateral amygdala (BLA) involved in the storage of all aversive memories. It's been proposed that CTA processing and long term storage underlies LTP mechanisms, and knowing that the NMDA receptor activation is essential for LTP induction, whereas inhibition and receptor AMPA only decreases synaptic transmission in this model, it is possible to suggest that the consolidation / reconsolidation and memory retrieval require the activation of different glutamate receptors. Therefore, it is necessary to determine if the activation of glutamate receptors AMPA and / or NMDA necessary for CTA, and if it differs in the nuclei of the amygdala and IC for retrieval and consolidation or reconsolidation of CTA. By pharmacological inhibition of AMPA type receptors (using NBQX) and NMDA (using AP5), in this study we demonstrate that: 1) AMPA receptors in the BLA are needed for CTA retrieval, but not for reconsolidation, 2) activation of NMDA receptors of the BLA is required for reconsolidation, and 3) activation of NMDA receptors and CeA and IC is required for memory consolidation. In conclusion, this study demonstrates a differential participation of CeA and BLA in processing memory CTA. Our results suggest that BLA acts as a first relay in the process of consolidation and reconsolidation, and retrieval which are mediated by NMDA and AMPA receptors, respectively.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos son capaces de responder a las exigencias de su medio y adaptarse a él, lo cual se refleja en cambios de la conducta, resultado del aprendizaje y la memoria (Dudai, 1993). El aprendizaje es la capacidad de adquirir conocimiento (Kandel et al 2000) mientras que al proceso por el cual este aprendizaje es almacenado y recuperado a lo largo del tiempo se le denomina *memoria* (Kandel et al 2000). La memoria es una herramienta indispensable para sobrevivir a un medio de condiciones variantes ya que permite la modificación de la conducta de acuerdo a lo aprendido por experiencias previas.

A lo largo de la historia, la memoria ha sido objeto de estudio aunque su investigación formal comenzó en el siglo XIX con el trabajo del alemán Hermann Ebbinghaus, quien en su texto *Über das Gedächtnis* (Sobre la memoria) propuso la primera clasificación de la memoria basándose en su duración (Hotershall, 1999). Posteriormente, William James, en su obra *Principles of Psychology* (Principios de la psicología) hizo una distinción entre lo que él llamó “memorias primarias” y “memorias secundarias” (Kesner, 1998). Con “memorias primarias” se refería al conocimiento que era innecesario evocar porque no habían abandonado el curso principal del conocimiento; mientras que con “memorias secundarias” se refería a la información que ha dejado de ocupar la atención, por lo que se deja de tener conciencia de ella pero puede recuperarse a voluntad cuando sea necesario (Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001). En la actualidad, se hace referencia a dos tipos de memoria análogos a los propuestos por James: la memoria a corto plazo (MCP), que tiene una duración corta (de segundos a horas) y la memoria a largo plazo (MLP), que tiene una duración mayor (días, meses o años) [Dudai, 1993].

La memoria a largo plazo, que es capaz de permanecer en el tiempo, presenta tres fases: adquisición, consolidación y evocación (figura 1) (Quirk y Mueller, 2007). La adquisición o codificación es la entrada de nueva información para ser procesada (Kesner y Rogers, 2004). La consolidación se refiere al proceso de

almacenamiento de la memoria a largo plazo (McGaugh, 2000) y la evocación es la expresión de la conducta por la experiencia e involucra la recuperación de la información almacenada (Baddeley, 1999).

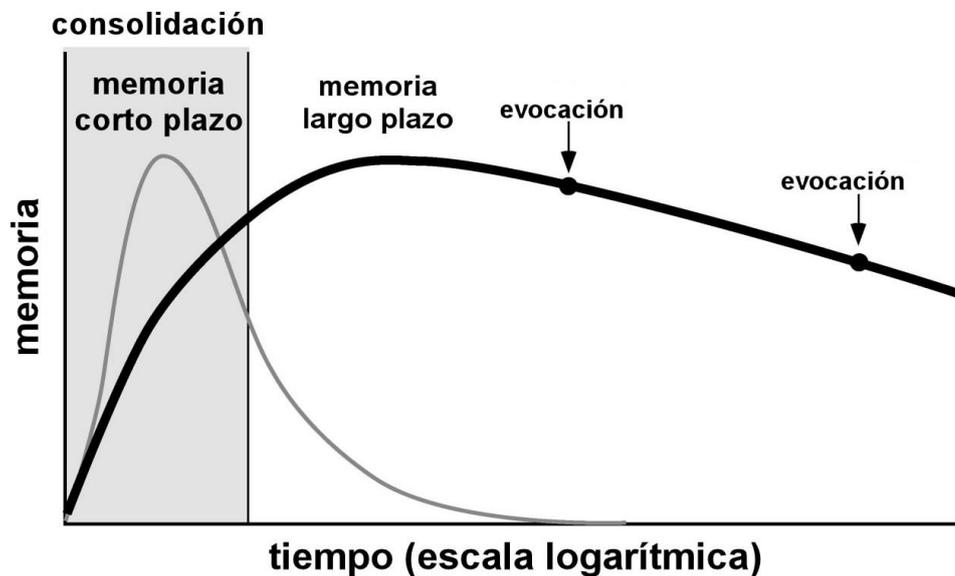


Figura 1. Fases de la memoria. En esta gráfica se muestra la intensidad de la memoria a lo largo del tiempo. La memoria a corto plazo (MCP) se mantiene por lapsos cortos, hasta que es consolidada y la información adquirida se almacena como memoria a largo plazo (MLP). La información puede ser utilizada posteriormente por medio de su evocación (Modificado de Dudai, 2004).

La consolidación

El estudio de la consolidación ha tenido mucha atención ya que es un proceso exclusivo de la memoria a largo plazo y permite el establecimiento de conductas recurrentes necesarias para la adaptación de los seres vivos al medio. El término *consolidación* se atribuye a Müller y Pilzecker, quienes observaron que las memorias tardan tiempo en “fijarse” (Dudai, 2004). Demostraron que la memoria recién aprendida era interrumpida por el aprendizaje de otro tipo de información si éste era presentado poco tiempo después del anterior, lo que sugiere que los procesos que subyacen en las memorias nuevas persisten, en un inicio, en un estado frágil y sólo se consolidan a través del tiempo para su mantenimiento a largo plazo (McGaugh, 2000).

El aprendizaje, como una particularidad del sistema nervioso, depende de las propiedades plásticas de los circuitos cerebrales los cuales son capaces de reorganizar funcionalmente las representaciones del mundo en respuesta a cambios en la información entrante relevante (Bermúdez-Rattoni, 2007). Esta reorganización puede provocar cambios plásticos en las conexiones o morfología neuronales, que conlleva a cambios funcionales duraderos. Estos cambios en las sinapsis subyacen los cambios en la conducta y son los llamados *trazos de memoria* y representan el sustrato biológico de la memoria (Tronson y Taylor, 2007).

De acuerdo con la hipótesis de la consolidación, un trazo de memoria se estabiliza y es capaz de fortalecerse a través del tiempo (McGaugh, 2000). Experimentalmente se ha demostrado que ciertos tratamientos administrados durante el lapso en el que la memoria es frágil pueden interrumpir su estabilización; en los años cuarenta se reportó que la memoria adquirida por el entrenamiento en una tarea determinada puede deteriorarse si se administran choques electroconvulsivos poco tiempo después del entrenamiento, sin embargo, cuando el mismo tratamiento es aplicado en periodos progresivamente más distantes al entrenamiento, el deterioro de la memoria disminuye significativa y gradualmente (Duncan, 1949). Lo anterior sugiere que el aprendizaje requiere de tiempo para estabilizarse y convertirse en una memoria duradera y que dicho proceso puede ser interrumpido.

Más tarde, en la década de los sesenta, se fomentó el desarrollo de múltiples estudios que demostraron que la administración de inhibidores farmacológicos de la síntesis de proteínas después del entrenamiento de una tarea puede afectar la formación de la MLP (Flexner *et al.*, 1962) sin modificar la MCP. Uno de estos trabajos fue el de Barondes y colaboradores (1967), en el cual se entrenó a ratones para que aprendieran a moverse de una región a otra en un laberinto en forma de "T" para evitar recibir choques eléctricos. Al administrar un inhibidor de la síntesis de proteínas (acetocicloheximida) intracerebralmente, cinco horas antes del entrenamiento, no observaron deterioro en la MCP durante una prueba

efectuado tres horas después del entrenamiento; sin embargo, cuando el periodo entre el entrenamiento y la prueba fue mayor (> seis horas o días), los ratones no fueron capaces de evitar los choques eléctricos, demostrando que el tratamiento había afectado severamente la MLP (Barondes y Cohen, 1967).

En la actualidad, se sabe que, a nivel celular, la MCP implica la transformación de estímulos extracelulares en señalizaciones intracelulares, lo que tiene como resultado alteraciones temporales en la transmisión sináptica (Kandel, 2001). Por lo anterior, la MCP permanece mientras la señalización intracelular siga activa. Sin embargo, para el almacenamiento de la MLP, los estímulos extracelulares deben generar alteraciones permanentes en la transmisión y conectividad sináptica, a esto se le conoce como *consolidación celular o sináptica* (Dudai, 2004).

Uno de los cambios en la conectividad sináptica más estudiados es la potenciación a largo plazo (PLP), que fue reportada por primera vez por Bliss y Lomo, en 1973 (Escobar y Derrick, 2007). Consiste en un incremento en la eficiencia sináptica (midiendo los potenciales excitatorios postsinápticos, PEPS) causada por actividad neuronal. Para inducirlo se proporciona un tren corto de estímulos de alta frecuencia, también conocido como *tetanización*, y ha servido como modelo de los eventos sinápticos y celulares subyacentes a la formación de memorias asociativas (Kandel *et al.*, 2003). Este fenómeno ha sido principalmente estudiado en las diversas vías del hipocampo, pero también es posible provocarlo en la amígdala, el estriado y la corteza (Tzien, 2006). Al estudiar sus mecanismos se ha descrito que depende de la activación de receptores a glutamato (Kandel *et al.*, 2003).

A un nivel en donde muchas estructuras cerebrales están involucradas en la formación de una misma memoria, se ha propuesto la hipótesis de consolidación de sistemas (Moscovitch M *et al.* 2005). Este concepto se refiere a la organización de los distintos tipos de memoria en un conjunto de estructuras. Probablemente la estabilidad de la MLP se favorezca por la formación de múltiples circuitos de

memoria entre varias estructuras del cerebro (Frankland *et al.*, 2005). Por lo tanto, la consolidación a nivel de sistemas implica la modificación y/o formación de circuitos estables entre diversas estructuras cerebrales (Bermúdez- Rattoni, 2010).

La reconsolidación

En un principio se sugirió que la memoria ya consolidada era estable y resistente a agentes amnésicos. Sin embargo, existe evidencia de que tras ser reactivada, una memoria debe ser estabilizada nuevamente mediante la síntesis de nuevas proteínas, a este fenómeno se le ha llamado *reconsolidación* (Nader *et al.*, 2009). La reconsolidación rompe por completo con el modelo lineal de la memoria y propone uno más dinámico o plástico, en el cual, nueva información puede ser incorporada a un trazo de memoria previamente consolidado (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2005; Nader *et al.*, 2009).

En el 2000, Nader y colaboradores retomaron la idea de que una memoria podía ser afectada después de su consolidación y demostraron que ésta se volvía susceptible al ser evocada. En dicho trabajo utilizaron el condicionamiento al miedo, éste consiste en asociar un tono a un choque eléctrico. Llevaron a cabo una sesión de entrenamiento y 24 horas después efectuaron una sesión de evocación e inmediatamente después se inyectó anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) en la amígdala basolateral (ABL). Sus resultados mostraron un déficit en la expresión de la memoria al hacer una prueba 24 horas más tarde, pudiéndose observar el mismo efecto hasta 14 días después del entrenamiento.

Por lo tanto, se propuso que la reconsolidación es un proceso en el cual la memoria evocada regresa a un estado de vulnerabilidad similar al de la memoria recién adquirida, ya que también requieren de la síntesis de proteínas de *novo* para su permanencia a largo plazo (Debiec *et al.*, 2002; Milekik y Alberini, 2002; Strelakova *et al.*, 2003; Taubenfeld *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha sugerido que la reconsolidación es parte de un proceso de actualización que permite la integración de nueva información a un trazo de memoria previamente

consolidado (Sara, 2000; Rodríguez-Ortíz *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006; Hupbach *et al.*, 2007; Lee, 2008).

Se ha propuesto que la reconsolidación de la memoria es un mecanismo en el cual las memorias son fortalecidas mediante un aprendizaje adicional (Lee, 2008). Lee (2008) propuso que la reconsolidación de la memoria es el proceso predominante en situaciones que implican más de un ensayo de entrenamiento. Más aún, Lee demostró que la reconsolidación de la memoria tiene una función adaptativa en el aprendizaje y la memoria, ya que permite la modificación de la fuerza de la memoria (Lee, 2008).

Memoria gustativa

En la naturaleza, los organismos se enfrentan a la tarea de encontrar nutrientes y conservarlos; una de las estrategias que utilizan es la de recordar un sabor previamente experimentado, a esto se le conoce como *memoria de reconocimiento de sabores* y consiste en la capacidad de reconocer un alimento que ya había sido degustado (Bermudez-Rattoni, 2004). Cuando un animal se encuentra ante un sabor novedoso, consume poco ya que desconoce las consecuencias gástricas que le pueda traer, a este fenómeno se le conoce como *neofobia* (NF).

