



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNAM,
CAMPUS JURQUILLA QUERÉTARO**

Interacción glutamatérgica y noradrenérgica entre el núcleo del tracto solitario y la amígdala basolateral durante la formación de la memoria de aversión al sabor

Tesis

Para optar por el grado de:

Doctora en Ciencias Biomédicas

Presenta:

M en C. Nadia Edith García Medina

Directora de Tesis:

Dra. María Isabel Miranda Saucedo
Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla

Comité tutorial:

Dra. Carolina Escobar Briones
Facultad de Medicina, UNAM

Dra. María Magdalena Giordano Noyola
Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla

México a Octubre de 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México Campus Juriquilla, por otorgarme el privilegio de realizar este proyecto doctoral dentro de sus instalaciones.

A la beca 169088, apoyos 54524 y 152208, otorgados por CONACyT.

Al apoyo técnico de M en C. Ángela Gabriela Vera Rivera, Biol. Alejandro Rángel Hernández y Biol. Gerardo A. Soto Alonso.

A la Dra. Dorothy Pless y Shaun Harris por la asesoría y revisión en las secciones en inglés.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE	II
ABREVIATURAS	IX
ESTRUCTURA DE LA TESIS	1
CAPÍTULO 1	2
INTRODUCCIÓN	2
1.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	2
1.2 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN DURANTE LA MEMORIA GUSTATIVA: GLUTAMATO Y NORADRENALINA.....	4
1.2.1 NORADRENALINA	5
1.2.2 RECEPTORES NORADRENÉRGICOS	5
1.2.3 LOCALIZACIÓN DE NORADRENALINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	7
1.2.4 GLUTAMATO	8
1.2.5 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	9
1.2.6 LOCALIZACIÓN DEL GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	11
1.3 CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN A LOS SABORES	12
1.4 VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GUSTATIVA	16
1.5 VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISCERAL	17
1.6 ESTRUCTURAS DE LA INTEGRACIÓN VISCERAL Y GUSTATIVA	18
1.7 NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO.....	18
1.7.1 PARTICIPACIÓN DEL NTS EN LA INTEGRACIÓN VISCERAL Y GUSTATIVA	18
1.7.2 EL NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR	21
1.8 LA AMÍGDALA	22
1.8.1 PARTICIPACIÓN DE LA AMÍGDALA EN LA INTEGRACIÓN VISCERAL Y GUSTATIVA DURANTE EL CAS	23
CAPÍTULO 2	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27

2.1 HIPÓTESIS.....	30
2.2 OBJETIVOS.....	30
2.3 ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES.....	31
CAPÍTULO 3	32
METODOLOGÍA.....	32
3.1 SUJETOS EXPERIMENTALES	32
3.2 CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR.....	32
3.3 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	32
3.4 ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS	33
3.5 MICRODIÁLISIS EN ANIMAL ANESTESIADO	33
3.6 MICRODIÁLISIS EN LIBRE MOVIMIENTO	34
3.7 HISTOLOGÍA.....	35
3.8 ANÁLISIS DE LA NORADRENALINA POR HPLC	36
3.9 ANÁLISIS DE GLUTAMATO POR HPLC	36
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
CAPÍTULO 4	38
RESULTADOS.....	38
4.1 VERIFICACIÓN DE LA COLOCACIÓN DE INYECTORES Y SONDA DE MICRODIÁLISIS.....	38
4.2 LIBERACIÓN DE LA NORADRENALINA EN ANIMAL ANESTESIADO.....	38
4.3 LA ADMINISTRACIÓN DE ALTO POTASIO O GLUTAMATO EN EL NTS INMEDIATAMENTE DESPUÉS DEL ESTÍMULO VISCERAL MEJORA LA ADQUISICIÓN DEL CAS.....	40
4.4 LIBERACIÓN DE NORADRENALINA EN LA BLA POR DESPOLARIZACIÓN DEL NTS DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS.....	42
4.5 LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA BLA POR DESPOLARIZACIÓN DEL NTS DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS.....	43
CAPÍTULO 5	45
DISCUSIÓN.....	45
5.1 MICRODIÁLISIS EN ANIMAL ANESTESIADO	45
5.2 FARMACOLOGÍA y MICRODIÁLISIS EN ANIMALES EN LIBRE MOVIMIENTO	46
5.3 CONCLUSIONES GENERALES.....	49

REFERENCIAS	51
ANEXO 1	61
ANEXO 2	66

RESUMEN

El condicionamiento de aversión al sabor (CAS), es un paradigma de aprendizaje asociativo, donde un sabor es asociado con señales viscerales de intoxicación, y que en una subsecuente presentación, evita su consumo. En términos evolutivos, el CAS protege a los organismos contra la ingestión de alimentos tóxicos. El CAS, se establece por la interacción en la actividad de estructuras neuroanatómicas tales como el tronco encefálico, el sistema límbico y la neocorteza. La respuesta sensorial inducida por el sabor y la estimulación visceral tras el consumo, activan al núcleo del tracto solitario (NTS), el cual es el primer relevo en el sistema nervioso central y tiene una función vital en la recepción de los estímulos químicos y señales periféricas relacionadas con la estimulación vagal. Además, se ha demostrado que la estimulación visceral, como la inducción de malestar gástrico por inyección i.p. de cloruro de litio (LiCl), induce incremento en la liberación de glutamato en la amígdala basolateral (BLA) y la corteza insular. En este sentido, varios estudios han demostrado que el NTS y la BLA están funcionalmente conectados. Asimismo, las evidencias muestran que la activación de la amígdala con glutamato, al menos en parte, puede transmitir la información visceral durante el CAS, y sugiere que la liberación de glutamato en la amígdala puede ser modulada por el NTS.

La presente tesis doctoral tuvo como objetivo el estudio de la participación del NTS como un componente crucial en la modulación

neuroquímica de la BLA a los sabores y el procesamiento de los estímulos viscerales, a consecuencia del consumo. Los datos demostraron que la estimulación del NTS, por despolarización artificial junto con el estímulo de baja intensidad visceral, induce la liberación de glutamato y noradrenalina en la BLA, y en consecuencia mejora la memoria de aversión al sabor. Así mismo, los resultados demuestran que la actividad del NTS modula la intensidad de las señales viscerales a través de la actividad noradrenérgica y glutamatérgica en la BLA, durante la adquisición/consolidación de la memoria de aversión al sabor.

ABSTRACT

Conditioned taste aversion (CTA) is a learning paradigm that pairs visceral signals of poisoning with a particular taste, which animals avoid consuming when next exposed to it. In evolutionary terms, CTA protects organisms against toxic food intake. CTA is established by the interaction of brainstem, limbic, and neocortical structures. The taste and visceral pathways reach the nucleus of the solitary tract (NTS), which is the first relay in the central nervous system and has a vital function in receiving chemical stimuli and peripheral signals related to vagal stimulation. In addition, it has been demonstrated that visceral stimulation, like malaise induction by i.p. LiCl injection, reliably induces glutamate increases within the basolateral amygdala (BLA) and the insular cortex. In this regard, several studies have demonstrated that the NTS and the BLA are functionally connected. Evidence also shows that glutamate activation of the amygdala can convey visceral information during CTA, and suggests that the NTS can modulate glutamate release in the amygdala.

The present study examined whether NTS stimulation, by artificial depolarization during low intensity visceral stimulus, would induce the release of glutamate and norepinephrine in the BLA, thereby strengthening taste aversion memory formation. The results showed that high potassium NTS stimulation paired with low visceral stimulation induced the release of glutamate and norepinephrine and increased taste aversion memory formation. These results indicate that

NTS activity modulates the intensity of visceral signals, through noradrenergic and glutamatergic activity in the BLA, during acquisition/consolidation of taste aversion memory.

ABREVIATURAS

ACB, núcleo accumbens

Ach, acetilcolina

AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-5 metil-4-isoxazol-propionato

AN, atenuación a la neofobia

AP, área postrema

BLA, amígdala basolateral

BO, bulbo olfatorio

CAS, condicionamiento de aversión al sabor

CeA, amígdala central

CI, corteza insular

CPu, caudado-putamen

CS, colículo superior

CTA, Conditioned taste aversion

EAAT, transportador de aminoácidos excitatorios

EC, estímulo condicionado

EI, estímulo incondicionado

GABA, ácido gama aminobutírico

Glu, glutamato

HI, hipocampo

IC, insular cortex

KA, kainato o ácido kaínico

LC, locus coeruleus

LiCl, cloruro de litio

MAO, monoamino oxidasa

MCP, memoria a corto plazo

mGluR, receptores metabotrópicos de glutamato

MLP, memoria a largo plazo

NA, noradrenalina
NAcc, núcleo accumbens
NBM, núcleo basal magnocelular
NMDA, N-metil- D-aspartato
NPB, núcleo parabraquial
NPBdl, núcleo parabraquial región dorsolateral
NPY, neuropéptido Y
NR, núcleo rojo
NTS, núcleo del tracto solitario
NTSc, núcleo del tracto solitario región caudal
NTSr, núcleo del tracto solitario región rostral
OB, oliva bulbar
P, protuberancia
PEPS, potenciales excitatorios postsinápticos
PIR, corteza piriforme
SL, septum lateral
SNC, sistema nervioso central
SNP, sistema nervioso periférico
SNR, sustancia nigra
TTX, tetrodotoxina
VGLUT, vesículas sinápticas transportadora de glutamato
VPM, núcleo ventral posteromedial del tálamo

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis comprende dos secciones experimentales, que se describen a continuación:

Sección 1. Evaluación en animales anestesiados, los cambios en la actividad noradrenérgica de la BLA, ante una despolarización con alto potasio del NTS.

Esta sección está dedicada a cuantificar, en la amígdala de animales anestesiados, la liberación de noradrenalina cuando simultáneamente el núcleo del tracto solitario se activa por medio de despolarización química. El método, los resultados y la discusión, están incluidos en el artículo "*Nucleus of solitary tract chemical stimulation induces extracellular norepinephrine release in the lateral and basolateral amígdala*" publicado en *Brain Stimulation*, 2013 Marzo; 6(2): 198-201. Doi: 10.1016/j.brs.2012.03.020. Epub 2012 Apr 19.

Sección 2. Evaluar los efectos en la formación de la memoria aversiva en animales en libre movimiento, de la estimulación despolarizante del NTS durante la estimulación visceral de baja intensidad; determinando a su vez la actividad noradrenérgica y glutamatérgica en la BLA.

Esta sección presenta resultados en un manuscrito enviado a publicación, donde se describe la participación del núcleo del tracto solitario para regular la intensidad del estímulo visceral durante la formación de la memoria aversiva, a través de los protocolos farmacológicos y de microdiálisis en animal en libre movimiento. En el se evaluaron, simultáneamente, el desarrollo de la memoria aversiva y los cambios en la liberación de noradrenalina y glutamato en la BLA.

Finalmente, se presenta una discusión general donde se integran los resultados obtenidos en ambas secciones.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA

Actualmente no existe una definición universalmente aceptada de aprendizaje y memoria, ya que las diferentes definiciones tienen su origen en diferentes campos de estudio (Vanderwolf and Cain, 1994, Sweatt, 2003). Sin embargo, Dudai, nos presenta tres definiciones de aprendizaje (Dudai, 2002b).

- I. El acto o proceso de inducción de una modificación duradera en el comportamiento y/o su potencial, debido a la experiencia conductual del individuo.
- II. La adquisición de información o la reorganización de la información que resulta en un nuevo conocimiento.
- III. La generación de representaciones internas duraderas dependientes de la experiencia, o modificaciones posteriores de dichas representaciones.

En la primera definición de aprendizaje, subraya el componente conductual (Bower, 1981, Dudai, 2002a), en donde el término “experiencia conductual” se refiere a una serie de eventos sensoriales, motores, emocionales y cognitivos que suceden a lo largo de la vida del sujeto. El término comportamiento es útil para fines de eliminar la necesidad de especificar que no es debido a un proceso patológico, efecto farmacológico, o de maduración. Las segunda y tercera definición, son variantes de definición tipo informacional, refiriéndose a la ejecución de la conducta y la capacidad de comportamiento en términos de conocimiento (Squire, 1987, Dudai, 2002b). A su vez, la tercera definición expresa el aprendizaje en términos de representaciones internas, que están codificadas neuronalmente por modelos estructurales del mundo, los cuales pueden potencialmente guiar el comportamiento (Dudai, 1989, 2002a).

La memoria es un fenómeno complejo y dinámico que consiste en el proceso mediante el cual el conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado (Squire, 2000). Dicho conocimiento puede ser definido

como la facultad de percibir, conocer, comprender e imaginar los eventos que suceden en el mundo. La memoria engloba tres procesos que son:

Adquisición (aprendizaje). Fase inicial donde los organismos están expuestos a cambios del medio físico que constituyen los estímulos a ser asociados y posteriormente almacenados.

Consolidación. Durante esta fase existe la activación de mecanismos que permiten una cierta permanencia de la experiencia concreta recién percibida. Paso de memoria de corto plazo a memoria de largo plazo, para esta última se requiere síntesis de proteínas.

Evocación (memoria). Se define como la expresión de conductas determinadas por experiencias de aprendizajes anteriores. La información es recuperada, y se observa como un cambio en la conducta (Baddeley, 1999).

La información es representada internamente en forma de patrones de actividad en diversas áreas del sistema nervioso. Estas representaciones internas que permiten que las memorias sean formadas, almacenadas y evocadas en el sistema nervioso central en el idioma inglés se les conoce como *memory trace* y se le traduce en español como trazo de memoria (Thompson, 2005). El trazo de memoria según su duración y estabilidad relativa se le ha llamado memoria de corto plazo (MCP) o de largo plazo (MLP). Los trazos de memoria, conocidos también como engramas, significan un cambio persistente en el cerebro que es formado en respuesta a un estímulo o a la asociación de dos o más estímulos, y es el sustrato neuronal para la formación de la memoria. Se ha propuesto que el tipo de trazo de memoria determina la manera en que la información se codifica, almacena y evoca. Con lo descrito anteriormente, es claro que para tener memoria es necesario adquirirla a través del aprendizaje, la etapa inicial donde se perciben, procesan y relacionan los diferentes estímulos que conforman la experiencia. Adicionalmente, la farmacología de la memoria ha logrado identificar una multiplicidad de mensajeros químicos dentro de las vías neuronales de los sistemas involucrados en la formación de la memoria y, en algunos casos, el papel que juegan en la función sináptica e integración neuronal (Iversen, 1998). En todos los modelos y sistemas estudiados, sean animales invertebrados o en vertebrados

superiores, se ha comprobado la importancia funcional de la comunicación química durante los procesos de aprendizaje, así como la participación de determinados neurotransmisores que contribuyen a la plasticidad neuronal esencial para el almacenaje de información.

De tal forma, la información generada sobre la probable ubicación de la memoria en el sistema nervioso central (SNC) sugiere que ciertas áreas del cerebro podrían participar específicamente en alguna de las etapas de la formación de la memoria de una conducta particular; sin embargo, otras fases del aprendizaje podrían desarrollarse en regiones cerebrales comunes que han sido implicadas en diferentes conductas. Por lo tanto, la memoria podría residir en las regiones del cerebro que tienen que ver con la modalidad y la información específica de los estímulos que lo conforman (Georgopoulos et al., 1988), así como en las estructuras cerebrales que procesan y codifican variadas asociaciones de las modalidades sensoriales (Hirsh, 1974) y por ende, estas estructuras podrían considerarse componentes básicos de los sistemas de memoria (Dudai, 1989).

1.2 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN DURANTE LA MEMORIA

GUSTATIVA: GLUTAMATO Y NORADRENALINA

Las neuronas en el cerebro se comunican unas con otras mediante la liberación de mensajeros químicos llamados neurotransmisores. Varios de estos neurotransmisores desempeñan un papel en el procesamiento del aprendizaje y la memoria, de los cuales cuatro son los más conocidos y estudiados de manera detallada: acetilcolina (ACh), ácido gama aminobutírico (GABA), glutamato (Glu) y noradrenalina (NA).

A continuación se describen las características generales, los receptores y la localización en el SNC de los neurotransmisores con los que se trabajó en esta tesis doctoral, y posteriormente se integra su participación en el condicionamiento de aversión al sabor (CAS).

1.2.1 NORADRENALINA

Las catecolaminas constituyen una familia de neurotransmisores (dopamina, adrenalina y NA) que derivan de una molécula común llamada tirosina, por lo que comparten una estructura química casi idéntica que consiste en un anillo de benceno con dos grupos hidroxilos adyacentes y una cadena de etilamina. En la historia de la medicina, Otto Loewi presentó evidencias de una sustancia llamada “*accelerence*”; en 1936 esta sustancia fue identificada como NA (sinónimo de norepinefrina), por tal acontecimiento recibió el premio Nobel de Medicina. Desde que la NA se conoce como precursor de la adrenalina, se pensó que la NA es un sustrato intermedio en la síntesis de adrenalina. En 1940 había suficiente evidencia de que la NA no era un mero producto intermedio, sino que jugaba el papel de neurotransmisor. En contraste con la adrenalina, la cual se restringe principalmente al sistema nervioso periférico (SNP) y a algunas regiones del tallo cerebral, la NA es un neurotransmisor prioritario del SNC (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

En las neuronas noradrenérgicas, la dopamina es convertida en NA por una enzima llamada dopamina- β -hidroxilasa. Esta enzima está presente abundantemente en neuronas noradrenérgicas y células cromafines (Von Bohlen and Dermietzel, 2002). La NA, al igual que otras catecolaminas, es metabolizada en el citoplasma por el catecol-O-metil-transferasa, o bien a nivel intramitocondrial por la monoaminoxidasa (MAO). La MAO convierte a la NA en ácido 3,4-hidroxi mandélico. Desde que la MAO fue involucrada en la degradación de NA, los inhibidores de la MAO se han utilizado para elevar los niveles neuronales de NA (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

1.2.2 RECEPTORES NORADRENÉRGICOS

Cuando la NA es liberada de las terminaciones nerviosas, interactúa con receptores específicos, los cuales son denominados colectivamente como adrenoreceptores. Los adrenoreceptores se encuentran en la membrana plasmática de las neuronas del SNC y SNP, también se encuentran en glándulas periféricas y células musculares llamadas células efectoras. Los efectos

generados por la NA dependen del tipo de receptor; actualmente se han descrito dos tipos de receptores, el tipo alfa y los beta adrenérgicos. Estos dos tipos de receptores metabotrópicos tienen en común su acoplamiento a proteínas G y muestran una topología de siete dominios transmembranales. Cada tipo de receptor puede ser dividido a su vez en distintos subtipos (Von Bohlen and Dermietzel, 2002). En la Figura 1, se muestran las principales características de los receptores adrenérgicos.