Después de una primera presentación del sabor, pueden formarse dos memorias en el organismo: una gustativa segura o una gustativa aversiva. El tipo de memoria se determina de acuerdo con las consecuencias gástricas del consumo del alimento y puede medirse en presentaciones posteriores de acuerdo al aumento o disminución del consumo. Cuando el sabor no tiene ninguna consecuencia tóxica o es agradable para el animal, éste incrementa su consumo teniendo como resultado una atenuación a la neofobia (AN). Por el contrario, cuando el sabor tiene una consecuencia de malestar, el sabor se registra como tóxico, y en consecuencia, el animal se rehúsa a seguirlo consumiendo, presentando una aversión a dicho sabor. Experimentalmente, a esta tarea se le conoce como *condicionamiento de aversión a los sabores* (CAS) (Bermúdez-Rattoni,

2004). En la figura 2 se muestra una representación gráfica de la conducta de los animales en ambos casos (sabor apetitivo o sabor aversivo) para la memoria de sabores.

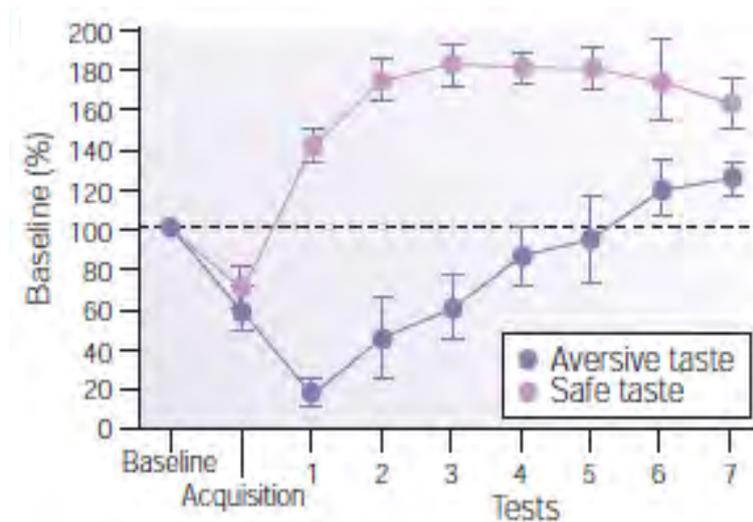


Figura 2. Representación gráfica de la memoria del condicionamiento de aversión al sabor. Consumo de sacarina expresado en porcentaje de ingesta de agua (Baseline). En esta figura se muestran dos tipos de conducta que se observan como consecuencia de haber ingerido un sabor nuevo. La primera presentación del sabor (adquisición) es la neofobia. Cuando el sabor se codifica como seguro en presentaciones posteriores, se incrementará el consumo (atenuación de la neofobia), o bien, si se asocia el sabor novedoso con un malestar gástrico, el consumo siguiente disminuirá (aversión a los sabores) e irá aumentando en los días siguientes al no presentar consecuencias gástricas nocivas; este fenómeno se conoce como extinción (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

Tanto la memoria segura como la aversiva dependen de una representación neural del sabor la cual puede ser procesada en forma paralela en diversas regiones cerebrales, cambiando su dirección hacia seguro o aversivo, lo que depende de las consecuencias del consumo del sabor. Esta representación neural constituye un trazo de memoria del sabor (TMS; Bermudez-Rattoni, 2004).

El CAS es un paradigma conductual descrito por John García en 1955 en el cual un sabor es utilizado como el estímulo condicionado (EC) y es asociado a un malestar gástrico inducido (estímulo incondicionado; EI), que comúnmente consiste en una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl). El CAS sigue

las reglas del condicionamiento clásico en donde se asocia el EC al EI lo que tiene como consecuencia la evasión del sabor (Figura 3), a esto se le llama respuesta condicionada (RC). En este tipo de condicionamiento el sabor se convierte en desagradable para el animal y es evitado (Bernstein y Koh, 2007).

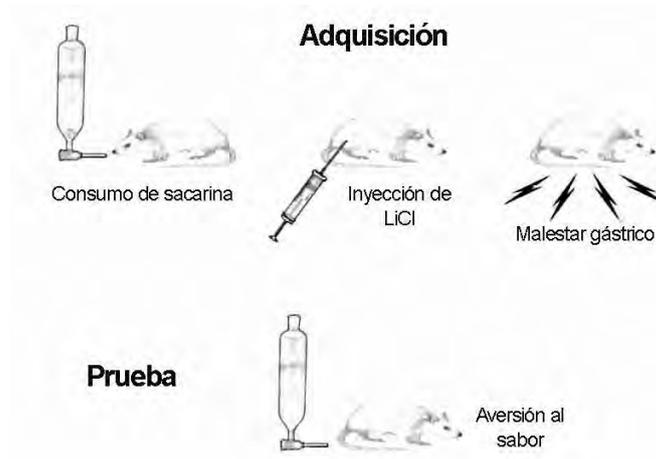


Figura 3. Esquema representativo del paradigma conductual del CAS. En este protocolo le es presentado al animal un sabor novedoso, sacarina (EC). Posterior al consumo del sabor, se le inyecta vía intraperitoneal un inductor de malestar gástrico (EI), cloruro de litio (LiCl). Cuando el sabor es presentado nuevamente al animal, éste evita beberlo debido a las consecuencias negativas experimentadas; a este comportamiento se le conoce como aversión al sabor (Modificado de Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

El CAS es un paradigma conductual muy utilizado en el estudio de la memoria ya que es un aprendizaje fuerte, duradero y de rápida adquisición, requiriendo sólo de un apareamiento entre el EC y EI para su permanencia a largo plazo (Bernstein y Koh, 2007). Por otra parte, se puede adquirir aunque existan amplios intervalos entre la presentación de los dos estímulos (EC y EI), posibilidad que permite estudiar los mecanismos involucrados en las distintas fases del procesamiento de la información (Bernstein y Koh, 2007). Otra ventaja del uso del CAS es que se conocen algunas de las estructuras cerebrales implicadas en el procesamiento de esta memoria como son la amígdala y la corteza insular entre otras.

La amígdala y su participación en la memoria gustativa

La amígdala es una estructura que se ha asociado a la adquisición y retención de memorias emotivas (McGaugh, 2004). Se le ha relacionado con tareas de aversión como el condicionamiento al miedo, la prevención pasiva y el CAS (LeDoux, 1993). En el cerebro de la rata, la amígdala forma parte del lóbulo temporal medial y puede dividirse en cuatro núcleos: central, medial, basomedial y cortical, y basolateral (figura 4) (Swanson L.W., 1992).

La amígdala manda información al área hipotalámica lateral, al núcleo parabraquial, a la médula ventrolateral y al núcleo del tracto solitario, mayoritariamente a la región parvicelular y en menor proporción a la ventrolateral (Spray *et al.*, 2004). La amígdala central (ACe) tiene conexiones con el núcleo del tracto solitario, el núcleo parabraquial, la región agranular y el complejo talámico posterior intra laminar (zona inserta) de la corteza insular (CI). Las neuronas de la ACe, responden mayoritariamente a información cardiovascular y visceral provenientes de la ínsula granular, disgranular visceral y agranular posterior (McDonald, 1999). La amígdala basolateral (ABL) recibe información viscerosensorial de la corteza insular, el complejo talámico posterior intra laminar y de la ACe.

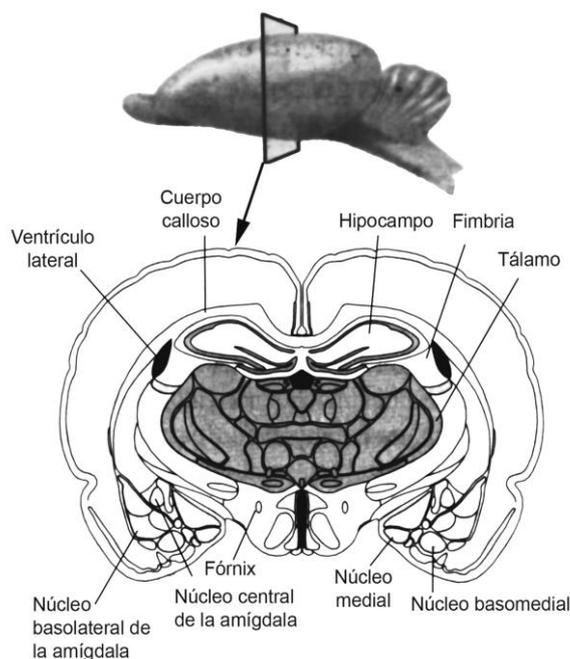


Figura 4. Esquema de la localización de la amígdala y sus núcleos. En la parte inferior de esta sección coronal del cerebro de rata se muestra la localización de la amígdala y sus núcleos. En la parte inferior izquierda se encuentra señalada la ubicación de la ACe y ABL. (Modificado de Swanson L. W., 1992).

Se ha demostrado que la ACe es esencial para la consolidación del CAS, ya que la inhibición de la síntesis de proteínas en esta estructura evita que se forme memoria del CAS (Yamamoto y Fujimoto 1991; Yamamoto 2007; Bahar et al., 2002). Por otra parte, De la Cruz y colaboradores (2008) demostraron que la síntesis de proteínas de novo en la ABL no es necesaria para la consolidación de la memoria gustativa aversiva. Ellos inyectaron un inhibidor de la síntesis de proteínas inmediatamente después de la adquisición del CAS y no observaron efecto cuando la inyección se realizó en la ABL, hipocampo o corteza perrinal, pero sí cuando se hizo en la ACe (Fig 5).

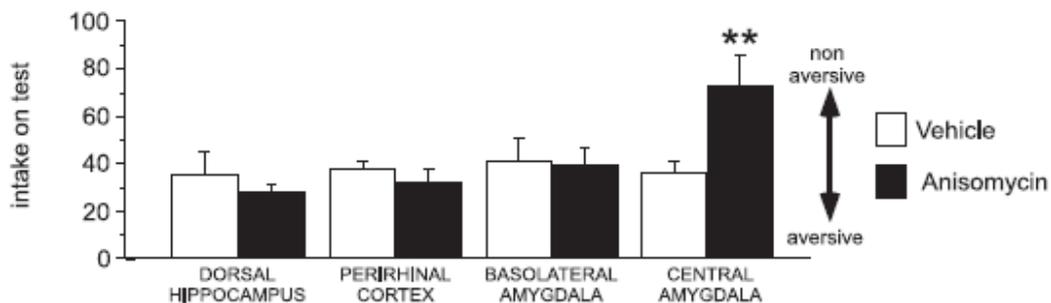


Fig 5. La síntesis de proteínas en la ACe es necesaria para la consolidación del CAS. Una inyección del inhibidor de síntesis de proteínas anisomicina inmediatamente después de la adquisición del CAS bloquea la consolidación de éste cuando es inyectada en la ACE y no así en la BLA (De la Cruz et al., 2008).

Sin embargo, Escobar y colaboradores (2000) demostraron que, al menos, la vía ABL-CI es necesaria para la prevalencia de la memoria aversiva y su extinción. En este trabajo observaron que la inducción de LTP en la proyección ABL-CI antes de una primera adquisición del CAS, mejora la retención de la tarea, sugiriendo que los mecanismos que están involucrados en la inducción de LTP en la vía ABL-CI pueden ser semejantes a los que ocurren en la formación de la memoria de aversión al sabor. Sugiriendo entonces la participación tanto de la ABL como de la CI en la prevalencia del CAS.

La corteza insular y su participación en la memoria gustativa

La CI es una región involucrada en el procesamiento y almacenamiento de la memoria gustativa (Bermúdez-Rattoni, 2004). En la rata, la CI se encuentra en la superficie lateral del cerebro y está delimitada por un área que abarca desde la corteza frontal hasta la corteza perirrinal en dirección al rostro caudal, en su parte ventral va desde la corteza somatosensorial hasta la corteza periforme. La CI ha sido referida como corteza visceral, ya que recibe información de tipo gustativa y conexiones del tálamo, pero sus principales conexiones provienen del sistema límbico, que son las aferencias de la amígdala (Bures *et al.*, 1998). La CI además de encargarse de procesar información gustativa en la rata, ha sido relacionada fuertemente con la consolidación del CAS y la atenuación de la neofobia (Bermúdez-Rattoni, 2004).

La CI recibe proyecciones gabaérgicas y colinérgicas provenientes del núcleo basal magnocelular y fibras glutamatérgicas provenientes de la amígdala, tálamo y de conexiones corticocorticales (Davis *et al.*, 1994). Las neuronas que se estimulan preferentemente con un sabor dulce se encuentran en la parte rostral, y con un sabor amargo primordialmente en las regiones caudal y granular. Esto ha sugerido que la CI es la región responsable de la percepción gustativa, aunque también recibe otros tipos de información sensorial, por lo que es considerada como una estructura multimodal en donde se procesan las señales sensoriales (Yamamoto *et al.*, 1989).

Se ha reportado que la inyección de un antagonista de los receptores NMDA (ionotrópicos glutamatérgicos), una hora antes o una hora después de la presentación del sabor novedoso en un protocolo de CAS, impide la formación de la memoria de aversión (Ferreria *et al.*, 2002). Por lo tanto, sabemos que la memoria de aversión depende tanto de la síntesis de proteínas como de la participación de los receptores NMDA en la CI para su consolidación.

En nuestro grupo de trabajo pudimos demostrar que la CI y la ACE son las estructuras que participan en la reconsolidación de la memoria de aversión al sabor (García-DeLaTorre *et al.*, 2009). En estos experimentos se hicieron dos adquisiciones del CAS, y con la finalidad de determinar el efecto de la inhibición de proteínas, se inyectó anisomicina en la CI y ABL simultáneamente antes del segundo CAS. El día de la prueba de memoria se observó que los animales tratados no reconsolidaron, lo cual se aprecia debido a que no solo se afectó la consolidación del CAS 2, sino que el trazo anterior (el de la consolidación del CAS 1) también se vio afectado y el consumo de los animales no es igual al consumo del CAS2 ni al del CAS1.