Subfamilia	Acoplamiento a proteínas G	Segundo mensajero	Agonistas selectivos	Antagonistas selectivos	Subtipos
$\alpha 1$	Gq	Ca ++	Fenilefrina Metoxamina	Prazosin WB4101	$\alpha 1$ -A $\alpha 1$ -B $\alpha 1$ -D
$\alpha 2$	Gi	AMPc	Clonidina Dexmedetomidina	Rauwolscina Yombina	$\alpha 2$ A $\alpha 2$ B $\alpha 2$ C
β	Gs	AMPc	Isoproterenol Terbutalina	Propranolol Metoprolol	$\beta 1$ $\beta 2$

Figura 1. Tabla con las características de los receptores adrenérgicos (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

Los adrenoceptores en el SNC son activados por NA o por agonistas específicos y la señal de transducción involucra la estimulación de proteínas G. La secuencia de los siete dominios transmembranales se encuentra altamente conservada entre las tres subfamilias de receptores. Hay disminución de la sensibilidad de los adrenoceptores ante la presencia continua de un ligando, lo cual provoca una disminución en la respuesta del agonista a lo largo del tiempo. Los mecanismos involucrados en la disminución de la sensibilidad incluyen una pérdida de acoplamiento de la proteína G y la remoción de receptores desde el plasma (llamado también internalización); este mecanismo detiene los efectos inducidos por el ligando y permite el reciclaje del receptor (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

La distribución de los diferentes subtipos de adrenoceptores no es homogénea en el cerebro y cada subtipo de receptor revela una localización característica. Por ejemplo, en la corteza cerebral los adrenoceptores del tipo alfa y beta están distribuidos de manera diferente entre las capas de la corteza. Estas diferencias topográficas en la distribución de los receptores puede ser un

factor para la variabilidad local de las respuestas noradrenérgicas en la corteza cerebral (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

1.2.3 LOCALIZACIÓN DE NORADRENALINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las células noradrenérgicas se concentran en el *locus coeruleus* (LC) y núcleo subcoeruleus (grupos A5, A6 y A7), así como algunas áreas de la formación reticular (grupo A1 y C1) y en el NTS (grupo A2 y C2) (Figura 2) (Von Bohlen and Dermietzel, 2002). El LC es la fuente de las proyecciones noradrenérgicas, innervando la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el septum, el tálamo, el hipotálamo y la médula espinal. Los núcleos relativamente pequeños constituyen la principal fuente de proyecciones noradrenérgicas en el SNC; sin embargo, estas neuronas presentan abundantes colaterales, con divergencia en varias áreas subcorticales. Algunas de las proyecciones del LC emergen bilateralmente. Aunque estas divergencias del LC son una característica dominante del sistema noradrenérgico, la organización topológica está obviamente relacionada con la organización interna de este núcleo. La parte medial del LC proyecta a la corteza, mientras que las neuronas que proyectan al hipocampo, se encuentran en las porciones más posteriores del LC (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

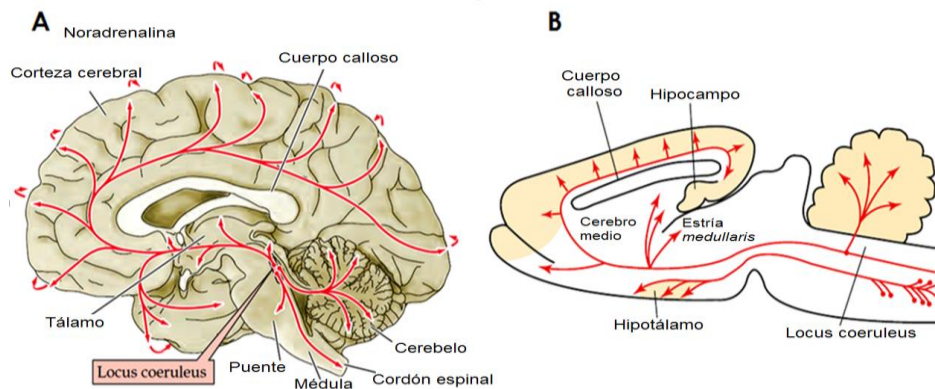


Figura 2. Vías noradrenérgicas. A) Distribución de las neuronas noradrenérgicas en cerebro humano. Las flechas curvadas a lo largo del perímetro de la corteza cerebral indican la innervación de las regiones corticales laterales que no pueden observarse en el corte sagital (imagen de Purves y col, 2004). B) Distribución de las vías noradrenérgicas en un cerebro de rata (Modificada de Siegel, 2006)

Las neuronas noradrenérgicas de las áreas A1 y A2 se combinan hasta cierto punto con neuronas de los grupos C1 y C2 (que son adrenérgicas) y sus puntos de terminación parecen estar localmente relacionados. Se ha encontrado que las proyecciones de estas áreas terminan en el tracto intermedio-lateral de la médula espinal y en algunos núcleos hipotalámicos. Algunas proyecciones de los grupos neuronales A1 y A2 terminan en la amígdala y el tálamo. Algunas neuronas noradrenérgicas co-expresan neuromoduladores; por ejemplo en la rata, la co-localización de NA y neuropéptido Y (NPY) ha sido detectada en la mayoría de las neuronas noradrenérgicas de la formación reticular, de forma similar cerca del 20% de las neuronas del LC co-expresan NPY y NA. De la misma forma, aproximadamente el 70% de las neuronas del LC co-expresan NA con galanina (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

1.2.4 GLUTAMATO

El glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitatorio más abundante del encéfalo. Casi todas las neuronas excitatorias del SNC son glutamatérgicas y se estima que más del 50% de todas las sinapsis del encéfalo liberan este neurotransmisor. El Glu desempeña un papel fundamental en la neurología clínica dado que las concentraciones elevadas de Glu extracelular, liberadas como resultado de la lesión nerviosa, son tóxicas para las neuronas, lo que se conoce como excitotoxicidad y se refiere, a la capacidad del Glu y de compuestos afines, para destruir neuronas a través de la transmisión sináptica prolongada.

Además, el Glu es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, debe ser sintetizado por las neuronas a partir de precursores locales. El precursor para la síntesis de Glu es un aminoácido llamado glutamina que es liberado por las células gliales. Una vez liberada la glutamina es captada en las terminaciones presinápticas y metabolizada a glutamato por la enzima mitocondrial glutaminasa. El Glu también puede ser sintetizado por transaminación de α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La glucosa que metaboliza las neuronas también puede ser utilizada para la síntesis de Glu (Feduchi et al., 2010).

El Glu sintetizado en el citoplasma presináptico es empaquetado en vesículas sinápticas por transportadores, denominados VGLUT. Una vez liberado, el Glu es eliminado del espacio sináptico por los transportadores de aminoácidos excitadores EATT (por sus siglas en inglés “excitatory amino acid transporter”). Existen cinco tipos diferentes de transportadores de Glu de alta afinidad, algunos están presentes en las células gliales y otros en las terminaciones presinápticas. El Glu captado por las células gliales es convertido en glutamina por la enzima glutamina sintetasa; la glutamina es transportada fuera de las células gliales y hacia el interior de las terminaciones nerviosas. De esta forma, las terminaciones sinápticas cooperan con las células gliales para mantener un aporte adecuado de Glu. Todos estos eventos son conocidos como el ciclo del glutamato-glutamina (Purves et al., 2004) (Figura 3).

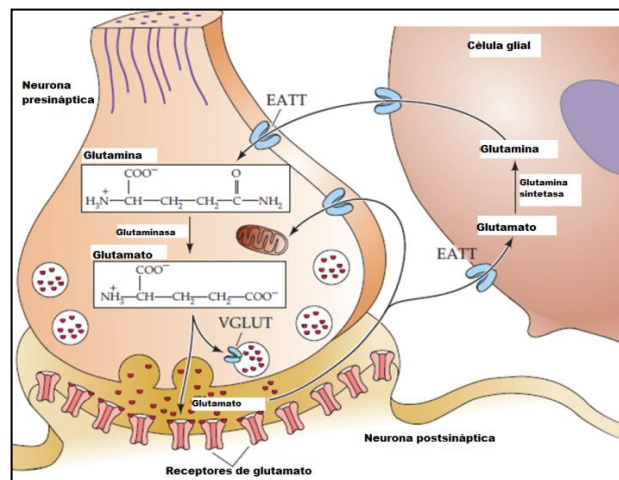


Figura 3. Síntesis y reciclado del glutamato entre neuronas y glía (Purves Dale, 2004).

1.2.5 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Se han identificado varios tipos de receptores de Glu. Tres de ellos son receptores ionotrópicos llamados respectivamente, receptores de NMDA, receptores de AMPA y receptores de kainato. Sus nombres derivan de los agonistas que los activan: NMDA (N-metil- D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5 metil-4-isoxazol-propionato) y ácido kaínico (KA). Todos los receptores de Glu ionotrópicos son canales catiónicos no selectivos, que permiten el paso de sodio y

potasio, y en algunos casos pequeñas cantidades de calcio. Por lo tanto, la activación de los receptores AMPA, NMDA y KA siempre producen respuestas posinápticas excitadoras (Siegel et al., 2006).

Los receptores NMDA tienen propiedades especiales, ya que sus canales iónicos permiten la entrada de calcio además de sodio y potasio. En consecuencia los potenciales excitatorios producidos por los receptores NMDA pueden aumentar la concentración de calcio en el interior de la neurona posináptica activando cascadas de señalización. Otra propiedad es que el magnesio extracelular bloquea el poro del canal del receptor NMDA. Algunas sinapsis glutamatergicas tienen solo receptores tipo AMPA o NMDA, pero la mayoría posee ambos tipos de receptores. Con todo ello, ha sido aceptada la idea de que estas propiedades especiales del receptor NMDA, constituye la base para algunas formas de almacenamiento de la información en las sinapsis que participan en procesos de memoria.

Además, el Glu tiene receptores metabotrópicos (mGluR) con varias subfamilias. La activación de muchos mGluR conduce a la inhibición de los canales de calcio y de sodio posinápticos. Los mGluR producen respuestas postsinápticas más lentas que pueden aumentar o disminuir la excitabilidad de las células postsinápticas. En consecuencia, el papel fisiológico de los mGluR es muy variado (Figura 4). La mayoría de la atención ha sido enfocada en el papel que realiza el receptor NMDA de Glu, ya que su activación produce una lenta y prolongada despolarización neuronal.

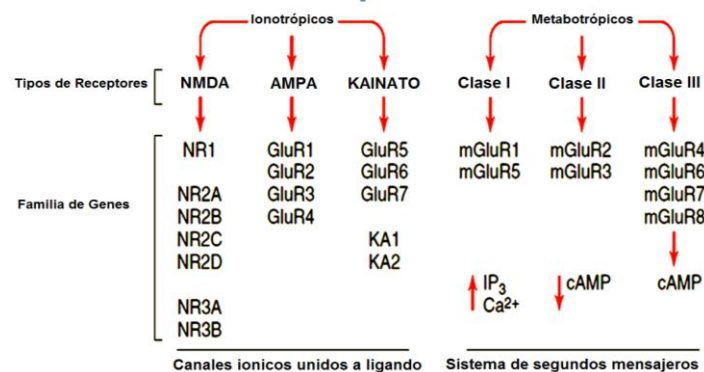


Figura 4. Familia de los receptores de glutamato. De los dos tipos de receptores a glutamato existen tres diferentes clases de receptores, que tienen una variabilidad individual de subunidades que codifica para diferentes genes (Modificado de Siegel, 2006).

1.2.6 LOCALIZACIÓN DEL GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El Glu tiene efectos excitatorios muy potentes, casi todas las neuronas excitatorias del SNC y quizás tal vez, la mitad de las sinapsis en el cerebro se comunican por medio de Glu, aunque las neuronas glutamatérgicas predominan en la corteza cerebral y de allí proyectan a una gran variedad de estructuras subcorticales, tales como el hipocampo, la BLA, sustancia nigra, núcleo accumbens, colículo superior, caudado, núcleo rojo y protuberancia (Figura 5). Además, el Glu es el principal mediador de la información sensorial, de coordinación motora, emociones y cognición, incluyendo la formación de memoria y en la recuperación de la misma.

No se puede definir de manera precisa la ubicación de Glu, pues el 90% de las neuronas del cerebro usan este neurotransmisor para comunicarse, y aproximadamente el 80-90% de estas sinapsis son glutamatérgicas (Braitenberg and Schuz, 1998).

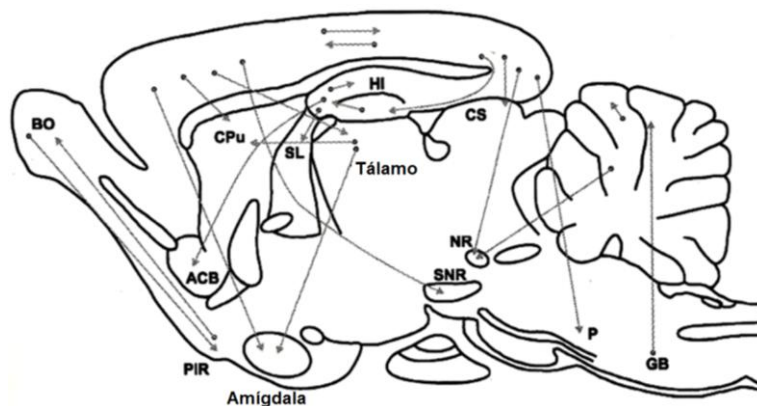


Figura 5. Representación esquemática de las vías glutamatérgicas en el SNC del cerebro de rata. Núcleo accumbens (ACB), bulbo olfatorio (BO), caudado-putamen (CPu), colículo superior (CS), hipocampo (HI), núcleo rojo (NR), oliva (OB), protuberancia (P), corteza piriforme (PIR), septum lateral (SL), sustancia nigra (SNR) (Modificado de (Von Bohlen and Dermietzel, 2002).

1.3 CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN A LOS SABORES

La sobrevivencia de los organismos depende de su capacidad para mantener la homeostasis del ambiente interno a pesar de condiciones continuamente cambiantes del mundo externo (Bures et al., 1998). Para mantener la composición y balance de energía del organismo dentro de los límites necesarios para las funciones vitales, existen procesos que sostienen el equilibrio de sustancias y energías existentes en la interfase organismo-ambiente. La importancia vital de estos procesos condujo al desarrollo de mecanismos de control altamente sofisticados los cuales favorecen diversas formas de comportamiento de alimentación, como lo son el reconocimiento de las necesidades corporales, identificación de sustancias disponibles para la ingestión satisfaciendo una necesidad y procesos de regulación para que la ingesta sea directamente proporcional a la intensidad de la necesidad (Bures et al., 1998). Las presiones evolutivas han influido en el comportamiento de alimentación del mismo modo, la anatomía y la fisiología de los animales han proporcionado estas funciones vitales con firmes mecanismos neurales y humorales, formando la base de la motivación, el aprendizaje y la memoria indispensables para la identificación de productos comestibles, que satisfacen sus diferentes necesidades. Un rasgo característico de las asociaciones de este tipo es los formados entre estados viscerales (señales aferentes viscerales) y estímulos externos (mediante aferencias gustativas, olfativas, visuales y somatosensoriales). Esto resulta en discriminaciones básicas entre productos comestibles y no comestibles, y la asociación con valores nutricionales o con sus posibles efectos tóxicos (Bures et al., 1998).

El CAS, se considera un aprendizaje asociativo (García et al., 1955, Prado-Alcala, 2001, Fresquet et al., 2003, Sweatt, 2003). Fue descrito en la década de los sesenta por John García, quién describió este fenómeno por primera vez, cuando se encontraba trabajando sobre los efectos de la radiación en animales. García observó que los animales que eran radiados después de comer o beber alimentos o líquidos con algún sabor distintivo y/o relevante, presentaban posteriormente un rechazo a cualquier alimento o bebida que tuviera un sabor

semejante (Garcia et al., 1955). Los factores que hacen del CAS un aprendizaje asociativo son la presencia de un estímulo condicionado (EC; sabor), al cual sigue la presentación de un estímulo incondicionado (EI; ej. rayos X, cloruro de litio), que provoca una respuesta visceral semejante a un malestar gastrointestinal. Esto resulta en el rechazo a dicho alimento o líquido con ese sabor particular (Garcia et al., 1955). Por lo tanto, los sabores pueden ser clasificados como seguros (sin consecuencias dañinas) o aversivos, dicha información se almacena y da lugar a lo que se conoce como memoria del gusto. Existen modelos experimentales que nos permiten estudiar el aprendizaje de lo “seguro”, o “sin consecuencias dañinas” con tareas como la atenuación de la neofobia (AN) y el aprendizaje a lo aversivo con el CAS, respectivamente.

Particularmente, el CAS difiere de otros paradigmas de aprendizaje asociativo en el parámetro de intervalo inter-estímulo, que es definido como el intervalo de tiempo entre el EC y el EI (Dudai, 2002a). En general, para el aprendizaje de tipo asociativo, el intervalo de tiempo entre los EC y EI es de apenas unos segundos (McGaugh and 1969, Dudai, 2002a). Mientras que en el caso del CAS, el intervalo inter-estímulo puede ser de minutos hasta horas, tiempo en el cual se logra una adecuada asociación entre ambos estímulos. Sin embargo, cuando el intervalo inter-estímulo es de menor duración (ej. 10 seg) la asociación no es efectiva (Figura 6) (Schafe et al., 1995, Dudai, 2002a).

Este tipo de condicionamiento es un modelo experimental sencillo para estudiar los diferentes estadios de la formación de la memoria. El CAS se realiza en dos fases; la adquisición, en la cual después de un período de privación de agua al animal se le da a beber un sabor novedoso (ej. sacarina), dejando un intervalo de tiempo (30 min), se procede a provocar el malestar digestivo con un agente irritante generalmente cloruro de litio (LiCl) vía intraperitoneal (i.p.). La segunda fase es el día de prueba de la evocación de la memoria aversiva, ésta puede realizarse de 8 a 24 h después de haber efectuado la asociación sabor novedoso-malestar gástrico (adquisición). Durante la prueba al animal se le presenta nuevamente el sabor asociado previamente con el malestar.

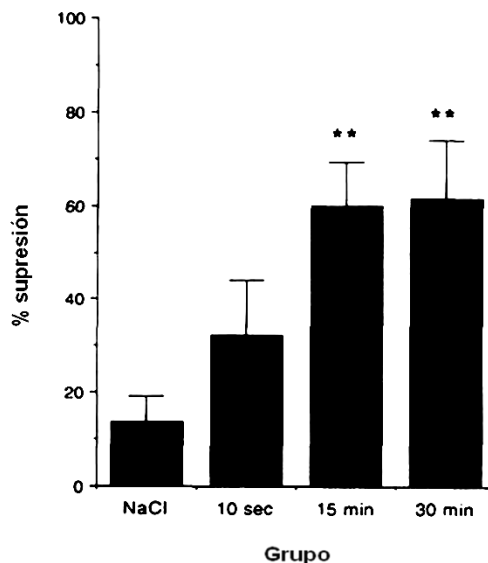


Figura 6. Relación entre el intervalo inter-estímulo y porcentaje de aversión del CAS. Porcentajes de supresión los cuales expresan diferencias entre el consumo de sacarina el día de prueba y el consumo basal de agua. Los grupos experimentales se condicionaron con intervalos inter-estímulos de 10 segundos, 15 minutos o 30 minutos. El EC fue sacarina 0.15% y el EI fue 7.5 mg/Kg de hidrocloreto de apomorfina i.p. El grupo control recibió NaCl 0.9% i.p. **p < .01 en relación al grupo control (Modificado de (Schafe et al., 1995, Dudai, 2002a).

En la investigación de fenómenos y mecanismos implicados en el aprendizaje, el modelo del CAS ofrece ventajas, ya que requiere de un único ensayo lo cual facilita la correlación entre los eventos neuronales con la formación de la memoria. Por otra parte, el modelo del CAS es fácilmente reproducible y resulta en la formación de una memoria a largo plazo, además debido a que requiere un intervalo inter-estímulo de larga duración, es posible distinguir entre la fase de adquisición del EC y la fase de asociación entre el EC y el EI (Dudai, 2002a).

La formación de la memoria de gustativa depende de las interacciones de estructuras del tallo cerebral, límbicas y corticales (Bermudez-Rattoni et al., 1986, Yamamoto et al., 1994, Bures et al., 1998). Esta interacción se esquematiza en la Figura 7, donde se evidencia una de las ventajas metodológicas de la memoria gustativa como modelo de estudio: la descripción de la participación de varias estructuras en la formación de esta memoria.

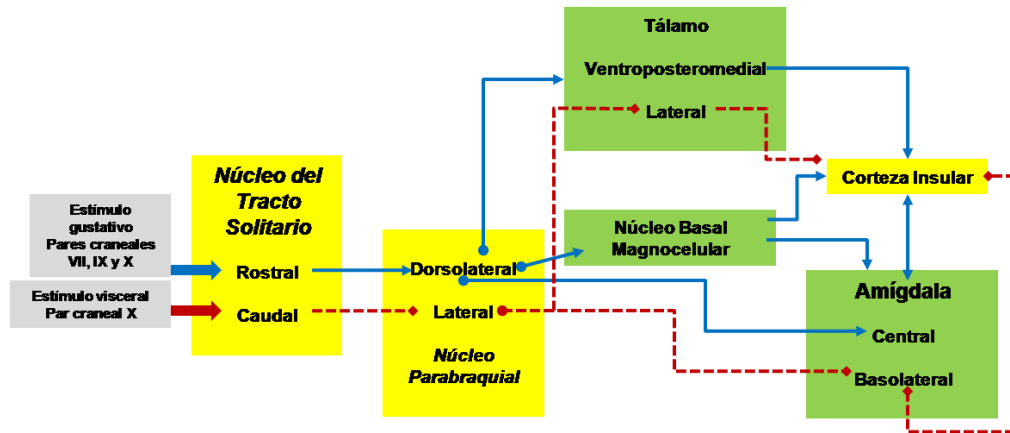


Figura 7. Vías de procesamiento de la información gustativa (línea continua-azul) y visceral (línea punteada-roja). Nervios facial, glossofaríngeo y vago (VII, IX y X respectivamente) (Modificado de Bermudez-Rattoni, 2004).

Otra de las ventajas que tiene el paradigma del CAS, es que permite conocer el tiempo que tarda el sujeto experimental en mantener la asociación aversiva ya establecida pero que, en ausencia del EI, tiende a disminuir; a este proceso se le conoce como extinción y se define como la exposición de un estímulo condicionado, sin el apareamiento con el EI, que conduce a una disminución progresiva de la respuesta condicionada (Rosas and Bouton, 1996). Actualmente se cree que este fenómeno no refleja un olvido de la memoria original (la asociación EC-EI que ocurre durante la adquisición del CAS), sino que refleja un nuevo aprendizaje (Rescorla, 1996). El sujeto aprende otra asociación durante la extinción; es decir, la relación entre la presencia del EC (sacarina), y la ausencia del EI (LiCl). Esto último significa que los sujetos durante la extinción, aprenderán que el EC no les produce el malestar gastrointestinal. Diversos tipos de fenómenos apoyan que la extinción no es un olvido: 1) Recuperación espontánea: Una vez extinguida la respuesta condicionada puede recuperarse con el tiempo sin requerir de otro entrenamiento. 2) Ahorro: La re-adquisición de la respuesta adquirida requiere menos ensayos que el entrenamiento original. 3) Reincorporación: La exposición sólo del EC puede restaurar la respuesta condicionada (Berman, 2003).

1.4 VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GUSTATIVA

El sentido del gusto, junto con otros sentidos, informa al organismo si debe ingerir el alimento, si la experiencia es placentera. En la boca, los componentes químicos del alimento interactúan con receptores sobre las células gustativas que traducen estímulos y transmiten la información relacionada con la identidad y la concentración. El sistema del gusto incluye receptores periféricos y algunas vías centrales. Los receptores periféricos o células gustativas, se encuentran en los corpúsculos gustativos distribuidos en la cavidad oral, la faringe y la parte superior del esófago. Los axones sensitivos primarios del nervio facial (VII), la rama lingual del glossofaríngeo (IX) y la rama laríngea superior del vago (X) inervan los corpúsculos gustativos y transmiten la información gustativa desde la lengua, el paladar, la epiglotis y el esófago respectivamente. Los diferentes pares craneales transmiten la información gustativa hacia el SNC, las vías gustativas centrales establecen sinapsis con la región rostral del núcleo del tracto solitario (NTSr), de donde proyectan fibras a diferentes estructuras del cerebro medio antes de alcanzar la corteza gustativa primaria, también llamada corteza insular. Las vías gustativas mencionadas se muestran a detalle en la Figura 8.

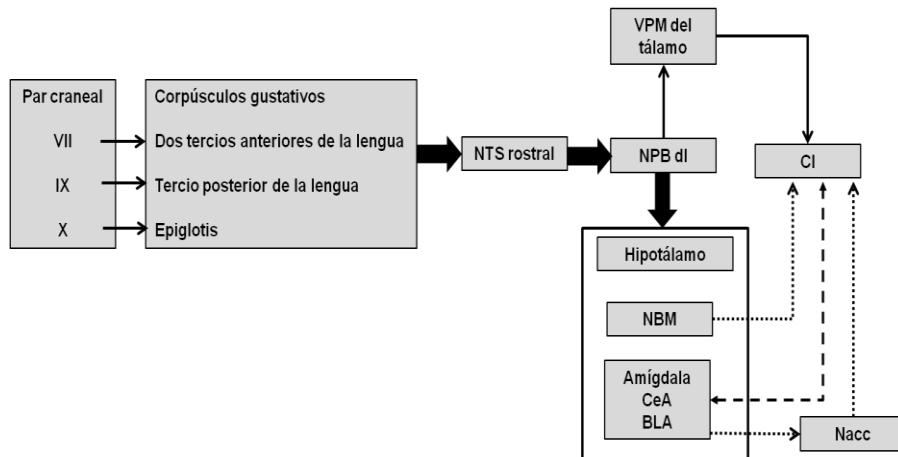


Figura 8. Diagrama de las vías básicas del procesamiento central de la información gustativa. Pares craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago), núcleo del tracto solitario rostral (NTSr), núcleo parabraquial dorsolateral (NPBdl), núcleo ventroposteromedial (VPM), núcleo basal magnocelular (NBM), amígdala central (CeA), amígdala basolateral (BLA), núcleo accumbens (Nacc) y corteza insular (CI).

1.5 VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISCERAL

Existen dos vías por el cual se transmiten los estímulos viscerales hacia el SNC. Una es a través de la detección de toxinas en el torrente sanguíneo por el área postrema (AP). El AP es un órgano circunventricular que se localiza a lo largo de la superficie dorsal del núcleo del tracto solitario (NTS) al nivel del bulbo raquídeo que proyecta principalmente al NTS. Las proyecciones del AP a la formación reticular medular y al núcleo parabraquial (NPB) delimitan al NTS. Por esta razón, el AP ha sido considerada como una porción quimiosensorial del complejo dorsal vagal. Experimentalmente, las lesiones en el NTS y sus conexiones con el AP se asocian en humanos y animales con un cambio en la conducta de alimentación caracterizado por la saciedad temprana y un escaso apetito (Afifi, 1998). La otra vía es por medio de las aferencias viscerales del nervio vago, conducen una gran variedad de sensaciones al tallo encefálico desde el corazón, los grandes vasos y los aparatos respiratorio y digestivo. Estas vías aferentes viscerales se relacionan con sensaciones como el hambre, las náuseas y el dolor visceral. Todas estas aferencias vagales pasan a través del ganglio nodoso y terminan en la región caudal del NTS (NTSc). A partir de este núcleo, durante el CAS la información visceral llega al NPB lateral, de este núcleo se bifurca la señalización visceral, dirigiéndose a la región ventroposteromedial del tálamo (VPM) y a la amígdala basolateral (BLA). El NPB proyecta a la sustancia inominata, al hipotálamo lateral y a la BLA de donde se envía información visceral a la corteza insular como se muestra con líneas punteadas en la Figura 7 (Bermudez-Rattoni et al., 2004).

Otras estructuras cerebrales que también se encuentran involucradas pero han sido menos estudiadas durante el CAS, son la corteza perirrinal que se sabe participa en la asociación gustativa en primates (Sewards and Sowards, 2001), el hipotálamo lateral que es crítico para la formación del aprendizaje ante una consecuencia post-ingestiva en particular con refuerzo de nutrientes (Touzani and Sclafani, 2002), la corteza prefrontal cuyos β -adrenoreceptores tienen una importante papel durante la adquisición y la prueba del CAS pero no durante la

formación de la memoria incidental (Hernadi et al., 2000, Reyes-Lopez et al., 2010).

1.6 ESTRUCTURAS DE LA INTEGRACIÓN VISCERAL Y GUSTATIVA

Las vías neuronales para las señales gustativas y viscerales durante la formación de la memoria gustativa han sido ampliamente estudiadas usando diferentes enfoques anatómicos y electrofisiológicos (Yamamoto et al., 1994, Bermudez-Rattoni, 2004). En general se acepta que las áreas con una función esencial durante la formación de la memoria el sabor son el NTS, el PBN, el núcleo basal magnocelular (NBM), la amígdala y la corteza insular.

El NTS se localiza en el tallo cerebral y es el primer relevo central para información gustativa y visceral (Hamilton and Norgren, 1984), mientras que la amígdala esta activamente involucrada en el procesamiento emocional y tiene su función importante de procesar el estímulo visceral para la formación de la memoria aversiva, además de participar en la adquisición y el almacenamiento de la memoria del condicionamiento al miedo (LeDoux, 2000, Wilensky et al., 2000) y en la evitación inhibitoria (Dunn and Everitt, 1988).

A continuación se describen detalladamente como participan durante el CAS el NTS y la BLA, ya que fueron estructuras fundamentales durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

1.7 NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO

1.7.1 PARTICIPACIÓN DEL NTS EN LA INTEGRACIÓN VISCERAL Y GUSTATIVA

En NTS es un núcleo que recibe información de diferentes pares craneales para regular funciones periféricas básicas y especiales, además se comunica con regiones centrales como la amígdala, hipotálamo, tálamo y la corteza (Figura 9), en conjunto regulan mecanismos vitales y procesan memorias. Los núcleos solitarios de ambos hemisferios se unen para formar el núcleo comisural del nervio vago (Afifi and Bergman, 1998).

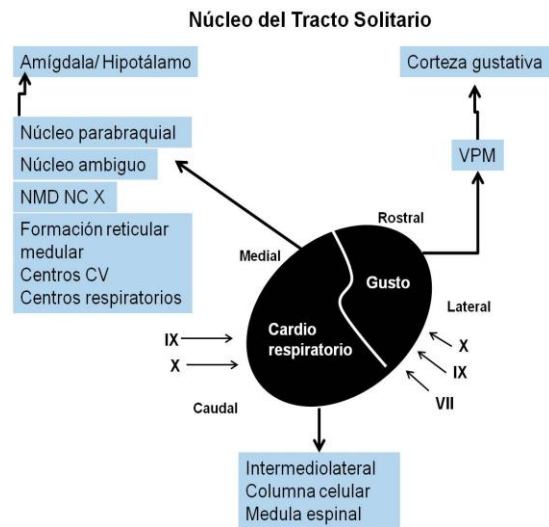


Figura 9. Diagrama de la representación esquemática que muestra las principales aferencias y eferencias del núcleo solitario (Extraído de Afifi 1998).

El NTS se divide en las siguientes zonas: la zona rostral se encarga de la función visceral especial (gusto) y recibe información procedente de los pares craneales VII, IX y X, y la zona caudal encargada de procesar los estímulos viscerales generales procedentes del X par craneal. Estas divisiones han sido definidas con mapeo de las terminales aferentes vagales por medio de inyecciones de trazadores retrógradas dentro de varias ramas viscerales. Para conocer la función sensorial, mecánica, y metabólica central de estas aferencias, se han realizado experimentos donde se utilizan genes de expresión temprana, como c-fos, que dependiendo de la función muestra diferentes patrones (Berthoud and Neuhuber, 2000). Las proyecciones ascendentes a la región caudal del NTS (general-visceroceptiva), han sido estudiadas experimentalmente en la rata por medio de las técnicas de inmunohistoquímica y trazadores anterogrados entre otras (Acuna-Goycolea et al., 2000, Rinaman, 2010).

Como se muestra en la Figura 8, a partir del NTSr, existe una gran variedad de estructuras encargadas en procesar la información gustativa durante el CAS. Las neuronas de esta zona ascienden ipsilateralmente a través de la formación reticular a las células del NPB dorsolateral (NPBdl). Y desde este núcleo, a través de dos vías envía proyecciones hacia el hipotálamo lateral, NBM y amígdalas

central (CeA) y BLA (Bures et al., 1998). La amígdala a su vez envía proyecciones hacia el núcleo accumbens (NAcc) (Kelley and Domesick, 1982, Brog et al., 1993, Wright and Groenewegen, 1996). La información de la otra vía se dirige a la parte parvocelular del VPM y de ahí proyecta a la corteza insular, que tiene conexiones recíprocas con la amígdala.

Por otra parte, el NTS recibe aferencias viscerales vagales. El nervio vago juega un papel muy importante en el procesamiento de información visceral desde la periferia. Este nervio es mixto y contiene aferencias y eferencias que conectan el cerebro con casi todos los órganos internos (Horn and Friedman, 2005). Las fibras sensoriales vagales aferentes en el tallo cerebral se encuentran de una manera organizada viscerotópica en subnúcleos del NTS. Toda la información sobre los pulmones, el hígado, las glándulas suprarrenales, el corazón y el estómago llegan al NTS vía el nervio vago. Las funciones sensoriales del nervio vago a nivel subdiafragmático desempeñan papeles importantes, ya que informa al cerebro sobre el estado nutricional, la señalización inmune y la detección de toxinas. La vagotomía subdiafragmática total en ratas se utiliza para investigar los efectos los mecanismos fisiológicos generales de la rama subdiafragmática del nervio vago (Horn and Friedman, 2005); así como detectar las respuestas gastrointestinales que acompañan a la expresión del (Haupt et al., 1997). El NTS tiene eferencias descendentes a neuronas parasimpáticas preganglionares de la medula espinal, eferencias a la formación reticular medular y aferencias a regiones del cerebro medio. Dentro de estas proyecciones, la más extensa es hacia el PBN y hacia la médula ventrolateral (Ross et al., 1985, Herbert et al., 1990, Saper, 1995) Sin embargo, también envía una proyección importante a la sustancia gris periacueductal que en su mayoría contiene neuronas noradrenérgicas (Herbert and Saper, 1992). Particularmente, el NTS tiene aferencias directas al LC (Van Bockstaele et al., 1999, Groves et al., 2005) una estructura que provee la principal fuente de inervación noradrenérgica a la BLA así como a otras estructuras (Fallon et al., 1978, Florin-Lechner et al., 1996). En este sentido el NTS recibe aferencias de la CeA y de la BLA (Spray and Bernstein, 2004).

Como se muestra en la Figura 7, el estímulo visceral durante el CAS (líneas punteadas) llega al NTSc, y a partir de este las aferencias viscerales hacen sinapsis en la región lateral del PBN y a partir de este punto se divide la información visceral hacia la región lateral del tálamo y hacia la BLA, ambas estructuras cerebrales terminan en la CI, siendo esta última la que mantiene conexiones recíprocas (Bermudez-Rattoni, 2004).

En general las principales aferencias del NTS incluyen: (1) locales hacia el núcleo dorsal motor del vago, al núcleo ambiguo y formación reticular donde están involucradas células noradrenérgicas del tallo cerebral; (2) hacia el PBN y complejo dorsolateral del puente. (3) aferencias ascendentes a varios sitios del cerebro anterior que incluye diferentes partes del hipotálamo, amígdala, núcleo de la estría terminal y corteza insular (Ter Horst et al., 1989).

1.7.2 EL NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR

A lo largo de más de 20 años de investigación en varios laboratorios, se han estudiado las vías neurales que están involucradas en el CAS. Cuando un alimento es tóxico, puede provocar una irritación gastrointestinal y esta señal es transportada por aferencias vagales. En cambio si el componente tóxico es absorbido en el torrente sanguíneo, el AP es la que recibe información de la presencia del agente tóxico absorbido por vía gástrica o sanguínea. Estos mecanismos de detección de agentes tóxicos son los encargados del reflejo del vómito, y en el caso del CAS, favorecen la señalización hacia centros superiores del encéfalo para impedir la ingestión del alimento tóxico en un siguiente encuentro. Para John García, esta relación anatómica provee una retroalimentación conveniente para el procesamiento de la información gustativa y las características de la comida; así como, su subsecuente efecto visceral después de la ingestión (Garcia et al., 1955, Coil et al., 1978).