El glutamato

El glutamato es el neurotransmisor excitador por excelencia del sistema nervioso central. Es un aminoácido no esencial y su síntesis se da en neuronas a partir de precursores que se encuentran en ellas. Su precursor principal es la glutamina, la cual es liberada por la glía, ésta es metabolizada por la enzima glutaminasa en la terminal de la neurona presináptica, para después ser empaquetada en vesículas que son liberadas durante la transmisión sináptica. Dicho proceso es dependiente de ATP y magnesio (Purves *et al.*, 2003).

Su participación es muy importante en procesos como la coordinación motora, las emociones y la cognición, así como en la formación y evocación de la memoria (Siegel *et al.*, 1999). Es uno de los neurotransmisores más estudiados en el contexto de la plasticidad sináptica, proceso que se refiere a las modificaciones en las sinapsis que son necesarias para almacenar memorias (Martin *et al.*, 2000). El glutamato se ha visto involucrado en la plasticidad dependiente de experiencia y en la consolidación de la memoria (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Los efectos biológicos que tiene el glutamato a nivel de comunicación celular son mediados por proteínas transmembranales que funcionan como receptores. Los receptores a glutamato han sido divididos en dos grupos: ionotrópicos y

metabotrópicos (Purves *et al.*, 2003). Entre los receptores ionotrópicos existen tres tipos, nombrados de acuerdo con los agonistas que provocan su activación: receptores NMDA, receptores AMPA y receptores kainato (Purves *et al.*, 2003) (Figura 6). Los receptores del tipo NMDA son canales no selectivos que permiten el flujo a través de la membrana celular de cationes (Ca^{++} , Na^+ y K^+).

Los receptores de tipo AMPA funcionan durante la transmisión excitatoria rápida y su activación provoca la mayoría de las despolarizaciones neuronales (Siegel *et al.*, 1999). Este tipo de receptores se componen de una combinación de subunidades Glu R1, R2, R3 y R4 y pueden ser inhibidos específicamente por compuestos químicos como quinoxalinedionas, un ejemplo de éstas es el NBQX (6-nitro-7-sulfamobenzofluorano quinoxalina-2,3-diona).

Se sabe que los receptores NMDA y AMPA deben coexistir en la misma célula, ya que actúan de manera sinérgica en la mayoría de los casos (Siegel *et al.*, 1999) Una estimulación puede provocar la liberación presináptica de glutamato, el cual se une a sus respectivos receptores, pero únicamente se abren los AMPA que permiten la entrada de Na^+ a la postsinapsis. La entrada de iones positivos provoca un aumento en el potencial de membrana, que ocasiona la despolarización de la membrana que expulsa al tapón de magnesio del receptor NMDA. Una vez que ha salido el tapón de magnesio del receptor, es capaz de permitir el flujo de iones a través de la membrana, siempre y cuando el glutamato este unido al receptor en el exterior de la célula, dejando entrar Na^+ y Ca^{++} (Purves *et al.*, 2003).

Una importante diferencia entre los receptores NMDA y AMPA, es que los receptores tipo NMDA son relativamente estables en la sinapsis y presentan un reciclado mínimo, mientras que los AMPA se mueven adentro y afuera de la membrana postsináptica, de una manera dinámica y dependiente de actividad (Anggono V *et al.*, 2012)

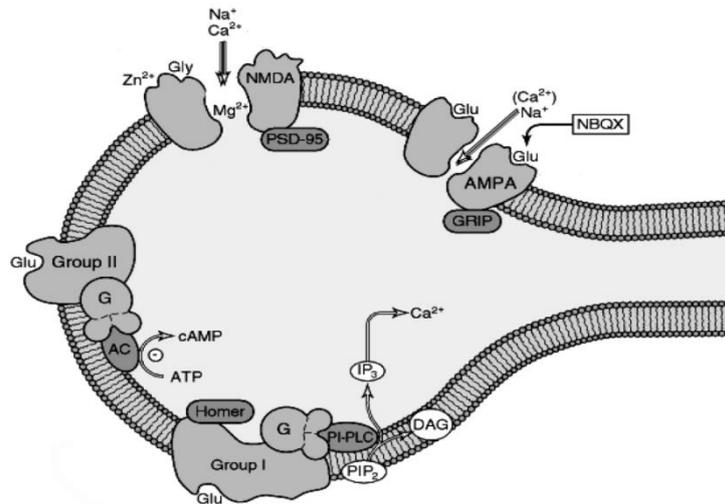


Figura 6. Los receptores glutamatergicos. Se muestran dos tipos de receptores ionotrópicos, NMDA y los AMPA, así como también los receptores metabotrópicos tipo I y tipo II. Se muestra en un rectángulo el antagonista de receptores AMPA (NBQX). Las dos clases de receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G unidas a fosfolipasas (PI-PLC) para el grupo I (Group I) y a adenilato ciclasa (AC) para el grupo II (Group II). La activación de los receptores tipo II, provocan que la proteína AC quede inactiva. Se cataliza la producción de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) a fosfatidilinositol-bifosfato (PIP₂) por la proteína PI-PLC. Al aumentar el IP₃ se provoca un aumento en la liberación de calcio presente en vesículas intracelulares. Otra proteína llamada Homer tiene como papel anclar estos receptores a la membrana sináptica. (Modificado de Siegel et al., 1999).

El flujo de cationes a través de los receptores a glutamato puede inducir la activación de vías de transducción de señales, lo cual promueve la síntesis de proteínas y la generación de potenciales de acción. Estos fenómenos son necesarios para distintos procesos biológicos, entre los que destacan el desarrollo, la plasticidad y la formación de la memoria (Siegel *et al.*, 1999).

La PLP es un modelo de los eventos sinápticos y celulares subyacentes a la formación de memorias asociativas y depende de la activación de receptores a glutamato (Kandel *et al.*, 2003). La PLP consta de dos etapas: la temprana depende de la entrada de iones de calcio por los canales NMDA y la activación de algunas proteínas que pueden fosforilar las subunidades de receptores AMPA aumentando su conductancia, así como intervenir en el tráfico de estos elementos, por ejemplo, promoviendo su inserción en la membrana. Estos efectos son rápidos, tienden a ser transitorios y tienen como resultado la facilitación de

la transmisión sináptica (Kandel *et al.*, 2000). La fase tardía o de mantenimiento se da a través de diversas vías de señalización que también dependen de los niveles de calcio intracelular y de la fosforilación de factores de transcripción como CREB (proteína de unión al elemento responsivo a AMPc) (Tzian, 2006).

Experimentos *in vivo* han comprobado que antagonistas de los receptores NMDA pueden bloquear la inducción de la PLP, pero el bloqueo de los receptores AMPA no tiene efecto en la inducción de PLP, aun cuando la transmisión sináptica puede ser inhibida por los antagonistas a receptores AMPA (Kapus G *et al.*, 2000).

La participación del glutamato en el CAS fue demostrado por Tucci y colaboradores (1998) quienes al inyectar este neurotransmisor en la ABL después de la presentación de un sabor novedoso obtuvieron aversión al sabor sin presentar el EI (sin consecuencias aversivas). Además, se sabe que todos los receptores glutamatérgicos de la amígdala, incluyendo los metabotrópicos, participan en la formación de la memoria aversiva. La adquisición de una tarea puede ser bloqueada administrando D-APV (antagonista a receptores NMDA) en la amígdala entre la presentación del EC y el EI en una primera adquisición; mientras que la evocación se ha visto afectada solo por el bloqueo de los receptores AMPA en la amígdala (Yasoshima *et al.*, 2005).

En otro trabajo, Yasoshima y colaboradores (2005) estudiaron la función de los receptores a glutamato de la amígdala durante la consolidación de la memoria de aversión al sabor. Para ello, inyectaron diferentes antagonistas de los receptores glutamatérgicos antes de una segunda adquisición del CAS. Los animales en los que se inhibió la acción de los receptores AMPA no presentaron aversión al sabor el día de la inyección (T1) como se muestra en la figura 7. Al día siguiente (T2), todos los animales presentaron una gran aversión al sabor, lo cual indica que el efecto amnésico de la droga fue temporal y reversible. Los receptores AMPA parecen participar únicamente en la evocación de la memoria del CAS pero no en su consolidación. También observaron que los animales en los

que se bloquearon los receptores NMDA, el día de la prueba (T2), presentan una menor aversión a la sacarina en comparación con los otros grupos ese mismo día y con ese mismo grupo el día anterior (T1; Yasoshima *et al.*, 2005). Este resultado sugiere una posible participación diferencial de los receptores AMPA y NMDA en los procesos de formación y almacenamiento de la memoria del CAS en la amígdala.

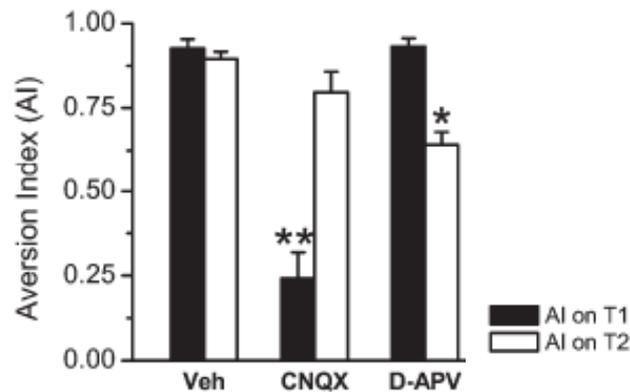


Figura 7. La inhibición de receptores AMPA en una segunda presentación de sacarina produce un menor índice de aversión el día de la inyección. Esta figura muestra el efecto de la inyección de antagonistas de tres tipos diferentes de receptores glutamatérgicos. Se graficó el consumo de sacarina en índice de aversión (siendo en este caso 1.00 la mayor y 0.00 la menor) para cada grupo durante el día 1 (T1), cuando se efectuó la inyección, y el día 2 (T2). Se observa un menor índice de aversión en el grupo inyectado con CNQX en el T1 por lo que dicho fármaco afectó la evocación de la memoria de aversión. Sin embargo, durante el T2 los animales inyectados con CNQX presentaron un alto índice de aversión, mientras que los animales que fueron inyectados con D-APV presentaron menor aversión en el día de la prueba (T2) (Modificado de Yasoshima *et al.*; 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Planteamiento del problema

La amígdala y la CI son estructuras clave en el procesamiento de la memoria de aversión al sabor, en ellas, la activación de los receptores glutamatérgicos y la síntesis de nuevas proteínas son procesos indispensables.

Sin embargo, la participación diferencial de los núcleos que conforman a la amígdala (ACe y ABL) así como de los receptores glutamatérgicos (NMDA o AMPA) en los procesos de la formación de la memoria del CAS (evocación, consolidación y reconsolidación) no han sido descritos detalladamente.

Hipótesis

La inhibición de los receptores NMDA en la ACe o la CI en una segunda adquisición de CAS, evitará la consolidación de esta segunda adquisición y probablemente dañará el trazo previamente consolidado (de la primera adquisición). El bloqueo de los receptores AMPA en la ACe, ABL o CI antes de una segunda adquisición del CAS, bloqueará la evocación del primer CAS, sin afectar la capacidad de estas estructuras para adquirir el segundo CAS.

Objetivo

Determinar la participación de los receptores a glutamato en la CI, ABL o ACe durante las fases de la memoria del CAS.

Objetivos particulares

Mediante la inhibición farmacológica de los receptores a glutamato del tipo AMPA y/o NMDA en la CI, ABL o ACe, determinar la participación de estos receptores en la evocación, consolidación y reconsolidación de la memoria del CAS.

METODOLOGÍA

Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 250 y 280 g al inicio del experimento, de aproximadamente 10 semanas de vida, y criadas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico donde tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*. Cada rata se mantuvo separada en una caja individual con un ciclo de luz/oscuridad (12h/12h), encendiéndose las luces a las ocho de la mañana. Las ratas sólo fueron privadas de agua durante la fase experimental. Los procedimientos conductuales se efectuaron durante la fase luminosa.

Cirugía e implantación de cánulas

Todos los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (76 mg/Kg) y xilazina (8 mg/Kg). Empleando el procedimiento de cirugía estereotáxica estándar se hicieron las trepanaciones con una fresa dental y se implantaron cánulas de 23 Ga y de 12 mm de largo. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con dos tornillos y cemento dental de acuerdo a las siguientes coordenadas estereotáxicas, a partir de Bregma (mm):

- 1) amígdala central, posterior 2.2 mm, lateral \pm 4 mm, ventral 5.8 mm (Paxinos & Watson, 1986)
- 2) amígdala basolateral, posterior 2.8 mm, lateral \pm 5 mm, ventral 6.5 mm. (Paxinos & Watson, 1986).
- 3) corteza insular: posterior 1.2 mm, lateral \pm 5.5 mm, ventral 4 mm. (Paxinos & Watson, 1986).

Las cánulas fueron situadas 2 mm arriba del área de interés para evitar lesiones. Con la finalidad de evitar infecciones, al terminar el procedimiento quirúrgico, se aplicó un antibiótico, penicilina en este caso, tópicamente sobre el área de la cirugía y posteriormente los animales tuvieron un periodo de recuperación de

siete días con acceso a comida y agua sin restricción. A todos los animales se les implantaron cánulas bilateralmente en la ABL, ACe y CI.

Fármacos

Para los distintos tratamientos se utilizó como vehículo solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). La inhibición farmacológica de los receptores AMPA se llevó a cabo con el antagonista NBQX (6-nitro-2,3-dioxo-1,4-dihydrobenzo [f]quinoxalina-7-sulfonamida) a una concentración de 5 mg/mL. (BenMamou, 2006). Por otra parte, los receptores NMDA fueron inhibidos con AP5 (ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico) a una concentración de 9mg/mL. (Berman *et al.*, 2000).