Uno de las funciones importantes del NTS sobre su función gustativa ha sido demostrada por algunas investigaciones donde las ratas con lesión electrolítica en la parte rostral del NTS (Shimura et al., 1995, Grigson et al., 1997,

Shimura et al., 1997) no responden a estímulos gustativos. Por ejemplo, beber sacarosa (1.0 M) no difiere de beber agua, además la adición de sustancias normalmente aversivas reduce a la mitad la ingesta con respecto a lo que se consume antes de la lesión. Cuando la presentación de alanina (0.3 M) es pareada con la inyección de LiCl, las ratas lesionadas aprenden a evitar el consumo de alanina; todos estos resultados sugieren que las ratas con lesiones en el NTS muestran efectos sobre la respuesta a los estímulos sápidos, así como un marcado deterioro de preferencia gustativa y de aversión (Bures et al., 1998). Por otra parte se ha descrito una interacción importante entre el NTS y la amígdala a través de estudios electrofisiológicos que el intervalo de disparo en neuronas noradrenérgicas de la amígdala incrementa significativamente después de la estimulación eléctrica de neuronas en el NTS (Radna and MacLean, 1981, Rogers and Fryman, 1988) y la estimulación vagal produce significativamente un incremento de neuronas que expresan la proteína *Fos* en la amígdala (Naritoku et al., 1995). Otra de las interacciones importantes entre el NTS y la BLA ha sido descrita en estudios que evalúan memorias en tareas de aprendizaje tales como la evitación inhibitoria (Williams et al., 2000) y el laberinto acuático (McIntyre et al., 2003).

1.8 LA AMÍGDALA

El término amígdala, deriva de la palabra griega “almendra”, se describe como una masa ovoide de materia gris que se encuentra en la porción medial del lóbulo temporal. Es un complejo multinuclear, que es de gran interés por su implicación en la conducta emocional. El complejo amigdalino es estructuralmente diverso y comprende 13 núcleos (Aggleton et al., 1987). Además incluye otras subdivisiones que tienen conexiones internucleares e intranucleares extensas. Estos núcleos y subnúcleos se clasifican sobre la base de la citoarquitectura, de la histoquímica y de sus conexiones. Su nomenclatura se basa en lo descrito por Price y colaboradores (Price et al., 1987) con algunas modificaciones. En esta clasificación los núcleos de la amígdala se dividen en tres principales: 1) núcleos profundos que incluyen al núcleo lateral, basal y basal accesorio; 2) núcleos

superficiales, que incluyen al núcleo cortical y los núcleos del tracto olfatorio lateral; 3) centromediales, que incluyen al núcleo medial y central. Hay otro conjunto de núcleos que no se incluyen en esta clasificación, como son la masa de células intercaladas y el área amígdalo-hipocampal (Alheid et al., 1995, Pikanen, 2000). La CeA se localiza en la porción rostral de la amígdala, y está limitada lateralmente por la BLA, dorsalmente por el globo pálido y medialmente por la estría terminal. Caudalmente, la CeA termina cuando aparece el ventrículo lateral. Se ha planteado que la CeA está principalmente involucrada en la detección con los aspectos generales novedosos del ambiente (Dunn and Everitt, 1988, Koh et al., 2003b).

La BLA comprende dos núcleos, el basal y el lateral. El núcleo lateral está localizado en el aspecto dorsal de la amígdala, y está limitado ventralmente con el núcleo basal. Este núcleo está limitado lateralmente por la cápsula externa y medialmente por la CeA. El núcleo basal se localiza ventral al núcleo lateral y se subdivide en magnocelular, parvocelular e intermedio (Pikanen, 2000, Sah et al., 2003). El complejo basolateral de la amígdala recibe proyecciones de la corteza cerebral, incluyendo la región insular y además del complejo talámico posterior intralaminar (Yasui et al., 1991). En aspectos conductuales de aprendizaje tales como la respuesta condicionada al miedo, la evitación inhibitoria y el CAS, dependen de la integridad de las proyecciones talámicas hacia la BLA (Miranda et al., 2002, LeDoux, 2003, Ferreira et al., 2005). Diversos autores han demostrado que la BLA es una estructura muy importante para los mecanismos implicados durante el CAS (Bermudez-Rattoni, 2004, Núñez-Jaramillo et al., 2010, Gal-Ben-Ari and Rosenblum, 2011).

1.8.1 PARTICIPACIÓN DE LA AMÍGDALA EN LA INTEGRACIÓN VISCERAL Y GUSTATIVA DURANTE EL CAS

Los núcleos de la amígdala implicados en el CAS, son el CeA y el BLA (Lamprecht and Dudai, 2000), por lo que las descripciones posteriores en torno a la amígdala y el CAS se enfocarán en estos dos núcleos amigdalinos.

López-Velázquez y colaboradores (Lopez-Velazquez et al., 2007) demostraron que al exponer a ratas a un sabor novedoso existía una elevación en la expresión de c-Fos en la CeA; en cambio cuando se exponían a un sabor familiar no incrementaba su expresión. Otros estudios, han confirmado que la administración de LiCl y la presión osmótica, induce un aumento de la expresión de c-Fos en la CeA (Gu et al., 1993, Lamprecht and Dudai, 1995, Yamamoto et al., 1997, Koh et al., 2003a, Ferreira et al., 2006, St Andre et al., 2007). En otra serie de estudios durante la adquisición del CAS, se realizaron microinfusiones en la CeA de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas antes del consumo de sacarina, o propranolol, un bloqueador de los receptores β -adrenérgicos, después del consumo de sacarina. Los resultados mostraron que tanto la inhibición de la síntesis de proteínas como el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos, evita la adquisición del CAS y con ello se concluye que la CeA es esencial para la formación de memoria aversiva al sabor a largo plazo (Bahar et al., 2003, Bahar et al., 2004).

Los aspectos conductuales tales como respuesta condicionada al miedo, evitación inhibitoria y el CAS, dependen de la integridad de las proyecciones talámicas hacia la BLA (Miranda et al., 2002, LeDoux, 2003, Ferreira et al., 2005). Asimismo, se ha reportado que la inactivación de la BLA por tetrodotoxina (TTX, bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje) después del estímulo gustativo o antes del estímulo visceral evita la formación del CAS (Gallo et al., 1992, Roldan and Bures, 1994). Sin embargo, la inactivación de la BLA con TTX antes del estímulo gustativo no interrumpe el desarrollo del CAS. Esto podría indicar que la amígdala no está implicada en el procesamiento inicial del sabor, sino más bien en el procesamiento de la información visceral procedente de la administración de LiCl intraperitoneal, es decir, la BLA está implicada en el procesamiento del malestar gastrointestinal.

De acuerdo con estos resultados, mediante estudios de microdiálisis se ha mostrado el aumento en la liberación Glu en la BLA, después de haber inducido un malestar gástrico con LiCl (Miranda et al., 2002). Asimismo, también se demostró que, justamente antes de la inyección de una dosis baja de LiCl (dosis que no

induce un CAS), las microinyecciones de Glu dentro de la amígdala, inducen un claro aprendizaje aversivo al sabor (Miranda et al., 2002). Estos resultados sugieren que el Glu en la BLA, está relacionado con el procesamiento de la entrada de la señal del estímulo visceral en este condicionamiento. Por otra parte, el bloqueo de los receptores de Glu de la BLA (a través de antagonistas de receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos), durante el consumo de la sacarina y la inyección del LiCl, interrumpe la adquisición del CAS (Yasoshima et al., 2000). Sin embargo, después de la adquisición del CAS, sólo el bloqueo de los receptores AMPA, pero no los NMDA y metabotrópicos, afectó la evocación del CAS. Estos resultados sugieren, que la señalización glutamatérgica está involucrada en la formación y almacenamiento de la memoria gustativa asociada a los cambios hedónicos de lo positivo a lo negativo (Yasoshima et al., 2000). Otra evidencia que sustenta la hipótesis de que la BLA modula la consolidación de la memoria, es que las microinfusiones intracerebrales de Glu en la BLA, en animales inyectados con una dosis baja de LiCl (el cual no induce un aprendizaje aversivo), provocaron una retención del aprendizaje aversivo (Ferreira et al., 2005). Sin embargo, cuando en la CI los receptores tipo NMDA se bloquearon con un antagonista, se eliminó la retención del aprendizaje aversivo provocado por la infusión de Glu en la BLA. Por otra parte las microinyecciones de inhibidores de la protein cinasa "C" (PKC) en la BLA, durante el intervalo de asociación de estímulos en el CAS, provocaron que los sujetos no adquirieran el CAS (Yasoshima and Yamamoto, 1997). Cuando administraron el inhibidor de la PKC, 30 min después de haber presentado los estímulos, se interrumpió la formación del CAS.

Sobre esta línea de investigación, también se ha demostrado que sólo la inyección de dosis altas de LiCl (suficiente para inducir un claro CAS) inducen la expresión de c-Fos en la CeA y la BLA (Ferreira et al., 2006). Es importante señalar, que en la corteza insular, dosis altas o bajas de LiCl son capaces de provocar la expresión de c-Fos. Estos resultados sugieren que la amígdala es importante para el procesamiento de la información visceral y su activación depende de la intensidad del estímulo visceral (LiCl). En otro estudio de expresión

de genes, se confirmó la participación de la BLA en el procesamiento del estímulo visceral. A través de inmunohistoquímica, la BLA mostró un incremento en la expresión de Fra-2 que es un gen de expresión inmediata, después de la inyección de LiCl (sin asociarla a un estímulo gustativo novedoso) y después de haber realizado una asociación entre el estímulo gustativo y el malestar gastrointestinal (Kwon et al., 2008).

Por otra parte existen evidencias de que la inyección sistémica de adrenalina induce un incremento significativo de NA en la amígdala durante el mejoramiento de la memoria, el cual puede ser interrumpido por el bloqueo químico del NTS (Williams et al., 1998). La activación vagal o la directa estimulación del NTS podría iniciar la liberación de NA en la amígdala, o por acción directa sobre la BLA debido a una vía polisináptica que involucra al LC (Williams et al., 2000); por lo tanto la estimulación eléctrica del nervio vago mejora los procesos cognitivos por activar estructuras centrales tales como la BLA y provocar un incremento en la liberación de NA (Hassert et al., 2004).

Otra función en la cual participa la BLA, es durante la extinción del CAS, ya que mediante microinfusiones en la BLA de anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) o propranolol (bloqueador β -adrenérgico), se demostró que ambos fármacos no bloquearon la adquisición, pero sí la extinción del CAS (Bahar et al., 2003, Bahar et al., 2004). Además que los receptores β -adrenérgicos, y la síntesis de proteínas están involucrados en el proceso de la extinción.

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La subsistencia de los animales, depende de la posibilidad de desarrollar una memoria para reconocer los sabores de los alimentos. Esta memoria puede evaluarse en el laboratorio a través del CAS, el cual es un modelo de aprendizaje donde un sabor nuevo es asociado con un malestar gástrico, lo que induce posteriormente, un decremento en el consumo de dicho sabor o alimento; esta aversión suele ser robusta y permanece por largos períodos de tiempo (Bures et al., 1998).

El trabajo propuesto en esta tesis doctoral se enfocó en el estudio de la interacción entre dos regiones que están altamente involucradas en la recepción e integración de los estímulos gustativos y/o viscerales.

Sabemos que el NTS tiene una función vital en la recepción de estímulos químicos y señales periféricas relacionadas con la estimulación vagal y con la respuesta hormonal ante eventos emocionales, así como en la transmisión de la información a estructuras límbicas tales como la amígdala que integra información relacionada a diferentes tipos de memoria (Williams and McGaugh, 1994, Miyashita and Williams, 2003).

Se ha demostrado que la NA es un neuromodulador involucrado en memorias aversivas de distinto tipo (McGaugh, 2002); asimismo existen estudios que han determinado que el NTS y la amígdala podrían estar interactuando a través de la actividad noradrenérgica (Clayton and Williams, 2000b, a). Por ejemplo, por medio de estimulación eléctrica de las aferencias vagales se modifican los niveles de NA en varias estructuras que intervienen en la formación de la memoria de contexto, tales como el hipocampo y la amígdala (Clayton and Williams, 2000a, Williams et al., 2000, Miyashita and Williams, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que al lesionar la amígdala no se incrementa la liberación de NA por activación de las fibras periféricas vagales y por lo tanto, no se produce un mejoramiento de la memoria espacial, aversiva o de discriminación (Miyashita and Williams, 2003).

Tanto la corteza insular como la BLA, son indispensables para la adquisición del CAS, y reciben información procedente del NTS. Las evidencias experimentales han demostrado que el bloqueo farmacológico de la BLA, después de la estimulación gustativa o antes de la estimulación visceral, también interrumpe la formación del CAS, lo que indica que la BLA es indispensable para procesar estímulos viscerales (Ferreira et al., 2005). En este sentido, se ha demostrado un incremento significativo en la liberación de Glu en la BLA después de la inducción de un malestar gástrico, pero no después del consumo de un sabor nuevo (Miranda et al., 2002). Adicionalmente, se ha demostrado que la infusión de Glu en BLA imita la estimulación visceral aversiva y por lo tanto promueve la formación del CAS; este efecto es bloqueado por la administración simultánea del antagonista del receptor tipo NMDA (Ferreira et al., 2005). Por otra parte, sabemos que la actividad colinérgica en la corteza insular es imprescindible para procesar el estímulo gustativo novedoso (Miranda and Bermudez-Rattoni, 1999) y que la ACh a través de la activación de receptores muscarínicos promueve la fosforilación de los receptores tipo NMDA en esta corteza (Figura 10) (Berman et al., 2000, Bermudez-Rattoni, 2004). En este sentido, también se ha relacionado un incremento significativo de Glu en la corteza insular con la estimulación visceral (ej. cloruro de litio, LiCl) durante la consolidación del CAS, lo que sugiere directamente que la actividad glutamatérgica en la corteza insular está mediada por otras estructuras como la BLA.

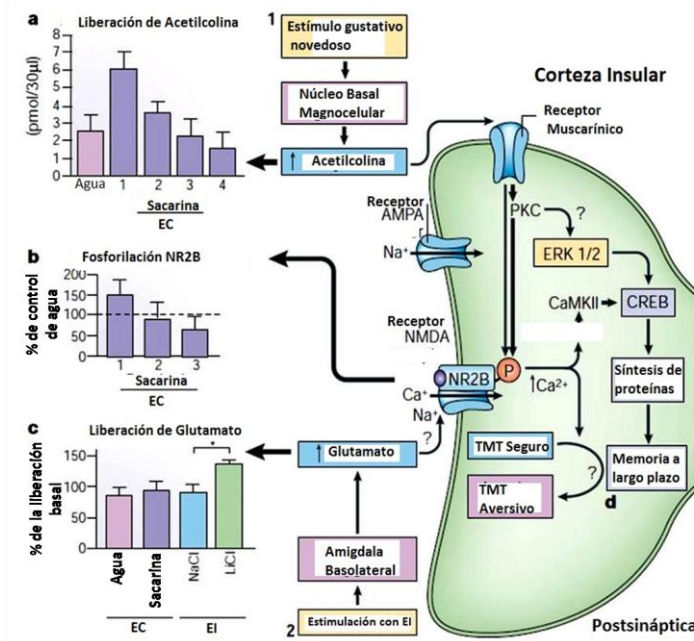


Figura 10. Representación de la integración de la memoria de reconocimiento gustativo en la corteza insular. a) El incremento en la liberación de ACh ante el estímulo gustativo novedoso que favorece la activación de receptores muscarínico, activando a la PKC que probablemente favorece los mecanismos de fosforilación de la subunidad NR2B (b) de receptores NMDA de Glutamato que a su vez activa dicho receptor por incrementos debido a un estímulo visceral (c). EC, estímulo condicionado; EI, estímulo incondicionado; TMT, trazo de memoria (Modificado de Bermudez-Rattoni, 2004).

Todas las evidencias anteriores, indican que la estimulación de la BLA podría favorecer la formación de la memoria al aumentar la liberación de Glu en la BLA, que a su vez, es modulada a través de la actividad noradrenérgica del NTS; sin embargo, aún es necesario establecer si la estimulación de las neuronas del NTS durante el CAS activa a la amígdala, favoreciendo mecanismos cognitivos involucrados en la formación de memorias aversivas del sabor y a través de la actividad glutamatérgica presente en la BLA durante el procesamiento del estímulo visceral.

Es por ello que en este proyecto nos planteamos las siguientes preguntas ¿En el NTS se integra la intensidad del estímulo visceral involucrado en el CAS? Durante el procesamiento del estímulo visceral, ¿es el NTS el que regula la actividad glutamatérgica y noradrenérgica en la BLA? Para ello, se propuso caracterizar las rutas neuroquímicas de señalización entre el NTS y la BLA (Figura 11), para establecer cuáles son las vías de neurotransmisión utilizadas por estas estructuras durante las interacciones necesarias en la formación del CAS. Para

lograrlo, estudiamos si la actividad del NTS promueve la liberación de NA o Glu en la BLA durante la entrada del estímulo visceral el día de adquisición del CAS.

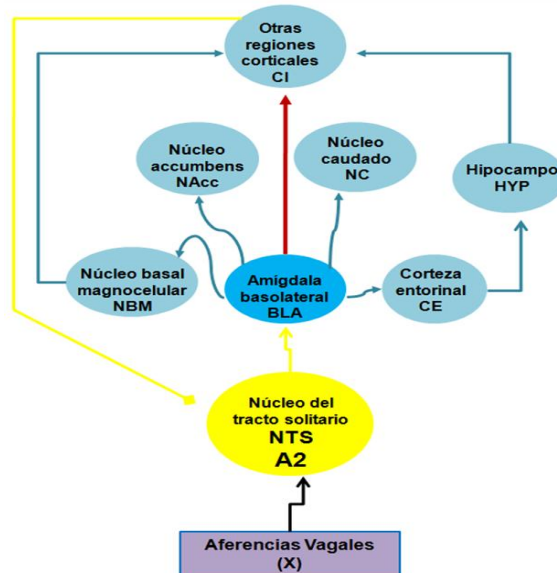


Figura 11. Diagrama de la representación de las aferencias noradrenérgicas del NTS a la BLA, la cual también interactúa con estructuras que le proveen inervación noradrenérgica y glutamatérgica.

2.1 HIPÓTESIS

- 1) La estimulación con alto potasio del NTS provocará la liberación de NA y/o Glu en la BLA.
- 2) La activación química con alto potasio del NTS, durante la estimulación visceral de baja concentración, provocará la liberación de NA en la BLA, y en consecuencia mejorará la respuesta de aversión al sabor.
- 3) La activación química del NTS con alto potasio, durante la estimulación visceral de baja concentración provocará la liberación de Glu en la BLA, y en consecuencia mejorará la respuesta de aversión al sabor.

2.2 OBJETIVOS

- I. Evaluar en animales anestesiados los cambios en la actividad noradrenérgica de la BLA, ante una despolarización con alto potasio del NTS.

- II. Evaluar en animales en libre movimiento, los efectos en la formación de la memoria aversiva de la estimulación despolarizante del NTS durante la estimulación visceral de baja intensidad; determinando a su vez la actividad noradrenérgica en la BLA.
- III. Evaluar en animales en libre movimiento, los efectos en la formación de la memoria aversiva de la estimulación despolarizante del NTS durante la estimulación visceral de baja intensidad; determinando a su vez la actividad de glutamatérgica en la BLA.

2.3 ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

- a) Estimular el NTS con solución Ringer-Krebs alto en potasio (110 mM) determinando simultáneamente la liberación de Glu y NA en la BLA, a través de microdiálisis en animal anestesiado.
- b) Evaluar a través de microdiálisis en animales en libre movimiento la liberación de NA en la BLA, durante la adquisición del CAS utilizando un estímulo visceral de baja concentración (LiCl 0.08 M i.p.) y simultáneamente despolarizando el NTS con Ringer-Krebs alto en potasio.
- c) Evaluar a través de microdiálisis en animales en libre movimiento la liberación de Glu en la BLA, durante la adquisición del CAS utilizando un estímulo visceral de baja intensidad (LiCl 0.08 M i.p.) y simultáneamente despolarizando el NTS con Ringer-Krebs alto en potasio.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

A continuación se describe de forma resumida los protocolos, materiales y métodos usados en esta tesis doctoral, los cuales se encuentran ampliamente descritos en el artículo publicado (ver anexo no. 1) así como en el manuscrito enviado para su publicación (ver anexo no. 2).

3.1 SUJETOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley, con un peso inicial de 250 a 280 g, que fueron habituadas con un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 horas. Se colocaron individualmente en cajas de acrílico (45 x 25 x 20 cm) durante 7 días antes de la cirugía, con acceso a alimento y agua *ad libitum*, excepto durante el paradigma conductual. Se controló la temperatura a 23 ± 2 °C. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas en materia de salud (Ministerio de Salud, México), de acuerdo a las leyes mexicanas para la Protección de los Animales (Norma Oficial Mexicana SAGARPA) y la aprobación del Comité de Cuidado de Animales local (Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM), que cumpla con la Guía de los Institutos Nacionales de la Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH publicación 80-23, revisado 1996).

3.2 CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR

En este trabajo, la adquisición del CAS consistió en presentar solución de sacarina al 0.1% por 20 min y, 30 min después de terminado el consumo se administró por vía i.p. LiCl de baja o alta concentración (0.08 M y 0.3 M respectivamente). La prueba de evocación de la memoria aversiva se realizó 24 h después, presentando nuevamente sacarina (0.1%) por 20 min sin la inyección de LiCl.

3.3 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Las ratas se anestesiaron con una solución compuesta de ketamina (Cheminova de México, S.A de C.V) 70 mg/Kg i.p. y xilacina (Cheminova de México, S.A de C.V) 6 mg/Kg i.p. Posteriormente basándose en las coordenadas

del atlas de Paxinos (Paxinos and Watson, 1998) el NTS (AP= -13.3 mm, L= \pm 1.0 mm, V= -5.6 o -7.6 mm; libre movimiento y anestesiados respectivamente) y para la BLA (AP= -2.8 mm, L= \pm 5.0 mm, V= -8.5 mm desde bregma), se les implantó con la ayuda un equipo estereotáxico cánulas de acero inoxidable de 15 mm y 30 gauges de diámetro.

3.4 ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Se utilizaron inyectores unilaterales o bilaterales conectados por uno de sus lados a una jeringa Hamilton de 10 μ l por medio de una manguera delgada de polietileno. Transcurrido el tiempo entre los estímulos (gustativo y visceral), se insertaron los inyectores en las cánulas (que sobresalían 2 mm de la punta de la cánula) y se administró a través de una bomba de inyección automática, 0.2 μ l/min por hemisferio, solución salina isotónica estéril (0.9% w/v) o bien solución Ringer-Krebs en concentraciones normales de potasio (82 mM) o en alto contenido del ión potasio (110 mM), antes o después de la inyección del estímulo visceral; mientras que en los grupos dializados la administración de potasio fue simultáneamente con la inyección i.p. de LiCl (0.08 M). Al terminar la administración de la solución de Ringer, se dejaron los inyectores en el sitio durante un minuto con la finalidad de obtener una buena difusión en el parénquima.

3.5 MICRODIÁLISIS EN ANIMAL ANESTESIADO

Bajo anestesia con uretano se insertaron simultáneamente el inyector unilateral en el NTS y la sonda de microdiálisis en BLA.

La microdiálisis consistió en las siguientes etapas: Estabilización de sonda, basales, estimulación con alto potasio en NTS, liberación basal, estimulación con alto potasio en la BLA y liberación basal post-estimulación.

Una vez que se insertaron simultáneamente el inyector en el NTS y la sonda en la BLA, se dio inicio a la perfusión constante de solución Ringer a través de la sonda, y se permitió un tiempo de aproximadamente 1 hora para descartar y estabilizar el volumen recolectado en las muestras de dializados.

La microdiálisis se mantuvo con un flujo de 2.0 µl/min de solución Ringer-Krebs, y se inició el muestreo después de una hora de estabilización, recolectando cada 15 min muestras con un volumen total de 30µl cada una.

En total se recolectaron 18 muestras de dializados a lo largo de todo el muestreo. Una vez terminada la diálisis el animal se sacrificó con una sobredosis de pentobarbital y se obtuvo el cerebro para verificar la localización de las cánulas.

3.6 MICRODIÁLISIS EN LIBRE MOVIMIENTO

Después de una semana de recuperación de la cirugía, los animales fueron habituados a beber en la cámara de acrílico para microdiálisis para establecer su consumo basal de agua, dando acceso al agua de bebida por 20 minutos al día durante 15 días.

El día de adquisición del CAS, las ratas fueron sometidas al protocolo de microdiálisis en libre movimiento:

Después de la inserción de la sonda e inyectores bilaterales en el NTS, se dejó estabilizar la diálisis por una hora, para posteriormente recolectar muestras de dializado cada 15 min, estableciendo así las etapas de estabilización, basales, consumo sacarina, estímulo visceral K⁺ y basal post-estímulo.

La microdiálisis en la BLA se mantuvo con un flujo de 2.0 µl/min de solución Ringer-Krebs, y cada 15 min se recolectaron muestras con un volumen total de 30 µl. Al finalizar, el animal se desconectó del sistema de microdiálisis y se devolvió a su caja en el vivario.

Los dializados se conservaron a una temperatura de -30 °C, para su posterior análisis por HPLC.

Después de transcurridas 24 h desde la adquisición del CAS y la sesión de microdiálisis, se volvió a colocar al animal en la cámara de microdiálisis, pero en esta ocasión sin ninguna conexión de diálisis, para realizar la prueba del CAS, presentando de nuevo la solución de sacarina 0.1% por 15 min.

3.7 HISTOLOGÍA

Con la finalidad de corroborar los sitios donde quedaron localizadas las cánulas de infusión y las sondas de microdiálisis, los sujetos de experimentación fueron inyectados i.p con una sobredosis de pentobarbital (113 mg/kg) y se perfundieron intracardialmente con solución salina fisiológica (0.9%). Posteriormente tras decapitación se extrajeron los cerebros. Los cerebros se colocaron en solución de formaldehído al 10% durante 7 días; pasado este tiempo se cambiaron a solución de sacarosa al 30%, como una medida de crioprotección. Una semana después, los cerebros fueron cortados coronalmente en rebanadas de 50 μm con un microtomo bajo una temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez obtenidos los cortes se montaron en portaobjetos (24x60 mm) gelatinizados para posteriormente teñirlos con violeta de cresilo, añadir resina y cubrirlos con un cubreobjetos y dejar secar (técnica de violeta de cresilo o Nissl). Los cortes se examinaron en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61, Vietnam) para determinar si las cánulas, los inyectores y las sondas fueron colocados correctamente en el NTS y la BLA respectivamente, solo aquellos ubicados correctamente fueron incluidos en el análisis estadístico (Figura 12).

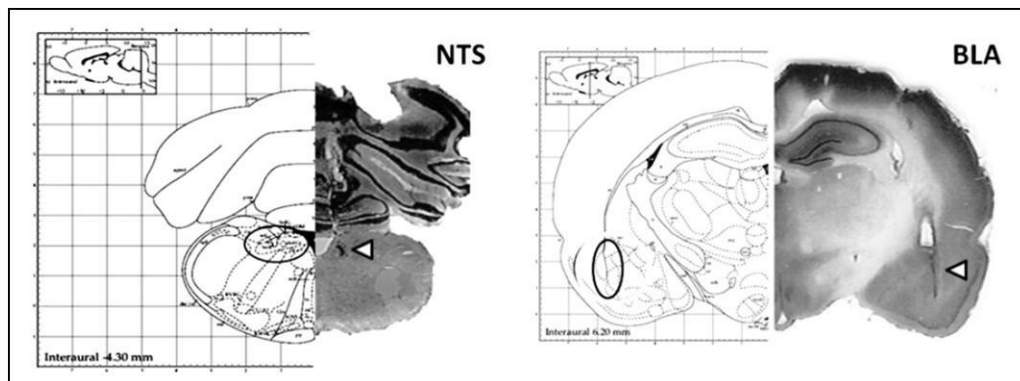


Figura 12. Los triángulos blancos señalan la localización de inyectores en el núcleo del tracto solitario (NTS) y de sondas en la amígdala basolateral (BLA) en un corte coronal de 50 μm en cerebro de rata. Los círculos de contornos negros muestran la ubicación del NTS y la BLA en el atlas de Paxinos, AP -13.3 y -2.8, respectivamente a partir de bregma en un corte coronal (Modificado de Paxinos y Watson, 1998).

3.8 ANÁLISIS DE LA NORADRENALINA POR HPLC

Las muestras recolectadas en la microdiálisis fueron analizadas por medio de HPLC (BASi PM-80, West Lafayette Indiana, USA) y detector electroquímico (Epsilon) para cuantificar los niveles de noradrenalina, adrenalina y DHBA, siendo este último un estándar interno. Se utilizó una fase móvil constituida por EDTA, ácido cloro acético y duodecil-sulfato de sodio, pH 3, con una fase estacionaria o columna C18 fase reversa.

3.9 ANÁLISIS DE GLUTAMATO POR HPLC

Se estandarizó la técnica de glutamato por HPLC, a través de un estuche de determinación (BASi MF-9054, West Lafayette Indiana, USA) para la determinación de glutamato y aspartato.

Para cuantificar glutamato por medio de HPLC se realizó una reacción de derivación con o-phtalaldehído (OPA) el cual es ampliamente utilizado para la determinación de aminoácidos. En la presencia de un tiol, el OPA reacciona rápidamente con aminas primarias para formar 1-alquitioisindoles de alto rendimiento. Se requieren dos fases móviles las cuales contienen diferentes cantidades de acetonitrilo grado HPLC y buffer de acetato de sodio (0.1M a pH 6). La fase estacionaria es una columna C18 fase reversa.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez realizado el análisis histológico, se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de cada grupo experimental. Para la inclusión de los sujetos experimentales se consideró que el animal durante la parte experimental mantuviera su peso adecuado (entre los 260 y 400 g), que según el grupo experimental manifestara la memoria aversiva o no y que la colocación de inyectores en el NTS y sondas en la BLA estuvieran en los sitios correctos.

El análisis estadístico para cada sección experimental en esta tesis doctoral fue el siguiente:

A) Los datos obtenidos de la microdiálisis en animal anestesiado (expresados en ng/20 μ l) fueron analizados por medio del modelo lineal de SAS (2008) y la prueba de comparación múltiple de LSMEANS para obtener y analizar los diferentes tratamientos durante el protocolo experimental.

B) Los datos de los grupos de farmacología y conducta se analizaron con un ANOVA de dos vías seguido por un análisis post-hoc de Fisher's. Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar.

C) Los datos obtenidos de la cuantificación de los microdializados por HPLC se analizaron por medio de un ANOVA de medidas repetidas para comparar los niveles del neurotransmisor liberado en las fracciones de la microdiálisis. Para analizar las diferencias entre las fracciones, se realizó una ANOVA simple entre cada una de las fracciones. Se consideró para valores significativos una $p < 0.05$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 VERIFICACIÓN DE LA COLOCACIÓN DE INYECTORES Y SONDA DE MICRODIÁLISIS.

Diagramas y representación fotográfica que ilustra el sitio (punta de flecha) el inyector y sonda de microdiálisis en el NTS y BLA respectivamente para todos los experimentos se muestra en la Figura 12. Los círculos en los diagramas representan las áreas consideradas para la localización de inyector y sonda. Como se puede ver en la Figura 12, el área correcta de los inyectores en el NTS, incluye todas las sub-regiones. Sin embargo, en una prueba de tinción con azul de pontamina mostró que existía una mínima difusión dentro de áreas cercanas al NTS tales como el núcleo hipogloso y el núcleo parasolitario. Para definir el sitio correcto de la amígdala y poder incluirlo en los datos, se limitaron las regiones anterior, posterior y ventral del núcleo lateral y basal del complejo amigdaloides. Sin embargo, no es posible asegurar que las mediciones de microdiálisis son justo en uno de los núcleos amigdaloides, tales como el central o basolateral, ya que el diámetro (2 mm) de la sonda de microdiálisis es más largo que el diámetro del núcleo basolateral, según lo establecido en el atlas de Paxinos y Watson (1998). La estadística para la liberación de noradrenalina en animales anestesiados, consideró aquellos animales que también tenían los inyectores y sondas en áreas periféricas (histologías no mostradas); sin embargo, para los resultados de farmacología y microdialisis en libre movimiento sólo se incluyeron en el análisis aquellos animales con precisa colocación de inyectores en el NTS y sonda en la BLA.

4.2 LIBERACIÓN DE LA NORADRENALINA EN ANIMAL ANESTESIADO

Sólo 16 ratas de un total de 25, fueron consideradas por terminar el protocolo de microdiálisis. Los datos obtenidos de la liberación de la noradrenalina fueron expresados en ng/20µl de muestra y analizados por medio de un modelo lineal de SAS (2008), y se utilizó una prueba de comparación múltiple LSMEANS. Se analizó la liberación de NA en animales que tenían correctamente colocados

inyectores y sonda de microdialisis (NTS-BLA, n=6), y se comparó esta liberación con aquellos animales que tenían solamente los inyectores colocados en el NTS pero no la sonda en la BLA (Solo NTS, n=4), así como también con aquellos animales que tenían fuera de lugar inyectores y sonda (Fuera de lugar, n=6).

La despolarización directa del NTS provocó un incremento significativo en la liberación de NA (539%) en la BLA comparados con los niveles basales de NA. El incremento significativo en la liberación de NA fue observado solamente en la muestra colectada inmediatamente después de la estimulación, indicando un efecto rápido y agudo de la estimulación del NTS sobre la liberación de NA en la BLA. Un incremento significativo similar de la liberación de NA (500%) fue observado en la BLA después de estimular directamente este núcleo. De los animales con incorrecta localización de la punta de la sonda en la amígdala (por ejemplo, en el núcleo parvocelular, reticular e hipogloso), los niveles de NA no cambiaron significativamente después de la estimulación química, lo que indica que la liberación de NA es específicamente inducida por la estimulación del NTS y sus proyecciones. Cuando la sonda de microdialisis estaba fuera de lugar (corteza piriforme, núcleo dorsal endopiriforme, putamen-caudado, o área de transición amygdaloestriatal) no hubo ningún cambio significativo en los niveles de NA después de la estimulación química del NTS (Figura 13, líneas punteadas). Los resultados se muestran en la Figura 13.

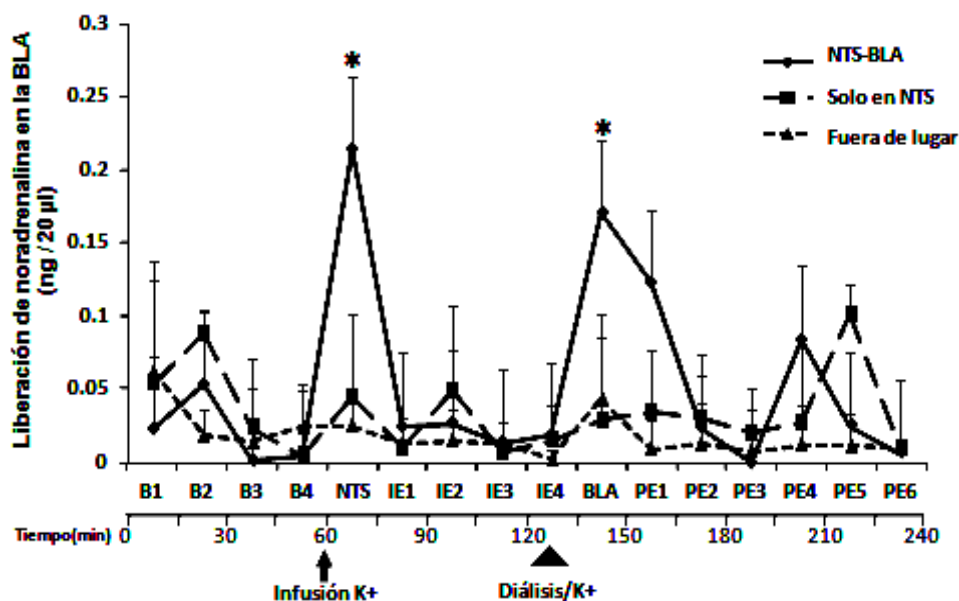


Figura 13. Gráfica que representa los cambios en la liberación de NA en la BLA después de la estimulación del NTS (flecha delgada) o directa estimulación de la BLA (flecha ancha) con alto potasio (n=6; * P ≤ 0.05). Liberación observada en animales que no tenían correcta colocación de sonda en la BLA (Línea de puntos cuadrados) (n=4, * P > 0.05); liberación observada en animales con inyectores y sonda fuera de lugar (línea con triángulos) (n=6, * P < 0.05).