Inyecciones

Cada uno de los tratamientos se administró, mediante la inyección del fármaco (NBQX y APV) o de la solución vehículo, bilateralmente a través de agujas dentales introducidas en las cánulas guía que rebasaron por 2 mm el sitio de canulación. El volumen y la velocidad de la inyección en cada estructura se reguló con una bomba automática de inyección. Se inyectaron 0.5 μ L por hemisferio en la ABL y en la ACe a una velocidad de 0.5 μ L por minuto, mientras que en la CI se inyectó 1 μ L a una velocidad de 1 μ L por minuto (dosis y volúmenes efectivos para bloquear los receptores AMPA o NMDA) (Berman *et al.*, 2000; Gúzman-Ramos *et al.*, 2010; García-DelaTorre, 2009). Al terminar este tiempo se dejó el inyector dentro de la cánula un minuto adicional para permitir la completa difusión del fármaco en el tejido.

Histologías

La correcta implantación de las cánulas se corroboró por medio de un análisis histológico. Para ello, una vez practicados los experimentos conductuales, las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (100 mg/kg) y perfundidas por vía aórtica con solución salina (0.9%). Los cerebros fueron extraídos y colocados en paraformaldehído (4%). Una vez que el tejido fue fijado

se colocó en soluciones de sacarosa del 10, 20 y 30%, sucesivamente (24 horas en cada solución). Posteriormente, los cerebros fueron cortados en rebanadas de 40 μm de grosor con un microtomo, se tiñeron con violeta de cresilo y se analizaron con un microscopio de luz con el fin de verificar la posición de las cánulas. Los animales cuya histología mostró una implantación errónea fueron descartados del análisis estadístico.

Inyección de fármaco antes de la evocación del CAS

Una vez terminado el periodo de reposo posterior a la cirugía (7 días), se privó a los animales de agua por 24 horas. Durante los siguientes tres días, se le dio 30 ml de agua a cada animal utilizando una probeta graduada y un tapón metálico que funcionan como bebedero, durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo, se registró el consumo de agua de cada animal para calcular la tasa de consumo base (línea base). Al siguiente día se llevó a cabo el condicionamiento en donde se proporcionó 30 ml de una solución de sacarina a 0.1% durante 15 minutos, y se registró el consumo individual; 15 minutos después se les aplicó una inyección intraperitoneal de cloruro de litio 0.15 M (10 mL/kg). Cuatro horas después del condicionamiento se les dio a los animales 30 ml de agua durante 15 minutos para evitar su deshidratación.

En este trabajo se efectuó un protocolo de reconsolidación, similar al utilizado por Lee en 2008, el cual consiste en dos adquisiciones del CAS seguidas de la prueba (García-DelaTorre et al, 2009). La administración de dos adquisiciones del CAS es con la finalidad de desencadenar los mecanismos que llevan a cabo la reconsolidación de una memoria, para lo cual, es necesario reactivarla a través de su evocación. Se sabe que la reconsolidación es un proceso de actualización de la memoria en el cual se requiere la incorporación de nueva información para ser procesada al momento de la evocación (Izquierdo *et al.*, 2001, 2003; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2005), que la reconsolidación de la memoria es el proceso predominante en situaciones que implican más de un ensayo de entrenamiento, ya que la reconsolidación permite la modificación de la fuerza de la memoria

(Lee, 2008), y que después de la evocación y en ausencia de un reforzador, una memoria aversiva puede ser extinguida, dependiendo de la historia de ensayos conductuales que los animales hayan adquirido después de la evocación la memoria se puede extinguir o reconsolidar (Bahar, 2004). Por este motivo es necesaria la administración de un segundo CAS, es decir, más información para ser procesada. En este trabajo los animales recibieron una adquisición del condicionamiento y al día siguiente, antes de la segunda adquisición del CAS (durante la evocación), se aplicaron las inyecciones del fármaco según su tratamiento correspondiente (vehículo, NBQX o AP5). La prueba de memoria se hizo al día siguiente y consistió en la presentación de sacarina durante 15 minutos. En el caso de los experimentos de doble inyección, se llevó a cabo el mismo protocolo conductual, solo que el día de la inyección, los animales se inyectaron doblemente en la estructura canulada. El protocolo de los experimentos conductuales se muestra de manera esquemática en las figuras 8 y 9.

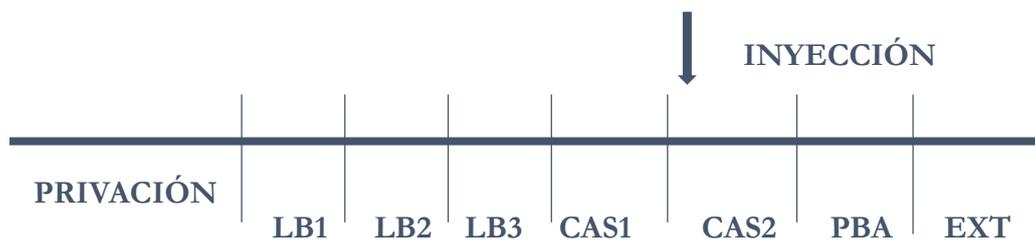


Figura 8. Esquema del protocolo de experimentación. Se muestra el cronograma para cada experimento, se utilizaron tres días de línea base (LB1, LB2 y LB3) seguido de una primera adquisición del CAS (CAS1); en el quinto día, antes de la segunda adquisición del CAS (CAS2) (durante la evocación), se aplicaron las microinyecciones con los antagonistas de los receptores; el sexto día se efectuó una prueba de memoria (PBA) presentado solo el EC y finalmente en el séptimo día se llevó a cabo una sesión de extinción en la cual solo se presentó el EC.

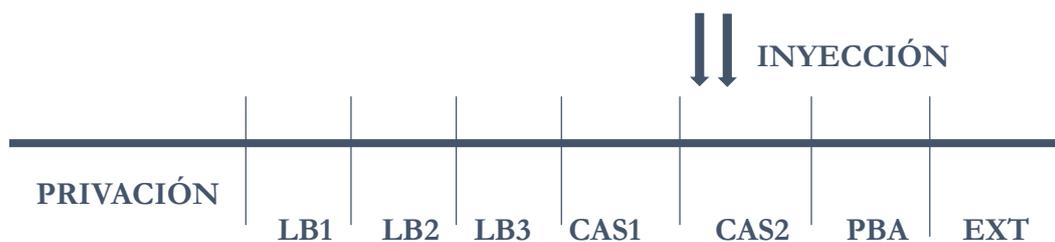


Figura 9. Esquema del protocolo de experimentación con doble inyección. Se muestra el cronograma para cada experimento, se utilizaron tres días de línea base (LB1, LB2 y LB3), seguidos de una primera adquisición del CAS (CAS1); en el quinto día, antes de la segunda adquisición del CAS (CAS2) (durante la evocación), se aplicaron las microinyecciones con los antagonistas de los receptores; el sexto día se hizo una prueba de memoria (PBA) presentado solo el EC y finalmente en el séptimo día se llevó a cabo una sesión de extinción en la cual solo se presentó el EC.

Análisis estadístico

Se hicieron pruebas *t* de Student no pareadas para comparar el consumo de sacarina entre los tratamientos en un día determinado. Un nivel de confiabilidad < 0.05 es aceptado como estadísticamente significativo. También se realizaron pruebas *t* de Student pareadas para comparar el consumo de sacarina entre dos días para el mismo grupo, se consideró un nivel de probabilidad < 0.05 como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Histologías

Un total de 146 ratas fueron canuladas para la elaboración de esta tesis y fueron usadas como sigue:

| | ACE | ABL | CI |
|----------|-----|-----|----|
| NBQX | 17 | 9 | - |
| AP5 | 16 | 19 | - |
| VEHÍCULO | 27 | 22 | - |
| NBQX/AP5 | - | 9 | 9 |
| VEH/VEH | - | 9 | 9 |

Figura 10. Tabla que muestra el número de ratas utilizadas en la inyección de cada fármaco. En total, 17 ratas canuladas en ACE fueron inyectadas con NBQX, 16 ratas con AP5 y 27 con solución vehículo. En cuanto al número de ratas canuladas en la ABL, se utilizaron un total de nueve para la inyección de NBQX, 19 para la inyección de AP5 y 22 inyectadas con solución vehículo. Un total de 9 ratas canuladas en ABL fueron inyectadas con doble fármaco NBQX/AP5 y nueve fueron inyectadas doblemente con solución vehículo. Mientras que las ratas que participaron en el experimento de doble inyección en la CI fueron, 9 para NBQX/AP5 y 9 para vehículo/vehículo.

Se realizaron los estudios histológicos de todos los animales utilizados durante los experimentos con el fin de corroborar la correcta implantación de las cánulas (figuras 11, 12 y 13). Los sujetos con una cirugía errónea fueron descartados del análisis estadístico. Al finalizar, las histologías quedaron los grupos como sigue:

ABL: NBQX n=9, AP5 n=15, NBQX/AP5 n= 9, Vehículo n=18, Vehículo/vehículo 8.

ACE: NBQX n=16 AP5 n=16, Vehículo n=27.

CI: NBQX/AP5 n=9, Vehículo/Vehículo n=9.

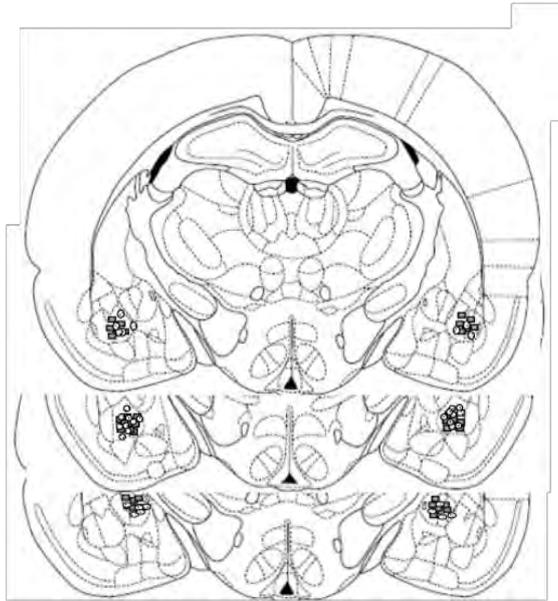


Figura 11. Esquema de los puntos de inyección de las ratas canuladas en ABL. En esta figura podemos observar la localización del inyector en la amígdala basolateral para cada rata. Un total de 68 ratas fueron canuladas en esta estructura. Los cuadros muestran la localización del inyector en los animales tratados con fármaco (NBQX o AP5) y los círculos son los animales vehículo.

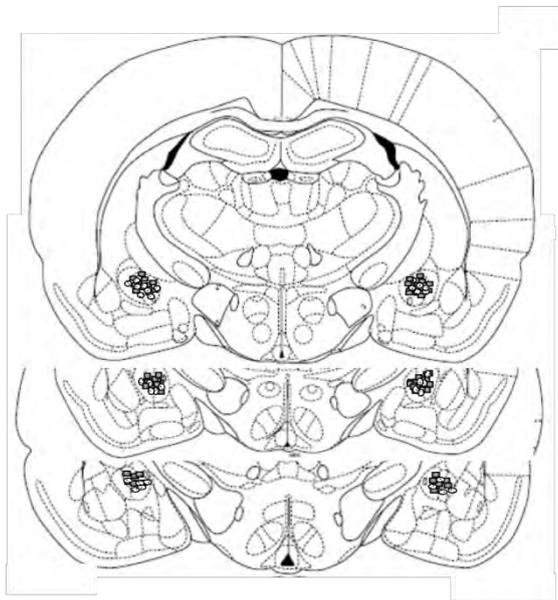


Figura 12. Esquema de los puntos de inyección de las ratas canuladas en Ace. En esta figura podemos observar la localización del inyector en la amígdala central para cada rata. Un total de 60 ratas fueron canuladas en esta estructura. Los cuadros muestran la localización del inyector en los animales tratados con fármaco (NBQX o AP5) y los círculos son los animales vehículo.

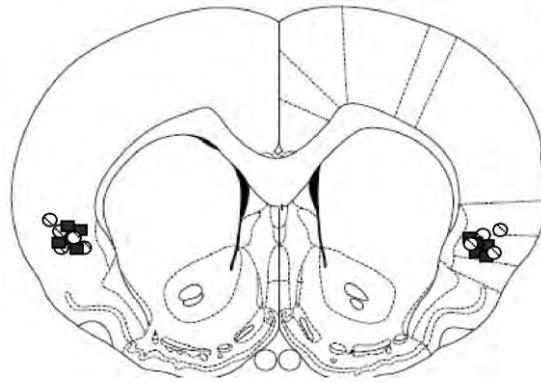


Figura 13. Esquema de los puntos de inyección de las ratas canuladas en CI. En esta figura podemos observar la localización del inyector en la corteza insular para cada rata. Un total de 18 ratas fueron canuladas en esta estructura. Los cuadros muestran la localización del inyector en los animales tratados con fármaco (NBQX/AP5) y los círculos son los animales vehículo/vehículo.

Participación de los receptores AMPA en la evocación del CAS

Para evaluar la participación de los receptores AMPA de la ABL durante la evocación del CAS, se aplicó una inyección NBQX (antagonista de AMPA) 45 min antes de la evocación del primer CAS, que corresponde a la segunda adquisición (CAS2). Se observó que los animales que fueron inyectados con NBQX presentaron un bloqueo de la evocación del primer CAS; sin embargo, se aprecia que no hay efecto sobre la consolidación del segundo CAS en la prueba de memoria (figura 14). Un análisis con prueba de *t* de Student no pareada entre ambos grupos reveló diferencias significativas en el segundo CAS ($t_{(15)} = -3.382$, $p < 0.05$). Por lo tanto, podemos suponer que los receptores AMPA de la ABL participan en la evocación del CAS.