4.3 LA ADMINISTRACIÓN DE ALTO POTASIO O GLUTAMATO EN EL NTS INMEDIATAMENTE DESPUÉS DEL ESTÍMULO VISCERAL MEJORA LA ADQUISICIÓN DEL CAS.

El efecto de la estimulación química del NTS, antes de la inyección i.p. de LiCl y durante el día de adquisición y prueba del CAS, se muestra en la Figura 14A. Una ANOVA entre grupos reveló que no existió una diferencia significativa entre el consumo de agua durante el establecimiento de la línea basal y el consumo de sacarina el día de adquisición del CAS. Sin embargo, en el día de prueba del CAS, se observó una diferencia significativa entre grupos ($F_{2,17} = 4.465$, $p < 0.05$); el grupo con baja estimulación visceral (Bajo LiCl) y el de baja estimulación visceral pero despolarizado con potasio (Bajo LiCl-K⁺) muestran un incremento significativo en el consumo de sacarina comparado con el grupo Control de CAS (Control), indicando que la baja concentración de LiCl y la baja concentración de LiCl con potasio son incapaces de inducir una memoria de aversión al sabor.

El efecto de la estimulación química del NTS por infundir alto potasio o glutamato inmediatamente después de la inyección i.p. de LiCl se muestra en la Figura 14B. Una ANOVA reveló que no hay diferencias significativas entre el consumo de agua y el consumo de sacarina durante el día de adquisición del CAS. Sin embargo, durante el día de prueba, se observó una diferencia significativa entre grupos ($F_{3,55} = 50.826$, $p < 0.01$); el grupo con baja estimulación visceral (Bajo LiCl) tiene un incremento significativo en el consumo de sacarina comparado con el grupo Control del CAS ($p < 0.001$). Este incremento no se observó en el grupo Control, en el que tenía baja estimulación visceral con potasio (Bajo LiCl-K⁺) ni en el grupo con baja estimulación visceral con glutamato (Bajo LiCl-Glut), indicando que tanto la infusión de alto potasio como de glutamato dentro del NTS inmediatamente después de una estimulación visceral de baja concentración favorece la formación de la memoria de aversión.

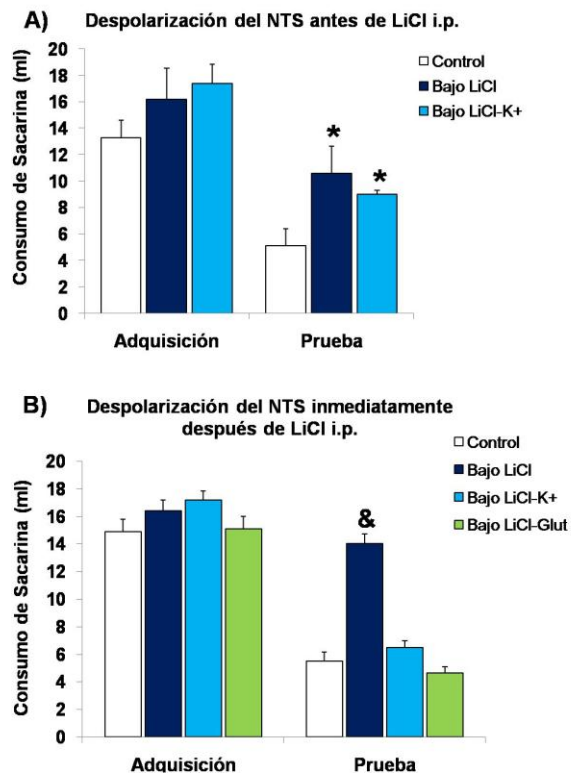


Figura 14. Consumo de sacarina durante el día de adquisición y prueba del CAS. (A) Efecto de la despolarización del NTS antes de la inyección i.p. de LiCl (* $p \leq 0.05$ vs. Control CAS) (Control; n=7, Bajo LiCl; n=5, Bajo LiCl-K⁺; n=5) (B) Efecto de la despolarización del NTS o de la infusión de glutamato inmediatamente después de la inyección i.p. de LiCl (& $p < 0.001$ vs. Control CAS) (Control; n=14, Bajo LiCl; n=17, Bajo LiCl-K⁺; n=13; Bajo LiCl-Glut; n=11).

4.4 LIBERACIÓN DE NORADRENALINA EN LA BLA POR DESPOLARIZACIÓN DEL NTS DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS.

El efecto de la estimulación química del NTS con alto potasio durante el CAS se muestra en la Figura 15. Una ANOVA de las muestras de microdiálisis mostró que no hay efecto significativo entre los grupos del consumo basal de agua y consumo de sacarina durante la adquisición del CAS (datos no mostrados). Estos resultados indican que el procedimiento de microdiálisis y la inyección en el NTS durante el CAS no tienen efecto significativo sobre la motivación o consumo de líquidos durante el condicionamiento. No obstante, se encontró una diferencia significativa entre grupos en el consumo de sacarina durante el día de prueba del CAS (expresado como % del consumo de sacarina con respecto al día de adquisición) ($F_{2,11}= 17.634$, $p < 0.05$). Así, la estimulación visceral de bajo LiCl i.p. junto con la infusión de alto potasio en el NTS (Bajo LiCl-K⁺) mejora la memoria de aversión, ya que provocó un significativo decremento en el consumo de sacarina en el día de prueba.

Los niveles de NA extracelular en la amígdala durante el día de adquisición del CAS se muestran en la Figura 15. Un ANOVA de medidas repetidas revela que no existe diferencia significativa entre grupos ($F_{2,11}=1.064$, $p > 0.05$), las diferencias significativas son entre las fracciones ($F_{2,11}= 2.576$, $P=0.006$), pero no hay significancia entre grupos por interacción de fracción, se realizó una ANOVA por cada fracción, el cual reveló diferencias significativas entre grupos en la séptima fracción ($F_{2,11}=6.307$, $P < 0.05$). Un análisis post-hoc mostró una diferencia significativa entre el grupo Control y el grupo Bajo LiCl-K⁺; así como entre Bajo LiCl y Bajo LiCl-K⁺ ($P < 0.05$).

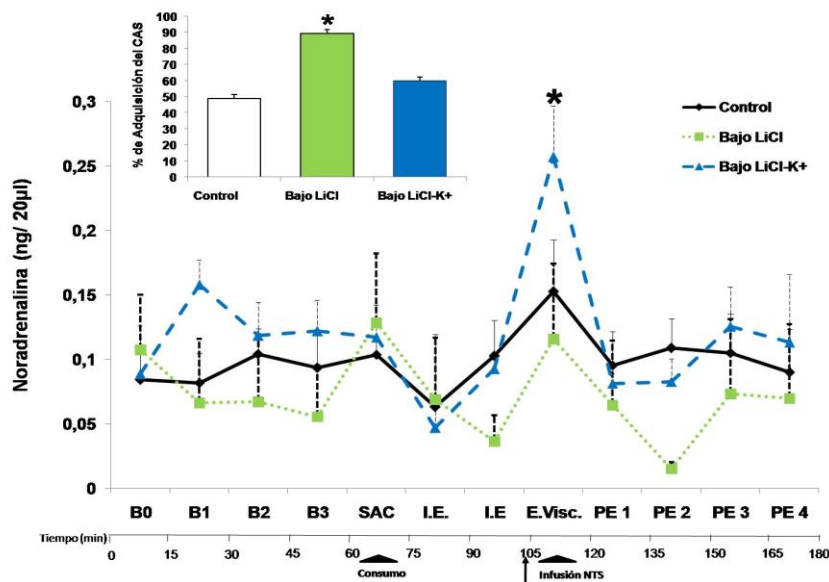


Figura 15. Cambios en los niveles de noradrenalina extracelular en la BLA después de la estimulación del NTS en el día de adquisición del CAS (* $P < 0.05$). De la B0 a la B3 se colectaron los niveles basales de la liberación de noradrenalina. Durante la fracción SAC, los animales consumieron solución de sacarina. Treinta minutos después del consumo de sacarina (F7), los animales reciben inyección de LiCl i.p. (flecha delgada) e infusiones bilaterales de potasio en el NTS de la siguiente manera: grupo Control: LiCl 0.3 M i.p. con Ringer normal en el NTS (82 mM KCl); grupo Bajo LiCl: 0.08 M de LiCl i.p. con Ringer normal en el NTS (82 mM KCl); y grupo Bajo LiCl-K⁺: 0.08 M de LiCl i.p. con Ringer alto potasio en el NTS (110 mM KCl). Después de esto, se colectaron cuatro fracciones post-estímulos (PE1-PE4) para culminar la microdiálisis. (Control, n=6; Bajo LiCl, n=4; Bajo LiCl-K⁺, n=4).

4.5 LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA BLA POR DESPOLARIZACIÓN DEL NTS DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS.

Los efectos de la despolarización con alto potasio en el NTS durante el CAS se muestran en la Figura 16. Un ANOVA mostró que no existe diferencia significativa entre los grupos en el consumo de agua con respecto al consumo de sacarina el día de la adquisición del CAS. Estos resultados indican nuevamente que el procedimiento de microdiálisis y la inyección en el NTS durante el día de adquisición no tienen un efecto significativo sobre la motivación o el consumo de líquidos durante el condicionamiento. Sin embargo, existe una diferencia significativa en el consumo de sacarina entre los grupos el día de prueba del CAS ($F_{2,12}=7.729$, $p < 0.05$): con bajo litio hay un incremento significativo en el consumo de sacarina evaluado como % de adquisición del CAS; pero el grupo de Bajo LiCl-K⁺ induce un decremento significativo en el consumo de sacarina durante el día de prueba, indicando un mejoramiento en la formación de la memoria de aversión. La

Figura 16, también muestra la liberación de glutamato en la amígdala durante la adquisición del CAS. Un ANOVA de medidas repetidas revela que no hay diferencias significativas entre grupos ($F_{2,12}= 0.210$, $p > 0.05$), ni intreraccion entre fracciones por grupo ($F_{2,12}= 0.663$, $p > 0.05$), pero si hay diferencias significativas entre las fracciones ($F_{2,12}= 2.067$, $p=0.006$). Para analizar el origen de la diferencia entre fracciones, se realizó un ANOVA por cada una de las fracciones, el cual reveló una diferencia significativa entre grupos en la séptima fracción ($F_{2,12}=3.07$, $p < 0.05$). Un análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre el grupo Bajo LiCl con respecto al Control y al Bajo LiCl-K⁺ ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la inyección i.p de baja concentración de LiCl, el cual por si solo no induce CAS, junto con la infusión de alto potasio puede inducir un CAS, pero no es capaz de inducir un cambio en la liberación de glutamato en la amígdala durante la adquisición del CAS.

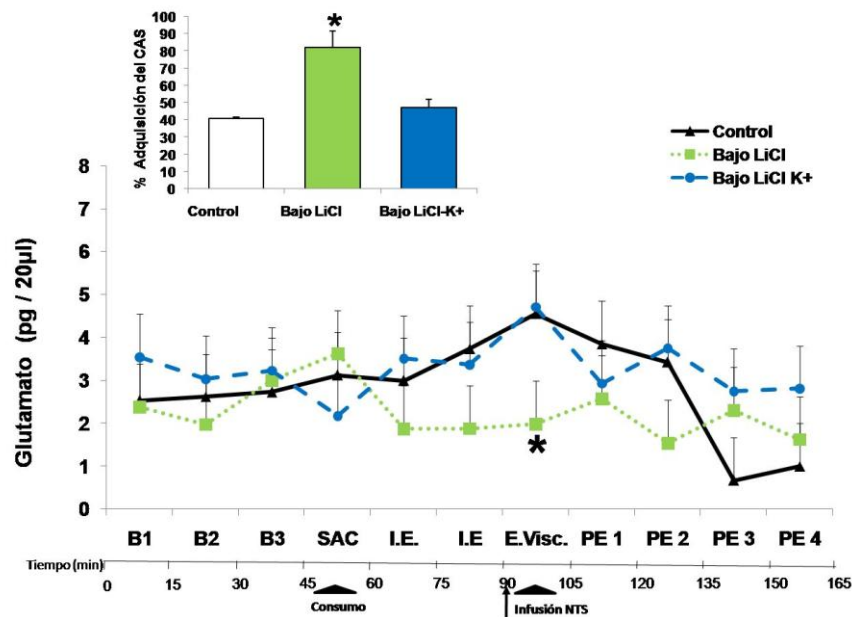


Figura 16. Cambios en la liberación de glutamato en la BLA después de la estimulación del NTS en el día de adquisición del CAS (* $P < 0.05$). De la fracción B1 a la fracción B3 se colectaron los niveles basales de de la liberación de glutamato. Durante la fracción SAC, los animales consumieron solución de sacarina. Treinta minutos después del consumo de sacarina, los animales reciben inyección de LiCl i.p. (flecha delgada) e infusiones bilaterales de potasio en el NTS de la siguiente manera: grupo Control: LiCl 0.3 M i.p. con Ringer normal en el NTS (82 mM KCl); grupo Bajo LiCl: 0.08 M de LiCl i.p. con Ringer normal en el NTS (82 mM KCl); y grupo Bajo LiCl-K⁺: 0.08 M de LiCl i.p. con Ringer alto potasio en el NTS (110 mM KCl). (Control, n=5; Bajo LiCl, n=4; Bajo LiCl-K⁺, n=6).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1 MICRODIÁLISIS EN ANIMAL ANESTESIADO

Los trabajos experimentales de esta tesis doctoral demostraron cambios en los niveles de noradrenalina en la BLA, antes y después de la estimulación química del NTS y la BLA (Figura 14). El incremento en la liberación de NA inducida por la estimulación general del NTS, como se ha descrito, confirma las proyecciones noradrenérgicas del NTS a la BLA, y también indica que una estimulación similar en NTS o en la BLA, induce aumentos comparables en los niveles de NA en la BLA.

Adicionalmente, los resultados mostraron que una estimulación directa del NTS induce un incremento del 500% en las concentraciones de NA comparado con los niveles basales, similar a los incrementos inducidos por la activación directa de las terminaciones nerviosas en la amígdala. Dado que se estimuló completamente el NTS con alto potasio, los niveles de NA liberados en la amígdala fueron mayores (aproximadamente 190% de la basal) que los reportados después de la activación periférica con adrenalina (Williams et al., 1998), así como aquellos observados en los experimentos con choque eléctrico (120-200% de la basal), seguido de una inmediata infusión de glutamato dentro del NTS, durante la replicación de un entrenamiento de la memoria (Williams and McGaugh, 1993). Además, debe resaltarse el hecho de que los presentes resultados describen la activación noradrenérgica mediada por el NTS en la BLA durante una estimulación generalizada del NTS, en animales anestesiados, por lo que la liberación de NA observada, puede considerarse “libre” de algunas variables que podrían estar implicadas durante la activación conductual en animales en libre movimiento, tales como los presentados en experimentos previos de otros laboratorios, que demuestran una correlación entre la liberación de NA en la BLA durante la formación de memoria y la liberación de NA, durante la activación de aferencias vagales y/u otras estructuras durante la conducta o el choque eléctrico (Raedt et al., Roosevelt et al., 2006). De tal forma, los resultados obtenidos demuestran que

existe un aumento importante en la liberación de NA en la amígdala después de una estimulación química y general del NTS; esta liberación fue más grande en magnitud y diferente en duración, comparada con la liberación de NA observada previamente en animales microdializados en libre movimiento, donde se implicó la estimulación vagal y la activación del NTS durante diferentes conductas (Williams et al., 1998, Clayton and Williams, 2000b, a, Williams et al., 2000, McIntyre et al., 2002, Hassert et al., 2004).

Con los datos obtenidos en la primera fase experimental, se provee una evidencia directa del nivel y duración del efecto ejercida por la activación noradrenérgica del NTS sobre la amígdala; esta evidencia confirma que el NTS tiene un papel importante en la modulación de las estructuras límbicas. Estos resultados también proporcionan información sobre la actividad neuronal del NTS y de la activación de la NA en la amígdala, la cual ejerce una función muy importante dentro de la mediación de los circuitos que participan en la neuromodulación cognitiva y fisiológica involucrada durante la formación de la memoria.

5.2 FARMACOLOGÍA y MICRODIÁLISIS EN ANIMALES EN LIBRE MOVIMIENTO

Los resultados de los experimentos de farmacología y microdiálisis en movimiento demostraron los efectos producidos durante la formación de la memoria de aversión al sabor: A) En la BLA hay un incremento de NA el cual se correlaciona con la intensidad de la memoria aversiva. B) La estimulación química del NTS, inmediatamente después del estímulo visceral de baja intensidad, mimetiza la liberación de noradrenalina en la BLA e induce un CAS robusto. C) El incremento de los niveles de glutamato en el NTS, justo después de un estímulo visceral bajo mejora el aprendizaje del CAS. D) La liberación de NA pero no la actividad de glutamato en la BLA, es modulada por el NTS durante la adquisición del CAS (Figuras 15 y 16).

Los resultados demostraron que la estimulación del NTS inmediatamente después, pero no antes de una estimulación visceral periférica de intensidad leve, que por sí sola no es suficiente de inducir un CAS significativo, mejora la

neurotransmisión noradrenérgica en la BLA y modula los procesos de almacenamiento de la memoria gustativa, generando evidencia de las interacciones de neurotransmisión entre el NTS y la amígdala durante la asociación del gusto y del estímulo visceral. Todos estos hallazgos demuestran que el estímulo visceral pero no el gustativo, desencadena la activación noradrenérgica en la BLA, el cual pudiera ser modulada por la corteza insular a través de la actividad del glutamato (Miranda et al., 2002). Acorde a evidencias previas, el NTS juega un papel importante modulando la actividad de estructuras límbicas, y la actividad noradrenérgica en estructuras corticales y límbicas, regula los procesos de formación de diferentes tipos de memoria. Por ejemplo la administración de noradrenalina o agonistas noradrenérgicos después del entrenamiento incrementan la retención de la memoria de tareas espaciales (Hatfield and McGaugh, 1999, Clayton and Williams, 2000b, Williams et al., 2000) o de memorias con un gran contenido emotivo y/o aversivo (Liang et al., 1986, Introini-Collison et al., 1991, Izquierdo et al., 1992, Liang et al., 1995, Ferry and McGaugh, 1999, Ferry et al., 1999). Aquí, se demostró que la actividad del NTS principalmente mediada por noradrenalina, modula el estímulo visceral durante el CAS, pero también que la actividad glutamatérgica en la amígdala, que no es directamente modulada por el NTS tiene un impacto durante el procesamiento del estímulo visceral, indicando que la liberación de glutamato en la BLA es mediada por otras estructuras.

Para establecer el CAS se requiere de un ensayo y depende de la integración del estímulo visceral y gustativo (Bures et al., 1998, Bermudez-Rattoni, 2004). El NTS, recibe en su región caudal un gran número de entradas viscerales de diferentes ramas del nervio vago, así como del área postrema (sensible a toxinas en el torrente sanguíneo), y del sistema vestibular (sensible a desbalances motores causantes de provocar la náusea). Las ratas con lesiones electrolíticas en el NTS no pueden distinguir estímulos sápidos; sin embargo, son capaces de establecer memorias aversivas en menor grado que los animales lesionados (Grigson et al., 1997, Shimura et al., 1997). Estudios electrofisiológicos en las neuronas del NTS demostraron una compleja actividad neural durante la

adquisición, evocación y extinción de la memoria aversiva, sugiriendo que la capacidad de la actividad neuronal en el NTS para repercutir en el comportamiento puede ser anulada por cambios en otras áreas gustativas (McCaughey et al., 1997). Por otra parte, estudios recientes de inmunohistoquímica, donde utilizan el gen de expresión temprana *fos* demostraron que, las diferentes respuestas del NTS dependen de si el estímulo es novedoso o si es asociado con procesos de aversión o extinción (Bernstein and Koh, 2007).

Investigaciones previas han demostrado que la activación del vago con epinefrina, afecta la memoria, esto por medio de fibras aferentes vagales que llegan a estructuras del cerebro medio, tales como la amígdala, que procesa información cognitiva (Radna and MacLean, 1981); esto demostrado por el hecho de que la activación de fibras vagales periféricas mejora la memoria, y esta a su vez puede ser bloqueada al lesionar la amígdala (Clark et al., 1998). Además, la activación de receptores noradrenérgicos en el NTS facilita las acciones de la epinefrina en la formación de la memoria, esta puede ser atenuada por el bloqueo de receptores β -adrenérgicos en este núcleo, sugiriendo que el aumento de memoria inducida por la epinefrina puede implicar la activación inicial del nervio vago con subsecuentes cambios en el NTS y la actividad catecolaminérgica en la amígdala (Clayton and Williams, 2000b). Esto es sustentado por la evidencia de que el bloqueo del NTS suprime el incremento de la liberación de noradrenalina en la amígdala después de inyecciones periféricas de epinefrina (Williams et al., 1998). Por otra parte, la noradrenalina modula la actividad neuronal en la amígdala (Stone et al., 1997) y la infusión de agonistas adrenérgicos dentro de la amígdala facilitan la consolidación de la memoria (Liang et al., 1986, Liang et al., 1995).

Durante el CAS los estímulos se procesan a través de las proyecciones del NTS hacia el núcleo parabraquial y otras regiones tales como la amígdala central, la BLA y la corteza insular. Se demostró que el estímulo visceral (p.e. alta dosis de LiCl 0.4M) induce un incremento significativo de glutamato en la BLA (Miranda and Bermudez-Rattoni, 1999, Miranda et al., 2002), y también un aumento menos robusto pero significativo en la corteza insular, el cual sugiere que la actividad glutamatérgica en la corteza es modulada por otras estructuras, tales como la BLA

y el NTS. Además, las inyecciones de propranolol en la BLA, después del estímulo gustativo, interrumpe la formación de la memoria de aversión al sabor (Miranda et al., 2003). Así también, inyecciones del antagonista a receptores β -adrenérgicos en la corteza insular antes de la adquisición del CAS, evita la formación de la memoria gustativa, y este bloqueo se correlaciona con el grado de inactivación de estos receptores (Miranda et al., 2008).

Los resultados de microdiálisis obtenidos en esta tesis doctoral demuestran que la actividad glutamatérgica en el NTS es capaz de modular la memoria de aversión al sabor. En conjunto, los resultados sugieren que la noradrenalina y el glutamato en la BLA son esenciales para procesar el estímulo visceral, y que las interacciones entre el NTS y la BLA podrían regular la intensidad con la cual se forma el CAS. Todos estos hallazgos concuerdan con la evidencia de que el NTS tiene una función durante la respuesta hormonal a experiencias emocionales y en la transmisión de información a estructuras límbicas, tales como la amígdala, durante la consolidación de diferentes tipos de memorias (Williams and McGaugh, 1994, Miyashita and Williams, 2003).

5.3 CONCLUSIONES GENERALES

- A. Se demostró que la estimulación general del NTS en ratas anestesiadas, sin ningún tipo de estimulación vagal o de comportamiento, induce un incremento en la liberación de noradrenalina en la amígdala, proporcionando una evidencia directa del nivel y duración del efecto en la amígdala ejercida por la activación noradrenérgica del NTS y confirmando el papel del NTS en modular la actividad de estructuras límbicas (artículo publicado ver anexo 1).
- B. Se confirmó la importancia de las proyecciones noradrenérgicas del NTS hacia la BLA para modular los procesos de almacenamiento de memoria del gusto; además se demostró que una elevación en la concentración de glutamato en el NTS mejora la memoria de aversión al sabor, apoyando evidencias previas de que el NTS tiene una importante función en la

transmisión de señales periféricas hacia sistemas cerebrales que procesan la formación de memorias emocionales.

REFERENCIAS

- Acuna-Goycolea C, Fuentealba P, Torrealba F (2000) Anatomical substrate for separate processing of ascending and descending visceral information in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res* 883:229-232.
- Afifi (1998) *Neuroanatomía funcional*: McGraw Hill Interamericana.
- Afifi AK, Bergman RA (1998) *Neuroanatomía funcional. Texto y Atlas*. (Interamericana, M.-H., ed), pp 135-136.
- Aggleton JP, Friedman DP, Mishkin M (1987) A comparison between the connections of the amygdala and hippocampus with the basal forebrain in the macaque. *Exp Brain Res* 67:556-568.
- Alheid GF, Olmos JS, Beltramino CA (1995) Amygdala and extended amygdala. In: *In the rat nervous system*(Paxinos, G., ed), pp 495-578 San Diego, California: Academic Press.
- Baddeley A (1999) *Memoria Humana. Teoría y práctica*. Madrid España.
- Bahar A, Dorfman N, Dudai Y (2004) Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* 19:1115-1118.
- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci* 17:1527-1530.
- Berman DE (2003) Modulation of taste-induced Elk-1 activation by identified neurotransmitter systems in the insular cortex of the behaving rat. *Neurobiol Learn Mem* 79:122-126.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20:7017-7023.
- Bermudez-Rattoni F (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5:209-217.
- Bermudez-Rattoni F, Grijalva CV, Kiefer SW, Garcia J (1986) Flavor-illness aversions: the role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiol Behav* 38:503-508.
- Bermudez-Rattoni F, Ramirez-Lugo L, Gutierrez R, Miranda MI (2004) Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cell Mol Neurobiol* 24:25-36.

- Bernstein IL, Koh MT (2007) Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses* 32:99-103.
- Berthoud HR, Neuhuber WL (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 85:1-17.
- Bower GH (1981) Mood and memory. *Am Psychol* 36:129-148.
- Braitenberg V, Schuz A (1998) *Cortex: Statistic and Geometry of Neuronal Connectivity*. Berlin: Springer.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 338:255-278.
- Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T (1998) *Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind*: Oxford University Press.
- Clark KB, Smith DC, Hassert DL, Browning RA, Naritoku DK, Jensen RA (1998) Posttraining electrical stimulation of vagal afferents with concomitant vagal efferent inactivation enhances memory storage processes in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 70:364-373.
- Clayton EC, Williams CL (2000a) Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 112:151-158.
- Clayton EC, Williams CL (2000b) Noradrenergic receptor blockade of the NTS attenuates the mnemonic effects of epinephrine in an appetitive light-dark discrimination learning task. *Neurobiol Learn Mem* 74:135-145.
- Coil JD, Rogers RC, Garcia J, Novin D (1978) Conditioned taste aversions: vagal and circulatory mediation of the toxic unconditioned stimulus. *Behav Biol* 24:509-519.
- Dudai (1989) *The neurobiology of memory. Concepts, finds, trends*. New York: Oxford University Press.
- Dudai (2002a) *Memory from A to Z*. New York: Oxford University Press.
- Dudai Y (2002b) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12:211-216.
- Dunn LT, Everitt BJ (1988) Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav Neurosci* 102:3-23.

- Fallon JH, Koziell DA, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 180:509-532.
- Feduchi E, Blasco C, Romero CS, Yañez E (2010) *Bioquímica Conceptos esenciales*. pp 283-288 Madrid España: Medica Panamericana.
- Ferreira G, Ferry B, Meurisse M, Levy F (2006) Forebrain structures specifically activated by conditioned taste aversion. *Behav Neurosci* 120:952-962.
- Ferreira G, Miranda MI, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F (2005) Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci* 22:2596-2604.
- Ferry B, McGaugh JL (1999) Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 72:8-12.
- Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999) Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J Neurosci* 19:5119-5123.
- Florin-Lechner SM, Druhan JP, Aston-Jones G, Valentino RJ (1996) Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res* 742:89-97.
- Fresquet N, Yamamoto J, Sandner G (2003) Frontal lesions do not alter the differential extinction of taste aversion conditioning in rats, when using two methods of sucrose delivery. *Behav Brain Res* 141:25-34.
- Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K (2011) Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Frontiers in behavioral neuroscience* 5:87.
- Gallo M, Roldan G, Bures J (1992) Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* 52:91-97.
- Garcia J, Kimeldorf DJ, Koelling RA (1955) Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122:157-158.
- Georgopoulos AP, Kettner RE, Schwartz AB (1988) Primate motor cortex and free arm movements to visual targets in three-dimensional space. II. Coding of the direction of movement by a neuronal population. *J Neurosci* 8:2928-2937.

- Grigson PS, Shimura T, Norgren R (1997) Brainstem lesions and gustatory function: III. The role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats. *Behav Neurosci* 111:180-187.
- Groves DA, Bowman EM, Brown VJ (2005) Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci Lett* 379:174-179.
- Gu Y, Gonzalez MF, Chin DY, Deutsch JA (1993) Expression of c-fos in brain subcortical structures in response to nauseant lithium chloride and osmotic pressure in rats. *Neurosci Lett* 157:49-52.
- Hamilton RB, Norgren R (1984) Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222:560-577.
- Hassert DL, Miyashita T, Williams CL (2004) The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 118:79-88.
- Hatfield T, McGaugh JL (1999) Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol Learn Mem* 71:232-239.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293:540-580.
- Herbert H, Saper CB (1992) Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *J Comp Neurol* 315:34-52.
- Hernadi I, Karadi Z, Vigh J, Petyko Z, Egyed R, Berta B, Lenard L (2000) Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res Bull* 53:751-758.
- Hirsh R (1974) The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol* 12:421-444.
- Horn CC, Friedman MI (2005) Thoracic cross-over pathways of the rat vagal trunks. *Brain Res* 1060:153-161.
- Houpt TA, Berlin R, Smith GP (1997) Subdiaphragmatic vagotomy does not attenuate c-Fos induction in the nucleus of the solitary tract after conditioned taste aversion expression. *Brain Res* 747:85-91.

- Introini-Collison IB, Miyazaki B, McGaugh JL (1991) Involvement of the amygdala in the memory-enhancing effects of clenbuterol. *Psychopharmacology (Berl)* 104:541-544.**
- Iversen SD (1998) The pharmacology of memory. *C R Acad Sci III* 321:209-215.**
- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58:16-26.**
- Kelley AE, Domesick VB (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7:2321-2335.**
- Koh MT, Clarke SN, Spray KJ, Thiele TE, Bernstein IL (2003a) Conditioned taste aversion memory and c-Fos induction are disrupted in RIIbeta-protein kinase A mutant mice. *Behav Brain Res* 143:57-63.**
- Koh MT, Wilkins EE, Bernstein IL (2003b) Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci* 117:1416-1422.**
- Kwon B, Goltz M, Houpt TA (2008) Expression of AP-1 family transcription factors in the amygdala during conditioned taste aversion learning: role for Fra-2. *Brain Res* 1207:128-141.**
- Lamprecht R, Dudai Y (1995) Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl. *Neuroreport* 7:289-293.**
- Lamprecht R, Dudai Y (2000) The amygdala in conditioned taste aversion: It's there, but where. In: *The amygdala* (Aggleton, J. P., ed), pp 331-351 Oxford: University Press.**
- LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23:727-738.**
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.**
- Liang KC, Chen LL, Huang TE (1995) The role of amygdala norepinephrine in memory formation: involvement in the memory enhancing effect of peripheral epinephrine. *Chin J Physiol* 38:81-91.**
- Liang KC, Juler RG, McGaugh JL (1986) Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res* 368:125-133.**
- Lopez-Velazquez L, Aguirre E, Paredes RG (2007) Kindling increases aversion to saccharin in taste aversion learning. *Neuroscience* 144:808-814.**

- McCaughey SA, Giza BK, Nolan LJ, Scott TR (1997) Extinction of a conditioned taste aversion in rats: II. Neural effects in the nucleus of the solitary tract. *Physiol Behav* 61:373-379.
- McGaugh JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25:456.
- McGaugh JL, (1969) *Learning and Memory*. San Francisco: World Scientific.
- McIntyre CK, Hatfield T, McGaugh JL (2002) Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur J Neurosci* 16:1223-1226.
- McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B, McGaugh JL (2003) Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci* 985:273-293.
- Miranda MI, Bermudez-Rattoni F (1999) Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6478-6482.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11417-11422.
- Miranda MI, LaLumiere RT, Buen TV, Bermudez-Rattoni F, McGaugh JL (2003) Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *Eur J Neurosci* 18:2605-2610.
- Miranda MI, Rodriguez-Garcia G, Reyes-Lopez JV, Ferry B, Ferreira G (2008) Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiol Learn Mem* 90:54-61.
- Miyashita T, Williams CL (2002) Glutamatergic transmission in the nucleus of the solitary tract modulates memory through influences on amygdala noradrenergic systems. *Behav Neurosci* 116:13-21.
- Miyashita T, Williams CL (2003) Enhancement of noradrenergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract modulates memory storage processes. *Brain Res* 987:164-175.
- Naritoku DK, Terry WJ, Helfert RH (1995) Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* 22:53-62.
- Núñez-Jaramillo L, Ramirez-Lugo L, Herrera-Morales W, Miranda MI (2010) Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav Brain Res* 207:232-248.

- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California, USA: Academic Press.
- Pikonen A (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The amygdala* (Aggleton, J. P., ed), pp 31-115 Oxford: University Press.
- Prado-Alcala RA (2001) *Memoria, dónde reside y cómo se forma*. México Trillas.
- Price JL, Russisken FT, Amaral DG (1987) The limbic region II: The amygdaloid complex. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Hokfelt, B. T. and Swanson, L. W., eds), pp 279-381 Amsterdam: Elsevier.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick JS, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM (2004) *Invitación a la Neurociencia*. In: Sinauer Associates Massachusetts, U.S.A: Ed. Panamericana.
- Radna RJ, MacLean PD (1981) Vagal elicitation of respiratory-type and other unit responses in basal limbic structures of squirrel monkeys. *Brain Res* 213:45-61.
- Raedt R, Clinckers R, Mollet L, Vonck K, El Tahry R, Wyckhuys T, De Herdt V, Carrette E, Wadman W, Michotte Y, Smolders I, Boon P, Meurs A Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *J Neurochem* 117:461-469.
- Rescorla RA (1996) Preservation of pavlovian association through extinction. *J Exp Psychol* 49B:245-258.
- Reyes-Lopez J, Nunez-Jaramillo L, Moran-Guel E, Miranda MI (2010) Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in the medial prefrontal cortex during aversive and incidental taste memory formation. *Neuroscience* 169:195-202.
- Rinaman L (2010) Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res* 1350:18-34.
- Rogers RC, Fryman DL (1988) Direct connections between the central nucleus of the amygdala and the nucleus of the solitary tract: an electrophysiological study in the rat. *J Auton Nerv Syst* 22:83-87.
- Roldan G, Bures J (1994) Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* 65:213-219.

- Roosevelt RW, Smith DC, Clough RW, Jensen RA, Browning RA (2006) Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Res* 1119:124-132.
- Rosas JM, Bouton ME (1996) Spontaneous recovery after extinction of a conditioned taste aversion. *Anim Learn Behav* 24:341-348.
- Ross CA, Ruggiero DA, Reis DJ (1985) Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 242:511-534.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- Saper CB (1995) Central autonomic system In: *The Rat Nervous Systems*(Paxinos, G., ed), pp 107-135 San Diego: Academic Press Inc.
- Schafe GE, Sollars SI, Bernstein IL (1995) The CS-US interval and taste aversion learning: a brief look. *Behav Neurosci* 109:799-802.
- Sewards TV, Sewards MA (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* 25:395-407.
- Shimura T, Norgren R, Grigson PS, Norgren R (1997) Brainstem lesions and gustatory function: I. The role of the nucleus of the solitary tract during a brief intake test in rats. *Behav Neurosci* 111:155-168.
- Shimura T, Suzuki M, Yamamoto T (1995) Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Res* 679:221-226.
- Siegel G, Alberts RW, Brady S, Price D (2006) *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.*: Academic Press.
- Spray KJ, Bernstein IL (2004) Afferent and efferent connections of the parvocellular subdivision of iNTS: defining a circuit involved in taste aversion learning. *Behav Brain Res* 154:85-97.
- Squire (2000) *Memory from mind to molecules.* New York.
- Squire LR (1987) The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* 21-22:218-222.
- St Andre J, Albanos K, Reilly S (2007) C-fos expression in the rat brain following lithium chloride-induced illness. *Brain Res* 1135:122-128.

- Stone EA, Zhang Y, Hiller JM, Simon EJ, Hillman DE (1997) Activation of fos in mouse amygdala by local infusion of norepinephrine or atipamezole. *Brain Res* 778:1-5.
- Sweatt JD (2003) Rodent Behavioral Learning and Memory Models. In: *Mechanisms of memory*(Sweatt, J. D., ed), pp 29-59 San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31:785-797.
- Thompson RF (2005) In search of memory traces. *Annu Rev Psychol* 56:1-23.
- Touzani K, Sclafani A (2002) Lateral hypothalamic lesions impair flavour-nutrient and flavour-toxin trace learning in rats. *Eur J Neurosci* 16:2425-2433.
- Van Bockstaele EJ, Peoples J, Telegan P (1999) Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* 412:410-428.
- Vanderwolf CH, Cain DP (1994) The behavioral neurobiology of learning and memory: a conceptual reorientation. *Brain Res Brain Res Rev* 19:264-297.
- Von Bohlen O, Dermietzel HR (2002) Neurotransmitters and Neuromodulators. In: *Handbook of receptor and biological effects*(Wiley-VCH, ed), pp 74-106 Heidelberg Germany.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE (2000) The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci* 20:7059-7066.
- Williams CL, McGaugh JL (1993) Reversible lesions of the nucleus of the solitary tract attenuate the memory-modulating effects of posttraining epinephrine. *Behav Neurosci* 107:955-962.
- Williams CL, McGaugh JL (1994) Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 654:251-256.
- Williams CL, Men D, Clayton EC (2000) The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. *Behav Neurosci* 114:1131-1144.