El día de la prueba, no se observaron diferencias entre los consumos de ambos grupos, lo que apunta a que los dos grupos pudieron asociar y consolidar las dos presentaciones del CAS, a pesar del bloqueo de los receptores AMPA en la ABL. Una prueba de *t* de Student no pareada reveló que no hay diferencias significativas en el tercer consumo de sacarina entre los dos grupos ($t_{(15)} = -1.546$, p NS). Además, un análisis de *t* de Student entre el CAS 2 y la prueba para el grupo inyectado con NBQX ($t_{(8)} = 4.521$, $p < 0.01$) mostró diferencias altamente

significativas entre consumos. Esto sugiere que, a pesar de la falta de evocación, el grupo experimental fue capaz de adquirir y consolidar ambos condicionamientos. Estos resultados apuntan a que en la amígdala basolateral son necesarios los receptores AMPA para evocar la memoria de aversión al sabor, pero no para su adquisición o reconsolidación. Además, estos datos sugieren que la reconsolidación de dicha memoria no es dependiente de evocación.

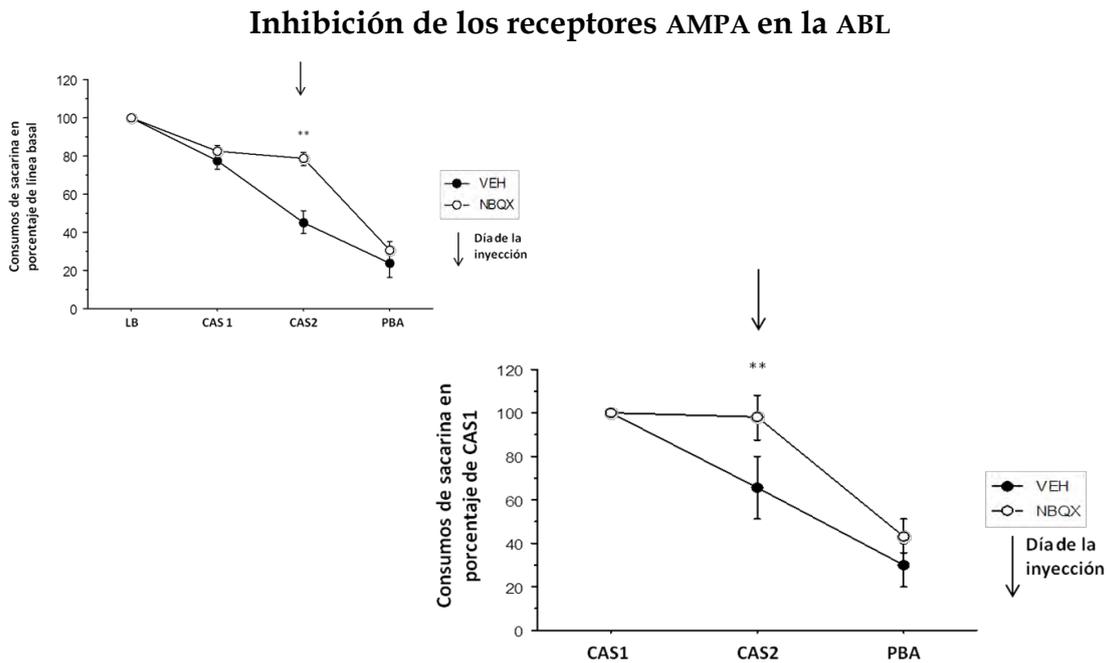


Figura 14. El bloqueo de los receptores AMPA en la ABL produce una inhibición en la evocación del CAS. En esta figura se muestran los consumos en porcentajes de CAS1 (parte inferior derecha) y de promedio de línea base (parte superior izquierda) de ambos grupos de las dos adquisiciones del CAS y de la prueba. Se puede observar el efecto del fármaco en la evocación de la memoria de aversión al sabor, pero no así en su adquisición o consolidación. La flecha indica el momento de la microinyección. ** $p < 0.001$ entre los grupos en el CAS 2. Animales vehículo $n = 7$, animales NBQX $n = 9$.

De igual forma, se inyectó NBQX en la ACe 45 min antes de la evocación del primer CAS y de la adquisición del segundo (CAS2). No se observaron diferencias significativas tanto en el día de la inyección como en el día de la prueba (figura 15). Una prueba de t de Student no pareada reveló que no hay diferencias significativas para los grupos en el día de la inyección ($t_{(13)} = -.912$; $p > 0.05$) o en el día de la prueba ($t_{(13)} = -.887$; $p > 0.05$). Por lo que podemos decir que los receptores

AMPA de la ACE no son necesarios para la evocación ni la reconsolidación de la memoria del condicionamiento de aversión al sabor

Inhibición de los receptores AMPA en ACE

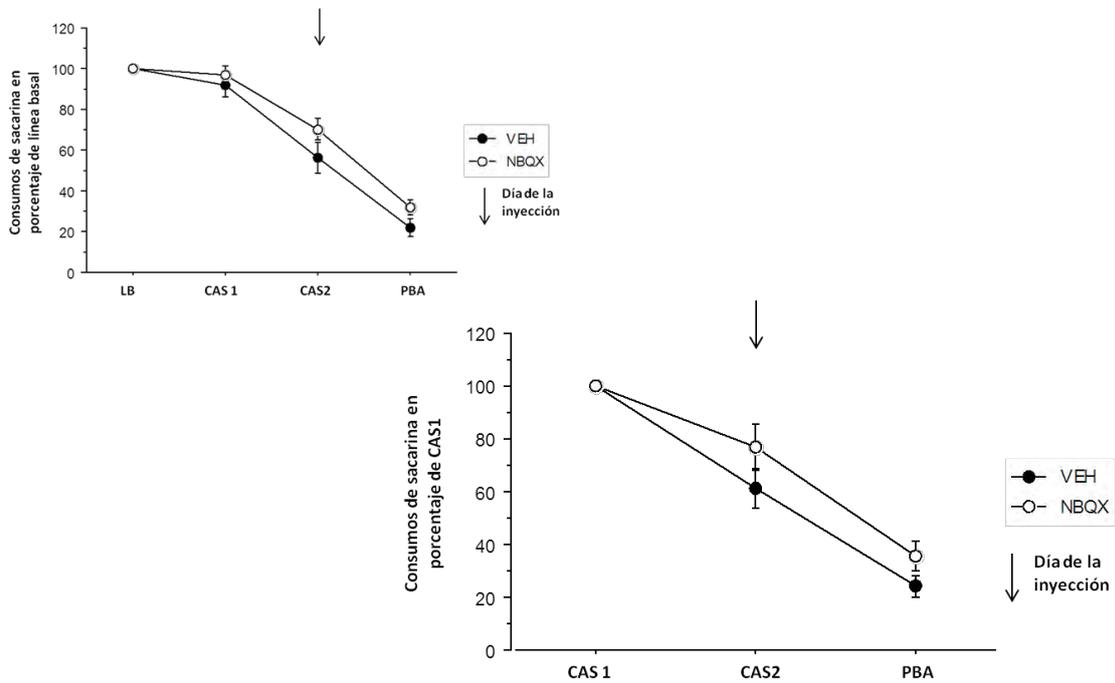


Figura 15. La Inhibición de los receptores AMPA en la ACE durante la evocación del CAS no tiene efecto. En esta figura se muestran los consumos en porcentajes de promedio de línea base (parte superior izquierda) y de CAS1 (parte inferior derecha) de ambos grupos durante las dos adquisiciones del CAS y durante la prueba. Se puede observar que la inhibición de los receptores AMPA en la ACE no tuvo efecto en la evocación del CAS1 ni en la consolidación del segundo CAS. La flecha indica el momento de la inyección. Animales vehículo $n = 17$, animales NBQX $n = 13$.

Participación de los receptores NMDA en la evocación del CAS

Para evaluar la participación de los receptores a glutamato NMDA en la evocación del CAS, se inyectó el antagonista AP5 en la ABL, 15 mins antes de la evocación del primer CAS y de la adquisición del segundo (CAS2). No encontramos efecto sobre la evocación del primer CAS, pero sí se percibe un ligero efecto en la actualización del CAS (figura 16). Una prueba de t de student no pareada muestra que no hay diferencias entre los grupos el día de la inyección ($t_{(24)} = -.393$; $p > 0.05$) pero sí el día de la prueba ($t_{(24)} = -2.125$; $p < 0.05$). Además, una prueba t de Student pareada mostró diferencias entre los consumos del día de la prueba y el día de la inyección, en el grupo de animales tratados con AP5, y se encontraron diferencias

significativas $t(25)=-8.147; p<0.05$, por lo cual podemos decir que el efecto observado es en la reconsolidación del CAS. En la figura 16 se observa que no solo se afectó la consolidación de una segunda presentación del CAS, sino que se afecta parte del trazo previo de la memoria de manera parcial.

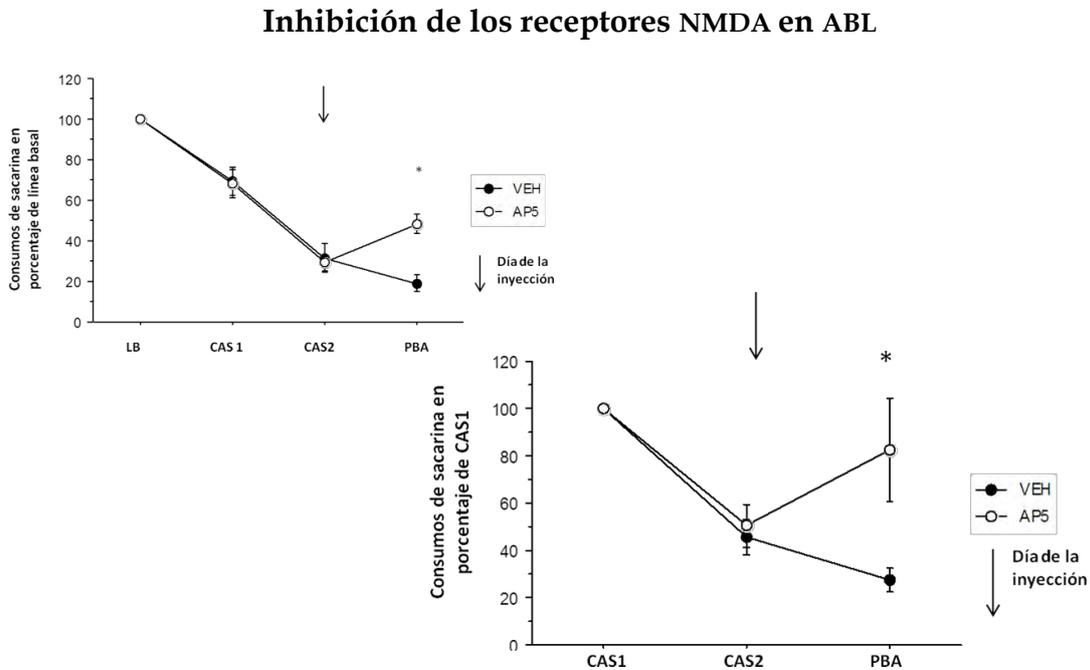


Figura 16. La inhibición de los receptores NMDA en la ABL durante la evocación del CAS tiene un efecto en la reconsolidación. En esta figura se muestran los consumos en porcentajes de promedio de línea base (parte superior izquierda) y de consumo de CAS1 (parte inferior derecha) de ambos grupos durante las adquisiciones del CAS y durante la prueba. Se observa un efecto en la reconsolidación del CAS; decimos esto ya que la inhibición de los receptores NMDA no solo afectó la consolidación del CAS, sino también el trazo de memoria previo (CAS1), y el consumo de los animales está en un punto medio entre el CAS1 y el CAS2. La flecha indica el momento de la inyección. * $p<0.05$. Animales vehículo $n = 11$, animales AP5 $n = 15$.

Para evaluar la función de los receptores NMDA durante la evocación del CAS en la ACE, se aplicó la misma inyección y se observó un efecto en la consolidación del segundo CAS en los animales que fueron inyectados con AP5, lo que sugiere la participación de los receptores NMDA en la ACE para la consolidación, pero no para la evocación del CAS (figura 17). Una prueba de t de Student no pareada muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos en día de la inyección ($t(28)=-.628; p>0.05$) pero sí reveló diferencias significativas ($t(28)=-4.562; p<0.05$) el día de la prueba. Estos datos confirman que los animales que

fueron inyectados con AP5 no consolidaron el segundo CAS, ya que en el día de la prueba su consumo es similar al del día de la inyección (CAS2).

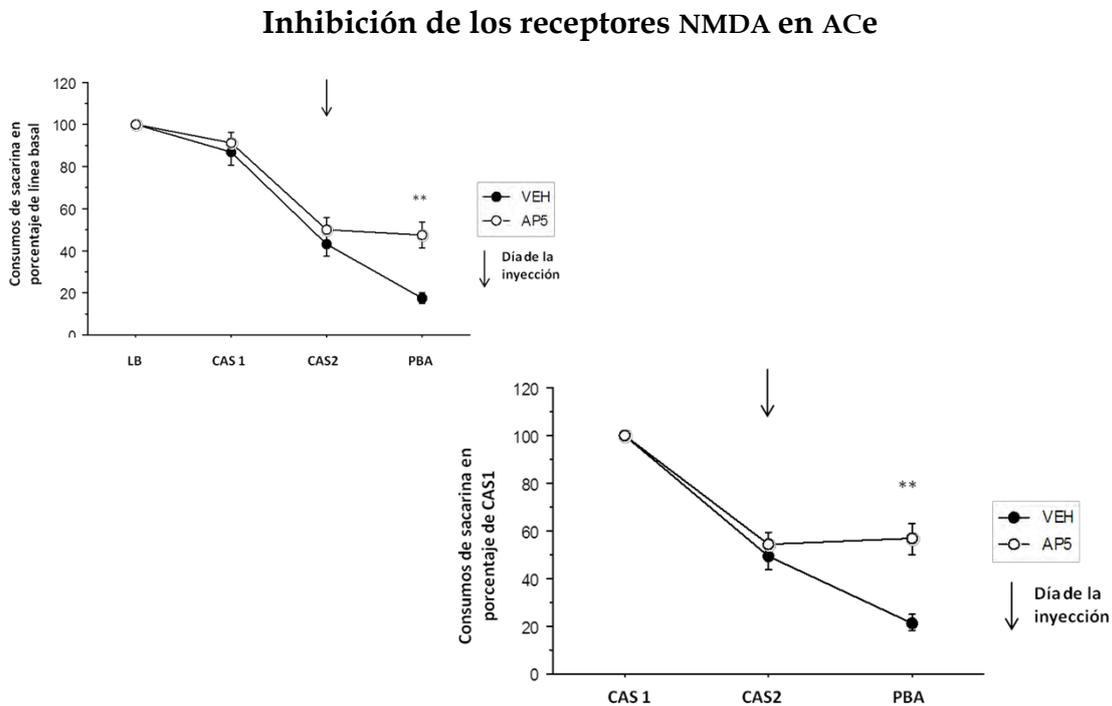


Figura 17. La inhibición de los receptores NMDA en la ACE durante la evocación del CAS tiene un efecto en la consolidación del CAS. En la figura se muestran los consumos en porcentajes de promedio de línea base (parte superior izquierda) y de consumo de CAS1 (parte inferior derecha) de ambos grupos durante las adquisiciones del CAS y durante la prueba. Se observa que la inhibición de los receptores NMDA en la ACE tuvo efecto en la consolidación del segundo CAS, ya que los animales que fueron inyectados con AP5 no muestran aversión el día de la prueba y su consumo es similar al del día de la inyección (CAS2). No así los animales que fueron inyectados con solución vehículo. $**p < 0.0001$. Animales vehículo $n = 14$, animales AP5 $n = 16$.

Inhibición de los receptores NMDA y AMPA en una segunda adquisición del CAS

Dados los datos observados en la amígdala basolateral, en donde se aprecia que la inhibición de los receptores AMPA tiene un efecto en la evocación del CAS, y que la inhibición de los receptores NMDA afecta la reconsolidación, quisimos evaluar el efecto que tendría el inhibir a ambos tipos de receptores a glutamato antes de la segunda presentación del CAS, es decir, antes de la evocación. Podemos observar que los animales inyectados con ambos fármacos NBQX/AP5 no presentan evocación el día de la prueba, y no reconsolidan (primer CAS) o

consolidan (segundo CAS) la memoria (figura 18). Pruebas de *t* de Student no pareadas se hicieron entre los grupos en el día de la inyección y el de la prueba, se encontraron diferencias significativas para ambos días ($t_{(15)}=-4.238$; $p<0.05$ y $t_{(15)}=-8.070$; $p<0.05$).

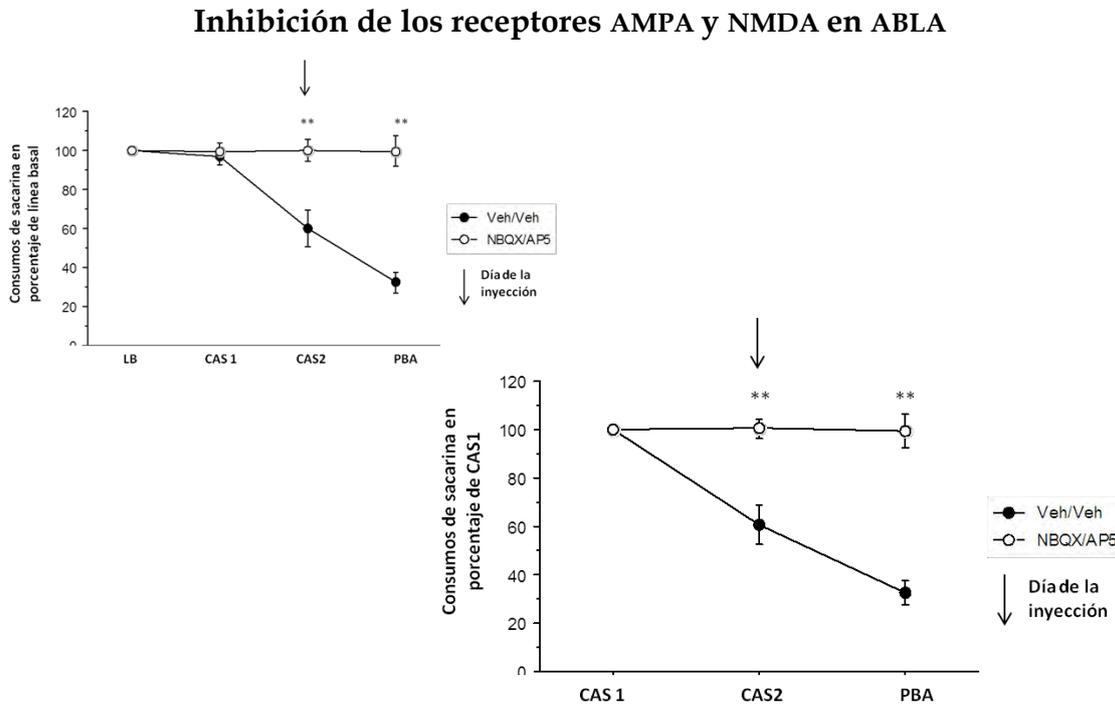


Figura 18. La inhibición de los receptores AMPA y NMDA en la amígdala basolateral antes de la segunda adquisición del CAS tiene efecto tanto en la evocación como en la consolidación/reconsolidación del CAS. En la figura se muestran los consumos en porcentajes de promedio de línea base (parte superior izquierda) y de consumo de CAS1 (parte inferior derecha) de ambos grupos durante las adquisiciones del CAS y durante la prueba. Podemos observar que los animales inyectados con NBQX/AP5 no presentan evocación el día de la inyección, pero también se ve afectada la consolidación/reconsolidación de la de la memoria; no así con los animales que fueron inyectados con solución vehículo. $**p<0.001$. Animales vehículo $n = 9$, animales NBQX/AP5 $n = 8$.

Participación de los receptores a glutamato en la CI

Para evaluar la función de los receptores AMPA y NMDA en la CI al momento de la evocación, se aplicó la inyección de los antagonistas NBQX y AP5, 45 (en el caso del NBQX) y 15 min (en el caso de AP5) antes de la segunda adquisición del CAS. Los resultados obtenidos muestran un efecto de los antagonistas en la

consolidación del segundo CAS, pero no en la evocación, ya que el día de la inyección los animales presentan aversión similar a los animales inyectados con solución vehículo. Sin embargo, el día de la prueba presentan una aversión menor y similar a la del día de la inyección (en el CAS2), por lo cual podemos decir que tuvimos un efecto en la consolidación del segundo CAS (figura 19).

Pruebas de *t* de Student no pareadas se efectuaron para observar diferencias entre los grupos en los días de la inyección y la prueba, no se encontraron diferencias significativas para el día de la inyección ($t_{(16)}=-1.207$; $p>0.05$) y para el día de la prueba se encontraron diferencias significativas ($t_{(16)}=-3.976$; $p<0.05$). Por lo tanto podemos decir que los animales no fueron capaces de consolidar el segundo CAS.

Inhibición de los receptores AMPA Y NMDA en CI

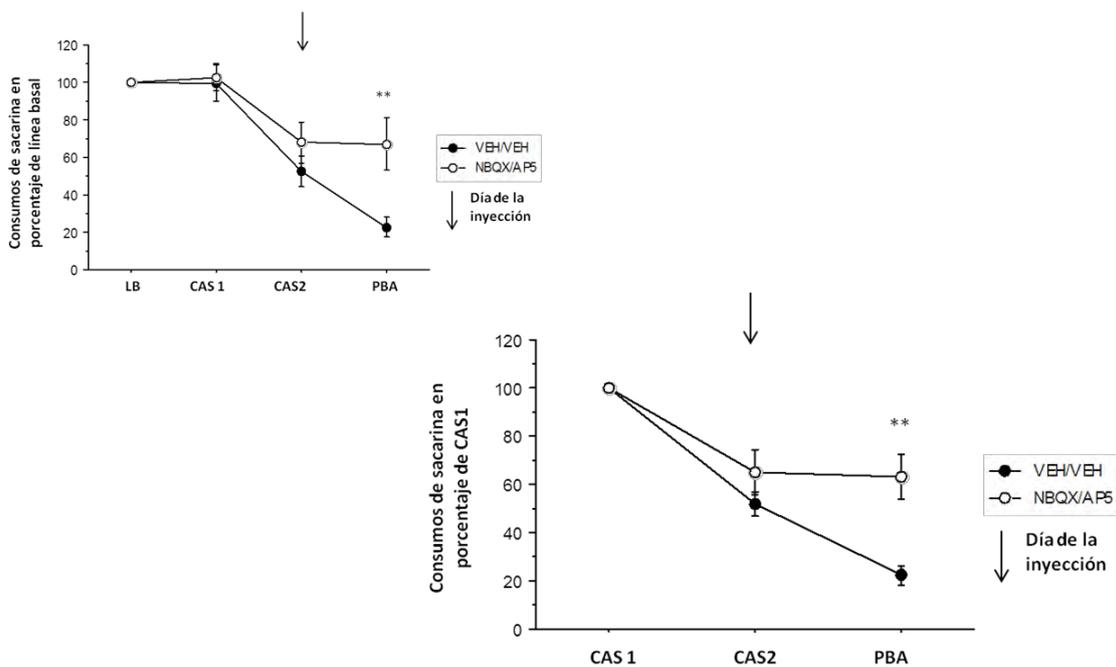


Figura 19. La inhibición de los receptores AMPA y NMDA en la CI durante la evocación del CAS tiene un efecto en la consolidación del CAS2. En la figura se muestran los consumos en porcentajes de promedio de línea base (parte superior izquierda) y de consumo de CAS1 (parte inferior derecha) de ambos grupos durante las adquisiciones del CAS y durante la prueba. Se observa que la inhibición de los receptores NMDA en la CI tuvo efecto en la consolidación del segundo CAS, ya que los animales que fueron inyectados con NBQX/AP5 no muestran aversión el día de la prueba y su consumo es similar al del día de la inyección (CAS2). No así los animales que fueron inyectados con solución vehículo. $**p<0.0001$. Animales vehículo $n = 9$, animales NBQX/AP5 $n = 9$.

DISCUSIÓN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central y puede generar una gran diversidad de efectos celulares dependiendo del tipo de receptores que éste active. En este trabajo demostramos que las distintas fases de la memoria del CAS requieren de la activación específica de distintos tipos de receptores a glutamato. Nuestros resultados sugieren que la activación de los receptores del tipo AMPA promueve la facilitación sináptica necesaria para que se lleve a cabo la evocación, mientras que la actividad de los receptores NMDA induce la síntesis de proteínas requerida para la consolidación y reconsolidación. Además, pudimos observar que los núcleos basolateral y central de la amígdala, así como la corteza insular regulan diferentes fases del procesamiento de dicha memoria. Esto sugiere que los receptores a glutamato tiene un efecto diferencial en cada una de las estructuras, activando vías de señalización diferentes para cada fase de la memoria.

Los receptores AMPA en el procesamiento de la memoria del CAS

En este trabajo observamos que los receptores AMPA de la ABL son necesarios para la evocación del CAS (figura 14) y no así los de la ACe (figura 15). Sin embargo, aunque la inyección de NBQX en la ABL evitó la evocación de la memoria, no se modificó la adquisición o consolidación del segundo CAS (figura 14 y 15). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Maren en 2010 quienes observaron que la inhibición de los receptores AMPA en la ABL después de la adquisición de una tarea aversiva (prevención pasiva), no afectan la capacidad de adquirir nueva información.

Se ha propuesto que los procesos que subyacen a la memoria del CAS son similares a los que subyacen a la PLP (Yasoshima, 2000), además Kapug y colaboradores (2000) lograron disminuir la transmisión sináptica, sin inhibirla por completo, al bloquear a los receptores AMPA en un protocolo de PLP. Este conjunto de datos nos permiten inferir que la evocación es mediada por una

respuesta transitoria inducida por la activación de los receptores AMPA en la ABL sin necesidad de que haya síntesis de nuevas proteínas, como ocurre con la PLP.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Maren en 2010, quienes observaron una participación diferencial de los receptores de tipo AMPA y NMDA en la amígdala durante el procesamiento de una memoria de aversión, ellos utilizaron una tarea llamada prevención pasiva (Zimmerman *et al*, 2010). Ellos entrenaron ratas a asociar un EC que en este caso fue contextual y un EI que fue un choque eléctrico. Un día después de la adquisición de la tarea inyectaron NBQX o AP5 y observaron que los animales que fueron inyectados con NBQX tanto en la ABL como en la ACe presentaron un congelamiento menor en comparación con los animales que fueron inyectados con solución vehículo. Con estos resultados ellos demostraron que los receptores del tipo AMPA de la ABL y de la ACe son necesarios para la expresión de la memoria del condicionamiento al miedo.

Se sabe que los receptores NMDA requieren de la activación previa de los receptores de tipo AMPA; sin embargo, nuestros resultados sugieren que los receptores NMDA pueden activarse en cierta medida aun si la actividad de los receptores AMPA está reducida. A pesar de que el mecanismo de activación de los receptores NMDA en ausencia de la corriente inducida por los receptores AMPA no está claro, se ha propuesto un mecanismo distinto de activación de los receptores NMDA bajo estas condiciones. En este modelo, la liberación de dopamina puede inducir directamente el aumento de la excitabilidad de las neuronas de la ABL en la ausencia de corrientes inducidas por la activación de los receptores AMPA, inhibiendo la corriente de K⁺ hacia el exterior, lo cual genera la despolarización de la membrana y el desbloqueo de los canales NMDA (Kroner, 2005). En este sentido, se sabe que la dopamina es esencial para la expresión de las memorias aversivas (Lamont, 1998) y es liberada en la ABL durante la formación de la memoria de estas tareas (Suzuki, 2002).

Además de la activación dependiente de dopamina de los receptores NMDA, se ha sugerido también que en la ABL pueden quedar pequeñas corrientes de Ca^{++} producidas por los receptores NMDA que puedan inducir la activación de las vías de señalización necesarias para la síntesis de proteínas requeridas en los procesos de consolidación y reconsolidación (Rainnie, 1991). Esta es otra posible explicación de lo que se observó durante el desarrollo de esta tesis.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante la inhibición de los receptores AMPA en la amígdala basolateral demuestran que la evocación además de ser dependiente de estos receptores, no es necesaria para iniciar el proceso de la consolidación o reconsolidación de la memoria del CAS y que se trata de procesos independientes (Figura 20).

Los receptores NMDA en el procesamiento de la memoria del CAS

En concordancia con los resultados previamente mencionados, a través de la inhibición farmacológica de los receptores NMDA demostramos que la activación de estos receptores en la ACe participa en la consolidación (figura 17), mientras que los de la ABL regulan la reconsolidación del CAS (figura 16). Lo anterior respalda de nueva cuenta la idea de que la evocación, la consolidación y reconsolidación del CAS son procesos independientes.

Debido a que la consolidación y la reconsolidación requieren de la síntesis de proteínas, nuestros datos nos permiten inferir que se requiere de la activación de los receptores del tipo NMDA para que se lleve a cabo esta síntesis y en consecuencia, los cambios plásticos requeridos para estos procesos (Figura 20). Al respecto, recientemente se ha identificado una vía de señalización independiente de Ca^{++} y Na^{+} que se activa cuando los receptores NMDA y mGluR5 son coactivados, teniendo como consecuencia la síntesis de AMP cíclico y la activación de ERK1/2, y CREB, que se saben necesarios para procesos plásticos de la formación de la memoria (Yang, 2004; Kida, 2002). Dado que los receptores NMDA y mGluR5 son necesarios para la consolidación de las memorias aversivas

es posible que se coactiven durante la reactivación de la memoria (el segundo CAS) y activen muchos de los mecanismos moleculares necesarios para la reconsolidación. Lo anterior concuerda con nuestros resultados ya que la inhibición de los receptores NMDA en la ACe y en la ABL evita los procesos de consolidación y de reconsolidación de la memoria del CAS, respectivamente.

Retomando la idea de que los procesos que subyacen a la memoria del CAS son similares a los que subyacen a la PLP (Yasoshima, 2000) y en concordancia con que el bloqueo de los receptores NMDA pero no de los AMPA, inhibe la inducción de la PLP (Kapug et al., 2000), podemos decir que la activación de los receptores NMDA es necesaria para los cambios plásticos característicos de la inducción de la PLP y que estos receptores pueden activarse aún en ausencia de las corrientes despolarizantes dependientes de los receptores AMPA; lo anterior concuerda y respalda los resultados obtenidos en esta tesis.

En cuanto a la diferencia entre los resultados obtenidos con la inhibición de los receptores NMDA en la ACe (consolidación) y ABL (reconsolidación) podría ser explicada por las diferencias reportadas en la composición de dichos receptores entre ambos núcleos de la amígdala. Los receptores NMDA están formados por una combinación de las subunidades NR1, NR2 (A, B, C y D) y NR3 (A y B) (Cull-Candy et al, 2001). Recientemente, un estudio electrofisiológico en la ABL y la ACe demostró que los receptores NMDA de la ACe son inhibidos por el ifenprodil, antagonista que tienen mayor afinidad por los receptores con subunidades NR2B. Más aún, los receptores de tipo NMDA de este núcleo tienen una cinética de apertura de canal más lenta y duradera (López de Armentia, 2003), lo que sugiere fuertemente que los receptores NMDA de la ACe están compuestos mayoritariamente por una combinación de las subunidad NR1 y NR2B. A su vez los receptores NMDA de las neuronas de la ABL son menos sensibles a ser inhibidos por ifenprodil y tienen cinética de apertura de canal más rápida pero corta, sugiriendo que estos receptores están compuestos en su mayoría por las subunidades NR1/NR2A (López de Armentia, 2003).

Tomando en cuenta lo anterior, existen varias posibles explicaciones para los datos obtenidos en esta tesis. Una de ellas es que las diferencias entre la composición de los receptores NMDA de la ACe y de la ABL promuevan la activación de distintas vías de señalización debido a las proteínas que pueden estar asociadas a las distintas subunidades. Otra opción es que la velocidad y duración de la apertura del canal afecte la duración y frecuencia del estímulo que llevan a cabo las neuronas lo que podría regular de manera específica la consolidación o la reconsolidación del CAS. Sin embargo, en esta tesis se utilizó AP5 como el antagonista de los receptores NMDA, el cual tiene gran afinidad por los receptores conformados por las subunidades NR2A y NR2B (Cull-Candy et al, 2001; Paoletti, 2007). Esto sugiere que bloqueamos por igual los receptores NMDA en la ACe y la ABL y no nos ayuda a determinar si las diferencias observadas como resultado de la inhibición con AP5 en los núcleos de la amígdala se debe a las diferencias en la composición de los receptores NMDA.

Se han utilizado antagonistas específicos en la ABL para distinguir entre procesos de memorias aversivas, tal es el caso de Milton y colaboradores quienes en este año (2013) reportaron una participación diferencial de los receptores con subunidades NR2A y NR2B en la memoria del condicionamiento al miedo. Encontraron que el ifenprodil, antagonista específico de NR2B, afecta la desestabilización pero no la re-estabilización de la memoria, mientras que el antagonista NVP-AA077, específico de receptores NR2A impide la re-estabilización de una memoria previamente consolidada. Este trabajo concuerda con nuestros datos en los que la inhibición de los receptores AMPA en la ABL impide la evocación de la memoria dejando la capacidad de adquirir nueva información intacta, un fenómeno aparentemente compartido en las memorias aversivas.

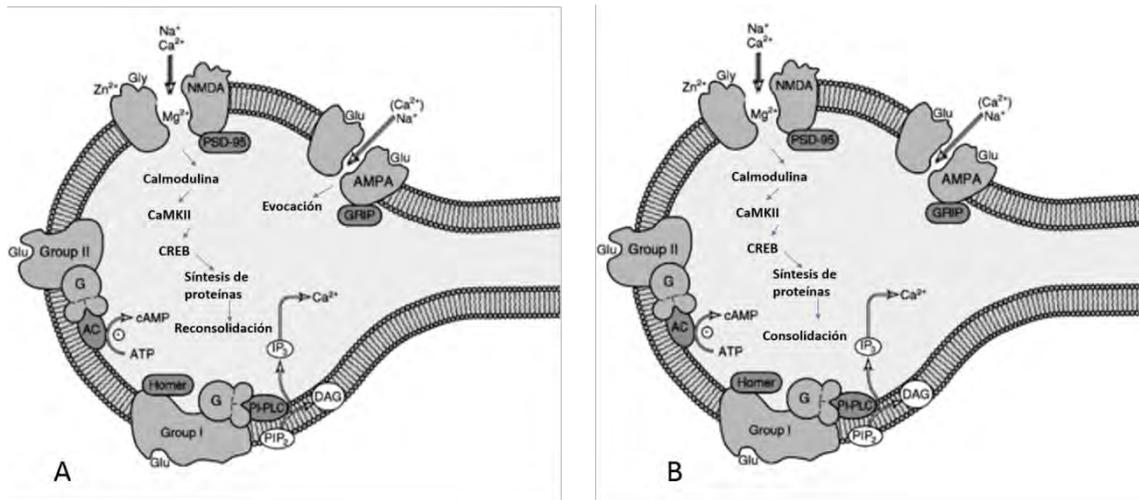


Figura 20. Figura representativa de los resultados observados en este trabajo. Nuestros resultados muestran que la activación de los receptores AMPA de la ABL son necesarios para la evocación de la memoria, mientras que la activación de los receptores NMDA de la ABL son necesarios para que se lleven a cabo las vías de señalización necesarias para el proceso de reconsolidación (Figura 20 inciso A). Mientras que la activación de los receptores NMDA en la ACe es necesaria para que se lleve a cabo el proceso de consolidación de la memoria del CAS (Figura 20 inciso B) (Modificado de Siegel et al., 1999).

Los receptores a glutamato en la CI

En esta tesis también se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de los receptores AMPA (NBQX) y NMDA (AP5) de la CI en el CAS. En concordancia con los datos previamente mencionados (Escobar et al, 2000; Garcia-DeLaTorre et al, 2009.) nuestros resultados demuestran que la inhibición de ambos receptores a glutamato de la CI evita la consolidación del segundo CAS (fig 19). Adicionalmente, en el 2002 Ferreira y colaboradores demostraron que la inactivación de los receptores NMDA mediante la inyección del antagonista AP5 en la CI evita la consolidación de la memoria del CAS. En concordancia con estos antecedentes los resultados de este trabajo sugieren que la activación de los receptores a glutamato de la CI es necesaria para la consolidación y reconsolidación del CAS.

La ABL, la ACe y la CI en el procesamiento del CAS

A diferencia de lo que se había reportado con anterioridad (Bahar et al., 2003; Garcia-delaTorre et al., 2009), nosotros encontramos que la ABL juega un papel central en el procesamiento del CAS, ya que el bloqueo de los receptores AMPA en

este núcleo de la amígdala impide la evocación sin afectar la consolidación o reconsolidación (figura 14) y los receptores NMDA en la ABL son esenciales para la reconsolidación del CAS (figura 16). Cabe mencionar que se ha demostrado que existe una correlación directa entre la eficiencia del aprendizaje de una asociación de EC-EI y el nivel de expresión del ARN mensajero de ARC (gen de expresión temprana asociado a la formación de la memoria) en las neuronas de la ABL. Estos resultados llevaron a los autores de ese trabajo a proponer que las neuronas de la ABL son el punto de convergencia del EC y del EI, (Chung et al, 2011). En conjunto con nuestros resultados, lo anterior sugiere que la ABL es un punto de convergencia para los EC y EI, indicando que la ABL sufre cambios plásticos debidos al aprendizaje del CAS, muy probablemente mediados por los receptores NMDA.

Adicionalmente, la ABL tiene una cinética de activación más rápida que la ACe y es la principal inervación aferente de dicho núcleo (Walker, 2002; Sah et al., 2003). Otra característica importante de la ABL es que está conectada recíprocamente con la CI (Nieuwenhuys 2012). En este sentido, se sabe que la CI y la ACe están involucradas en la reconsolidación del CAS, ya que ésta se evita cuando se inhibe la síntesis de proteínas en ambas estructuras simultáneamente (Garcia-delaTorre, 2009). Con estos datos nosotros proponemos que la ABL puede funcionar como un primer relevo para la memoria del condicionamiento al miedo y que los cambios plásticos inducidos por un primer ensayo de adquisición infieren a la estructura la capacidad de evocar el trazo de memoria y participar en su almacenamiento a largo plazo.

Aunque los datos presentados en esta tesis muestran una participación diferencial de los núcleos de la amígdala en el procesamiento de la memoria del CAS, existen un argumentos razonables para pensar en la probabilidad de difusión de los fármacos a núcleos adyacentes al núcleo dirigido (Reilly y Bornovalova, 2005). Por lo cual, los datos presentados deben evaluarse con

cuidado aun cuando los grupos de histología y control fueron cuidadosamente seleccionados.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que los receptores AMPA en la ABL son necesarios para la expresión (evocación) de la memoria del CAS, pero no así para la consolidación y reconsolidación de ésta. Se sabe que la consolidación y la reconsolidación son dependientes de la síntesis de nuevas proteínas y de la adquisición de información para llevarse a cabo (Rodríguez-Ortíz, 2005). Los resultados aquí descritos sugieren que la activación de los receptores NMDA es necesaria para que se activen las vías de señalización que promueven la síntesis de nuevas proteínas necesarias para el proceso de la consolidación y reconsolidación de la memoria del CAS, tanto en la CI como en la amígdala.

Por lo anterior, los datos de esta tesis aportan información relevante para entender la participación de los receptores AMPA y NMDA en los procesos de formación de la memoria del CAS.

En conclusión esta tesis demuestra que los receptores del tipo NMDA en la CI son necesarios para la consolidación de la memoria, mientras que observamos una participación diferencial de la ACe y de la ABL en la formación de la memoria del CAS. Nosotros proponemos que la ABL actúa como un primer relevo en los procesos de evocación y reconsolidación de la memoria, los cuales son mediados por los receptores AMPA y NMDA, respectivamente. Como ya ha sido sugerido con anterioridad, este tipo de conocimiento puede ayudar en el futuro para desarrollar medicamentos específicos para estas estructuras y receptores con el fin de manipular la fuerza de una memoria aversiva, permitiendo a los especialistas atenuar el miedo en pacientes con estrés postraumático.

LITERATURA CITADA

- Abbott, L. F. and S. B. Nelson (2000). "Synaptic plasticity: taming the beast." Nat Neurosci 3 Suppl: 1178-1183.
- Aggleton, J. P. (1986). "A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey." Exp Brain Res 64(3): 515-526.
- Aggleton, J. P., R. Desimone and M. Mishkin (1986). "The origin, course, and termination of the hippocampothalamic projections in the macaque." J Comp Neurol 243(3): 409-421.
- Baddeley A. (1999). *Memoria humana: teórica y práctica*. Madrid, McGraw-Hill (67-69).
- Bahar, A., A. Samuel, S. Hazvi and Y. Dudai (2003). "The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it." Eur J Neurosci 17(7): 1527-1530.
- Barondes, S. H. and H. D. Cohen (1967). "Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 58(1): 157-164.
- Ben Mamou, C., K. Gamache and K. Nader (2006). "NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories." Nat Neurosci 9(10): 1237-1239.
- Berman, D. E., S. Hazvi, V. Neduva and Y. Dudai (2000). "The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace." J Neurosci 20(18): 7017-7023.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004). "Molecular mechanisms of taste-recognition memory." Nat Rev Neurosci 5(3): 209-217.
- Bermudez-Rattoni, F. (2010). "Is memory consolidation a multiple-circuit system?" Proc Natl Acad Sci U S A 107(18): 8051-8052.
- Bernstein, I. L. and M. T. Koh (2007). "Molecular signaling during taste aversion learning." Chem Senses 32(1): 99-103.
- Canteras, N. S., R. B. Simerly and L. W. Swanson (1992). "Connections of the posterior nucleus of the amygdala." J Comp Neurol 324(2): 143-179.
- Bures, J. Bermudez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*. Oxford University Press Editors, New York.
- Cavazzini, M., T. Bliss and N. Emptage (2005). "Ca²⁺ and synaptic plasticity." Cell Calcium 38(3-4): 355-367.
- Cull-Candy, S., S. Brickley and M. Farrant (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Curr Opin Neurobiol 11(3): 327-335.
- Chung, A., S. K. Barot, J. J. Kim and I. L. Bernstein (2011). "Biologically predisposed learning and selective associations in amygdalar neurons." Learn Mem 18(6): 371-374.

- Davis, M. (2002). "Role of NMDA receptors and MAP kinase in the amygdala in extinction of fear: clinical implications for exposure therapy." Eur J Neurosci 16(3): 395-398.
- Davis, M., D. Rainnie and M. Cassell (1994). "Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety." Trends Neurosci 17(5): 208-214.
- De la Cruz, V., C. J. Rodriguez-Ortiz, I. Balderas and F. Bermudez-Rattoni (2008). "Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories." Eur J Neurosci 28(7): 1377-1381.
- Debiec, J., J. E. LeDoux and K. Nader (2002). "Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus." Neuron 36(3): 527-538.
- Desmedt, A., S. Hazvi and Y. Dudai (2003). "Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of the associative process engaged: taste versus context association." J Neurosci 23(14): 6102-6110.
- Dudai, Y. (2004). "The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?" Annu Rev Psychol 55: 51-86.
- Duncan, C. P. (1949). "The retroactive effect of electroshock on learning." J Comp Physiol Psychol 42(1): 32-44.
- Escobar, M. L. and F. Bermudez-Rattoni (2000). "Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention." Brain Res 852(1): 208-212.
- Escobar, M. L. and B. Derrick (2007). Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory Formation. Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging. F. Bermudez-Rattoni. Boca Raton (FL).
- Flexner, J. B., L. B. Flexner, E. Stellar, G. De La Haba and R. B. Roberts (1962). "Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin." J Neurochem 9: 595-605.
- Frankland, P. W. and B. Bontempi (2005). "The organization of recent and remote memories." Nat Rev Neurosci 6(2): 119-130.
- Garcia-DeLaTorre, P., C. J. Rodriguez-Ortiz, J. L. Arreguin-Martinez, P. Cruz-Castaneda and F. Bermudez-Rattoni (2009). "Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated." Learn Mem 16(9): 514-519.
- Hupbach, A., R. Gomez, O. Hardt and L. Nadel (2007). "Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information." Learn Mem 14(1-2): 47-53.
- Izquierdo, L. A., D. M. Barros, J. H. Medina and I. Izquierdo (2003). "Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats." Neurobiol Learn Mem 79(1): 51-56.
- Jackson, P. A., R. P. Kesner and K. Amann (1998). "Memory for duration: role of hippocampus and medial prefrontal cortex." Neurobiol Learn Mem 70(3): 328-348.
- Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses." Science 294(5544): 1030-1038.

- Kandel, E. R. and L. R. Squire (2000). "Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind." Science 290(5494): 1113-1120.
- Kapus, G., J. I. Szekely, J. Durand, A. Ruiz and I. Tarnawa (2000). "AMPA receptor antagonists, GYKI 52466 and NBQX, do not block the induction of long-term potentiation at therapeutically relevant concentrations." Brain Res Bull 52(6): 511-517.
- Kesner, R. P. and J. Rogers (2004). "An analysis of independence and interactions of brain substrates that subserve multiple attributes, memory systems, and underlying processes." Neurobiol Learn Mem 82(3): 199-215.
- Kroner, S., J. A. Rosenkranz, A. A. Grace and G. Barrionuevo (2005). "Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro." J Neurophysiol 93(3): 1598-1610.
- Lamont, E. W. and L. Kokkinidis (1998). "Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm." Brain Res 795(1-2): 128-136.
- Lamprecht, R. and Y. Dudai (1996). "Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory." Learn Mem 3(1): 31-41.
- Lamprecht, R., S. Hazvi and Y. Dudai (1997). "cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory." J Neurosci 17(21): 8443-8450.
- LeDoux, J. E. (1993). "Emotional memory systems in the brain." Behav Brain Res 58(1-2): 69-79.
- Lee, J. L. (2008). "Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning." Nat Neurosci 11(11): 1264-1266.
- Link, W., U. Konietzko, G. Kauselmann, M. Krug, B. Schwanke, U. Frey and D. Kuhl (1995). "Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity." Proc Natl Acad Sci U S A 92(12): 5734-5738.
- Lopez de Armentia, M. and P. Sah (2003). "Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala." J Neurosci 23(17): 6876-6883.
- Martin, D. L., H. Liu, S. B. Martin and S. J. Wu (2000). "Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases." Neurochem Int 37(2-3): 111-119.
- McDonald, A. J., S. J. Shammah-Lagnado, C. Shi and M. Davis (1999). "Cortical afferents to the extended amygdala." Ann N Y Acad Sci 877: 309-338.
- McGaugh, J. L. (2000). "Memory--a century of consolidation." Science 287(5451): 248-251.
- Milekic, M. H. and C. M. Alberini (2002). "Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation." Neuron 36(3): 521-525.
- Milton, A. L., E. Merlo, P. Ratano, B. L. Gregory, J. K. Dumbreck and B. J. Everitt (2013). "Double dissociation of the requirement for GluN2B- and

- GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory." J Neurosci 33(3): 1109-1115.
- Milton, A. L., M. J. Schramm, J. R. Wawrzynski, F. Gore, F. Oikonomou-Mpegeti, N. Q. Wang, D. Samuel, D. Economidou and B. J. Everitt (2012). "Antagonism at NMDA receptors, but not beta-adrenergic receptors, disrupts the reconsolidation of pavlovian conditioned approach and instrumental transfer for ethanol-associated conditioned stimuli." Psychopharmacology (Berl) 219(3): 751-761.
 - Miyashita, T., S. Kubik, G. Lewandowski and J. F. Guzowski (2008). "Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation." Neurobiol Learn Mem 89(3): 269-284.
 - Morris, R. G., J. Inglis, J. A. Ainge, H. J. Olverman, J. Tulloch, Y. Dudai and P. A. Kelly (2006). "Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval." Neuron 50(3): 479-489.
 - Moscovitch, M., R. S. Rosenbaum, A. Gilboa, D. R. Addis, R. Westmacott, C. Grady, M. P. McAndrews, B. Levine, S. Black, G. Winocur and L. Nadel (2005). "Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory." J Anat 207(1): 35-66.
 - Nader, K. and O. Hardt (2009). "A single standard for memory: the case for reconsolidation." Nat Rev Neurosci 10(3): 224-234.
 - Nader, K., G. E. Schafe and J. E. Le Doux (2000). "Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval." Nature 406(6797): 722-726.
 - Nieuwenhuys, R. (2012). "The insular cortex: a review." Prog Brain Res 195: 123-163.
 - Paoletti, P. and J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Curr Opin Pharmacol 7(1): 39-47.
 - Paxinos, G. and Watson, C. (1998) "The rat brain in stereotaxic coordinates". Academic Press, San Diego, CA.
 - Plath, N., O. Ohana, B. Dammermann, M. L. Errington, D. Schmitz, C. Gross, X. Mao, A. Engelsberg, C. Mahlke, H. Welzl, U. Kobalz, A. Stawrakakis, E. Fernandez, R. Waltereit, A. Bick-Sander, E. Therstappen, S. F. Cooke, V. Blanquet, W. Wurst, B. Salmen, M. R. Bosl, H. P. Lipp, S. G. Grant, T. V. Bliss, D. P. Wolfer and D. Kuhl (2006). "Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories." Neuron 52(3): 437-444.
 - Ploski, J. E., V. J. Pierre, J. Smucny, K. Park, M. S. Monsey, K. A. Overeem and G. E. Schafe (2008). "The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala." J Neurosci 28(47): 12383-12395.
 - Purves, D; Augustine, George J; Pitzpatrick, David; Hall, William C; Lamantia, Anthony S; McNamara, James O; Williams, S. Mark (Eds.) (2003). Neuroscience. Sinauer Associates, Inc.; Sunderland, MA.

- Quirk, G. J. and D. Mueller (2008). "Neural mechanisms of extinction learning and retrieval." Neuropsychopharmacology 33(1): 56-72.
- Rainnie, D. G., E. K. Asprodini and P. Shinnick-Gallagher (1991). "Excitatory transmission in the basolateral amygdala." J Neurophysiol 66(3): 986-998.
- Rao, V. R. and S. Finkbeiner (2007). "NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks." Trends Neurosci 30(6): 284-291.
- Reilly, S. and M. A. Bornoalova (2005). "Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review." Neurosci Biobehav Rev 29(7): 1067-1088.
- Rodriguez-Ortiz, C. J. and F. Bermudez-Rattoni (2007). Memory Reconsolidation or Updating Consolidation? Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging. F. Bermudez-Rattoni. Boca Raton (FL).
- Rodriguez-Ortiz, C. J., V. De la Cruz, R. Gutierrez and F. Bermudez-Rattoni (2005). "Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained." Learn Mem 12(5): 533-537.
- Rosenblum, K., N. Meiri and Y. Dudai (1993). "Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex." Behav Neural Biol 59(1): 49-56.
- Sara, S. J. (2000). "Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering." Learn Mem 7(2): 73-84.
- Spray, K. J. and I. L. Bernstein (2004). "Afferent and efferent connections of the parvicellular subdivision of iNTS: defining a circuit involved in taste aversion learning." Behav Brain Res 154(1): 85-97.
- Strelakova, T., B. Zorner, C. Zacher, G. Sadovska, T. Herdegen and P. Gass (2003). "Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus." Genes Brain Behav 2(1): 3-10.
- Suzuki, T., J. Ishigooka, S. Watanabe and H. Miyaoka (2002). "Enhancement of delayed release of dopamine in the amygdala induced by conditioned fear stress in methamphetamine-sensitized rats." Eur J Pharmacol 435(1): 59-65.
- Tischmeyer, W. and R. Grimm (1999). "Activation of immediate early genes and memory formation." Cell Mol Life Sci 55(4): 564-574.
- Tronson, N. C. and J. R. Taylor (2007). "Molecular mechanisms of memory reconsolidation." Nat Rev Neurosci 8(4): 262-275.
- Tucci, S., P. Rada and L. Hernandez (1998). "Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion." Brain Res 813(1): 44-49.
- Tzien, J.Z. (2006). "Learning and Memory". En Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T. y Price, D.L. (Ed.) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7ma edición. Canadá: Academic Press.
- Vianna, M. R., G. Szapiro, J. L. McGaugh, J. H. Medina and I. Izquierdo (2001). "Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A 98(21): 12251-12254.

- Walker, D. L. and M. Davis (2002). "The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction." Pharmacol Biochem Behav 71(3): 379-392.
- Wright, C. I., A. V. Beijer and H. J. Groenewegen (1996). "Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized." J Neurosci 16(5): 1877-1893.
- Yamamoto, T. (2007). "Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats." Chem Senses 32(1): 105-109.
- Yamamoto, T. and Y. Fujimoto (1991). "Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat." Brain Res Bull 27(3-4): 403-406.
- Yamamoto, T., R. Matsuo, Y. Kiyomitsu and R. Kitamura (1989). "Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats." J Neurophysiol 61(6): 1244-1258.
- Yasoshima, Y., T. Morimoto and T. Yamamoto (2000). "Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats." Brain Res 869(1-2): 15-24.
- Yasoshima, Y., T. Shimura and T. Yamamoto (1995). "Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats." Neuroreport 6(17): 2424-2428.
- Yasoshima, Y. and T. Yamamoto (1997). "Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area." Neuroreport 8(6): 1363-1367.
- Yasoshima, Y., T. Yamamoto and K. Kobayashi (2005). "Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion." Chem Senses 30 Suppl 1: i158-159.
- Zimmerman, J. M. and S. Maren (2010). "NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats." Eur J Neurosci 31(9): 1664-1670.