- Williams CL, Men D, Clayton EC, Gold PE (1998) Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. Behav Neurosci 112:1414-1422.**
- Wright CI, Groenewegen HJ (1996) Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. Neuroscience 73:359-373.**
- Yamamoto T, Sako N, Sakai N, Iwafune A (1997) Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. Neurosci Lett 226:127-130.**
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. Behav Brain Res 65:123-137.**
- Yasoshima Y, Morimoto T, Yamamoto T (2000) Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. Brain Res 869:15-24.**
- Yasoshima Y, Yamamoto T (1997) Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. Neuroreport 8:1363-1367.**
- Yasui Y, Breder CD, Saper CB, Cechetto DF (1991) Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. J Comp Neurol 303:355-374.**

ANEXO 1

ANEXO 2



Short Communication

Nucleus of the solitary tract chemical stimulation induces extracellular norepinephrine release in the lateral and basolateral amygdala

Nadia Edith García-Medina, María Isabel Miranda*

Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla No. 3001, Juriquilla, Querétaro, Qro. 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2011
 Received in revised form
 22 February 2012
 Accepted 28 March 2012
 Available online xxx

Keywords:

Noradrenaline
 Nucleus of solitary tract
 Neurotransmitter release
 Microdialysis

ABSTRACT

The NTS catecholaminergic neurons, activated by a variety of afferent stimuli, are ideally situated to coordinate afferent signaling to multiple brain regions. In particular, there is evidence that systemic epinephrine injections induce a significant increase of norepinephrine (NE) in the amygdala during enhanced memory, which can be disrupted by NTS chemical blockade or interruption of vagal afferents. The present experiment was conducted to obtain information about the levels of NE release induced by activation of the whole NTS, which projects to the lateral and basolateral amygdala. Therefore, we compared NE levels before and after general stimulation of the NTS and the amygdala in anesthetized rats, without any behavioral or vagal stimulation, to find out the degree of noradrenergic activation modulated by the NTS through all its projections to the lateral and basolateral amygdala, as well as the degree of noradrenergic activation which may occur locally in the amygdala through rapid and general activation of this structure.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The nucleus of the solitary tract (NTS) is the first relay and the major interface between sensory visceral afferents and the central nervous system; accordingly, the majority of vagal afferents project to the NTS, and these projections influence many homeostatic functions, including the cardiovascular reflex, food intake, stress, and cognitive processes [1–4]. The NTS catecholaminergic neurons, activated by a variety of afferent stimuli, are ideally situated to coordinate afferent signaling to multiple brain regions [5–7], including the hippocampus, hypothalamus, amygdala, nucleus accumbens, and dorsal motor nucleus of the vagus. The NTS and the basolateral amygdala (BLA) are highly and functionally connected; electrophysiological studies demonstrated that the firing interval in the amygdala neurons increases significantly after electrical stimulation of NTS neurons [8,9]. In particular, there is evidence that systemic epinephrine injections induce a significant increase of norepinephrine (NE) in the amygdala during enhanced memory, which can be disrupted by NTS chemical blockade [10]. Furthermore, vagal nerve stimulation improves cognitive processing and induces increases of NE release in the BLA [11]. Interestingly, some

findings indicate that NTS neurons also project directly to the locus coeruleus (LC) [12,13], a structure that provides the major source of NE innervations to the BLA as well as to several other structures [14,15]. Thus, vagal activation or direct stimulation of the NTS may initiate NE release in the amygdala, either by direct NTS action on the BLA [16] or via polysynaptic pathway involving the LC [14].

The present experiment was conducted to obtain information about the levels of NE release induced by activation of the NTS, which projects to the lateral and basolateral amygdala [16]. Therefore, we compared NE levels before and after general stimulation of the whole NTS and the amygdala to find out the degree of noradrenergic activation modulated by the NTS through all its projections to the lateral and basolateral amygdala, as well as the degree of noradrenergic activation which may occur locally in the amygdala through rapid and general activation of this structure.

Twelve male Sprague–Dawley rats (Instituto de Neurobiología breeding colony, weighing 250–300 g) were individually housed with access to food and water and maintained at 23 °C in an inverted 12-h/12-h dark–light cycle. All experimental procedures were performed during the dark phase and were in compliance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and Rules in Health Matters (Ministry of Health, México). During the microdialysis experiment, rats were deeply anaesthetized with urethane (1.0 ml/kg i.p) and, using standard stereotaxic procedures, a stainless steel injector was placed unilaterally, in left NTS (AP = –13.3 mm, L = +1.0 mm, V = –7.6 mm from bregma); also,

This research was supported by DGAPA-PAPIIT IN201308, IN209911, and CONACyT 54524; CONACyT 152208.

* Corresponding author. Fax: +52 55 56234046.

E-mail address: mirandami@unam.mx (M.I. Miranda).

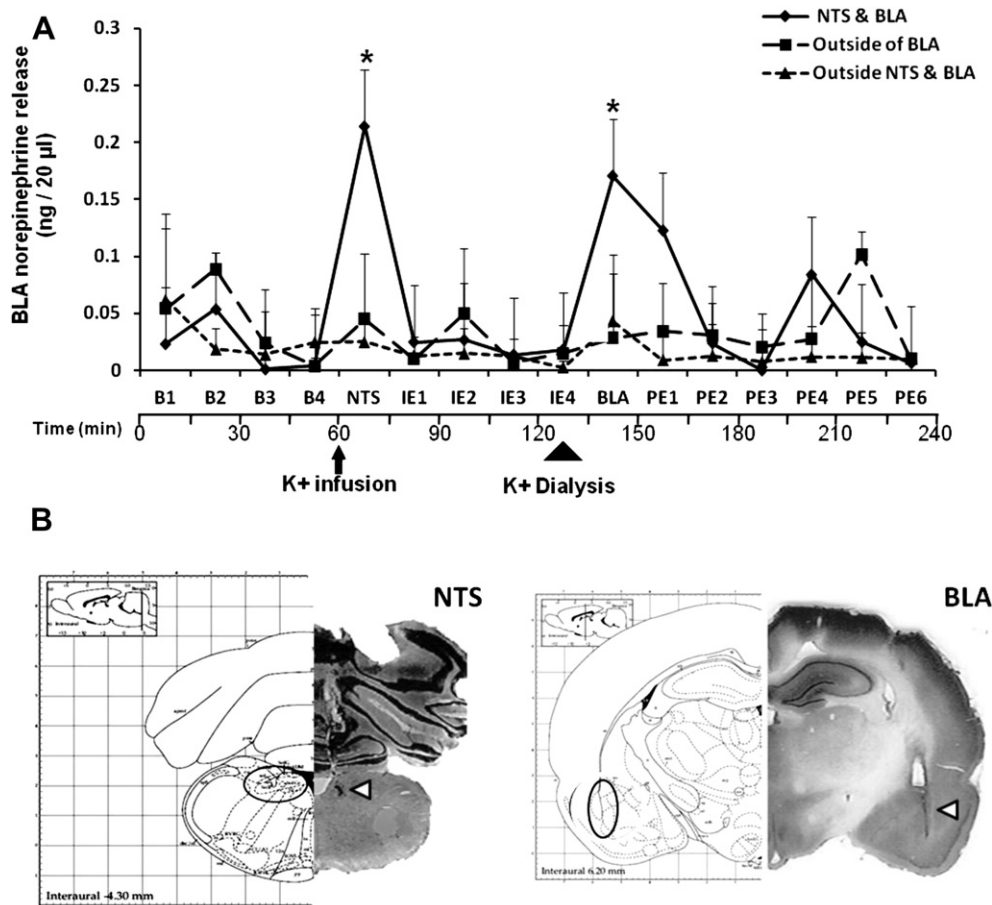


Figure 1. A) Changes in the release of NE in the BLA after stimulation of the NTS (thin arrow) or direct chemical stimulation of the BLA (wide arrow) with high potassium ($n = 6$; $^*P \leq 0.05$). Release observed in animals with misplaced location of lateral or basolateral microdialysis probe (Square-dotted line) ($n = 4$, $P > 0.05$); release observed in animals with misplaced location of NTS injector and lateral and basolateral amygdala probe (triangle-dotted line) ($n = 6$, $P > 0.05$). B) Diagrams and representative photomicrographs illustrating the placement (arrowheads) of the injector and microdialysis probe in the NTS and BLA. The circles on the diagrams represent approximately the areas considered to be correct for injector and microdialysis probe localization.

a microdialysis probe (BAS, West Lafayette, IN) was placed ipsilateral in the left BLA (AP = -2.8 , L = ± 5.0 mm, V = -8.5 mm from bregma) according to the atlas of Paxinos and Watson [17]. The microdialysis was started after the injector and microdialysis probe had been inserted. The probe in the BLA was continuously perfused with Ringer solution (4.7 mM KCl, 2 μ l/min); the first 60-min sample was discarded, and then 16 samples were collected at 15-min intervals in 300- μ l Eppendorf tubes containing 5 μ l 0.1 M HClO₄, to prevent NE oxidation; 3,4-Dihydroxybenzylamine (DHBA) dissolved in the HClO₄, was used as internal standard. The initial four samples were considered baseline release (B1–B4); during sample five collection, high potassium Ringer solution was infused (110 mM KCl, 1.5 μ l/min) by the micro-injectors in the NTS. Four additional inter-stimulus samples (IE1–IE4) were collected over 60 min. During sample 10 collection, high potassium Ringer solution (110 mM KCl, depolarizing compound), instead of regular Ringer (4.7 mM KCl), was infused via the microdialysis probe into the BLA at the same rate (2.0 μ l/min) for 15 min. Six additional post-stimulus samples (PE1–PE6) were collected with normal Ringer to evaluate the effects on NE release. Samples were immediately frozen at -80 °C for further analysis. The NE levels in the dialysis samples (30 μ l) were analyzed by reverse-phase liquid chromatography with electrochemical detection (BAS CC-5E) using an HPLC system (BAS PM-80) with a 3- μ m phase II ODS column (BAS) and a mobile phase consisting of 15 ml of HPLC grade acetonitrile containing 190 mg disodium EDTA, 230 mg octyl sodium sulfate,

and 7.08 g chloroacetic acid adjusted to pH 3.0. The data obtained (expressed as ng/20 μ l sample) were analyzed using the general linear models procedure of SAS (2008), and LSMEANS multiple comparison tests were used to obtain and analyze treatment methods. Results with $P \leq 0.05$ were considered significant. At the end of microdialysis experiments, rats were overdosed with sodium pentobarbital and intracardially perfused with 0.9% saline. Brains were removed from skulls and stored in 4% paraformaldehyde solution for 24 h at 4 °C. The brains were then immersed in a 30% sucrose solution at 4 °C, frozen at -40 °C, and cut in a microtome (Leica) to obtain coronal slices (50 μ m thick). After staining with cresyl violet, the slices were examined under a light microscope to determine the needle tip injection and probe tip locations in the NTS or BLA, respectively, according to the atlas of Paxinos and Watson [17]. Only six animals out of a total of sixteen, in which the probe tip was inside the BLA boundaries, and which had very similar anterior and posterior brain coordinates as well as similar and precise bilateral injector localization in the NTS, were considered as correct data in the present results (see representative pictures in Fig. 1B). As can be seen in Fig. 1B, the correct target area for the NTS injectors includes all NTS sub-regions (gelatinous, lateral and medial). However, tests made with pontamine blue stain (data not shown) indicated a minimal diffusion into nearby areas such as the hypoglossal nucleus, of the nucleus parasolitary and of the “Probst’s bundle”. The target area of the amygdala that was included in the data was limited to the anterior, posterior, and

ventral regions of the lateral nucleus and basal nucleus of the amygdaloid complex. Nevertheless, it is not possible to ensure that the dialysis measurements are specific for just one subnucleus of the lateral or basolateral amygdaloid nuclei, since the diameter (2 mm) of the microdialysis probe was longer than BLA diameter given in the Paxinos and Watson Atlas [17].

Fig. 1 illustrates the changes in NE levels (ng/20 μ l sample) in the BLA before and after NTS or BLA chemical stimulation. Direct NTS depolarization induced a significant increase of NE release (539%) in the BLA compared with the initial basal levels of NE (B1–B4); the increase of NE release was observed only in the sample collected immediately after stimulation, indicating an acute and rapid effect of NTS stimulation on NE release in the BLA. A similar significant increase in NE release (500%) was also detected in the BLA after direct amygdala stimulation. In the amygdala of animals with incorrect cannula tip localization (for example, in the nucleus parvocellular reticular or hypoglossal nucleus), NE levels did not significantly change after chemical stimulation, indicating that NE release is induced specifically by stimulating the NTS area and its projections. Additionally, when the microdialysis probe was misplaced in areas outside of the lateral and basolateral amygdala (for example, in the piriform cortex, nucleus dorsal endopiriform, caudate putamen, or amygdalostriatal transition area) there was no significant change in NE levels after NTS chemical stimulation (Fig. 1, see dotted lines).

The increased NE release induced by general NTS stimulation, as described here, confirms the important noradrenergic NTS projections to the BLA and also indicates that similar chemical stimulation, either in the NTS or in the BLA, induced comparable increases in NE levels in the BLA. The present findings are consistent with recent studies, using transgenic mice expressing an enhanced green fluorescent protein under the control of the tyrosine hydroxylase promoter, which showed that NTS catecholaminergic neurons received direct vagal tract inputs [18]. Moreover, the current results are in agreement with previous neurochemical and behavioral findings, which illustrate the vagal afferents to the NTS or also NTS projections to the BLA, and demonstrated that electrical stimulation of the vagus increases extracellular neurotransmitter release in the NTS [19], and that glutamatergic transmission in the nucleus of the solitary tract modulates memory through influences on amygdala noradrenergic systems [20]. Therefore, the activation of these noradrenergic projections has been described as part of the mechanism that permits the transmission of neural signals by the vagus, to influence limbic structures, such as the hippocampus and amygdala that modulate several functions. Previous behavioral evidence has indicated that NTS neurons play an important role in transmitting information from the periphery to limbic structures following emotional arousal. For example, it has been demonstrated that systemic administration of epinephrine produces a significant elevation in NE concentrations in the amygdala; however, this increase in NE is blocked by inactivation of the NTS [10]. The present findings show that the direct and complete activation of the NTS induces a 500% increase in the NE concentration compared to basal levels, similar to the NE increases induced by direct activation of the nerve endings in the amygdala. As expected, given that the complete NTS was stimulated with high potassium, the levels of NE release in the amygdala are greater than those (approximately 190% of basal) reported after the peripheral activation with epinephrine [10] as well as those observed (120–200% of basal) in experiments with footshock followed immediately by intra-NTS infusion of glutamate during replication of a memory training [21]. Furthermore, the present results describe the noradrenergic activation mediated by the NTS in the amygdala during a robust stimulation; since animals were anaesthetized, the NE release observed was independent of some variables which might be involved during behavioral activation, such as those present in

previous experiments that demonstrated a correlation between the NE release in the BLA during memory formation and the NE release involved in the activation of vagal afferents and/or of other structures during behavior or footshock [6,22]. Accordingly, the data presented here should be compared carefully with previous results obtained in awake freely moving animals, since the anesthetized preparation allows only to evaluate and dissect the more specific and reduced, stimulation effect of one structure like NTS, that is involved in complex interactions during awake animal behavior.

Furthermore, the NE input in the amygdala could be explained not only by direct actions of the NTS projections to the BLA, but also by actions via polysynaptic pathway involving the LC [14,23–25], since NTS projections to the LC have been described [11,12]. However, the present results showed that NTS stimulation did not induce a significant NE increase in piriform cortex and other closer structures that also receive LC projections, suggesting that NTS stimulation produces the NE release in the amygdala mainly by direct NTS catecholamine connections to the amygdala. Accordingly, these results could also indirectly suggest the absence of LC participation in the NE release observed in the amygdala by NTS stimulation. Nonetheless, it is important to mention that due to the slow time lapse of microdialysis, other NTS neurons, not only catecholaminergic, could also be mediating the NE release in the amygdala by activation of polysynaptic circuits. Further studies are needed to directly confirm this hypothesis.

Here, we demonstrate a major increase in NE release in the amygdala after a general NTS chemical stimulation; this release was larger in magnitude and different duration, to the NE release observed previously by free-moving microdialysis, which involved vagal stimulation or activation in the NTS during different behaviors [10,11,26–28].

In conclusion, our data provide direct evidence of the level and duration of the effect on the amygdala exerted by noradrenergic activation of the NTS; this evidence confirms that the NTS has a significant role in modulating limbic structures. The present results also provide further information about NTS cell activity and the source of NE input in the amygdala, which are important for understanding the circuits that mediate cognitive and physiological neuromodulation involved during memory formation.

Acknowledgments

We thank Ofelia Mora for her helpful insight on statistical analysis, Mireya Romero and Angela Vera for technical assistance, Dr. Dorothy Pless, and Shaun Harris for the English revision.

References

- [1] Altschuler SM, Bao XM, Bieger D, Hopkins DA, Miselis RR. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J Comp Neurol* 1989;283(2): 248–68.
- [2] Andresen MC, Kunze DL. Nucleus tractus solitarius—gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol* 1994;56:93–116.
- [3] Ciriello J. Brainstem projections of aortic baroreceptor afferent fibers in the rat. *Neurosci Lett* 1983;36(1):37–42.
- [4] Clark KB, Krahl SE, Smith DC, Jensen RA. Post-training unilateral vagal stimulation enhances retention performance in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 1995;63(3):213–6.
- [5] Clark KB, Smith DC, Hassert DL, Browning RA, Naritoku DK, Jensen RA. Post-training electrical stimulation of vagal afferents with concomitant vagal efferent inactivation enhances memory storage processes in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 1998;70(3):364–73.
- [6] Roosevelt RW, Smith DC, Clough RW, Jensen RA, Browning RA. Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Res* 2006;1119(1):124–32.
- [7] Zhao R, Chen H, Sharp BM. Nicotine-induced norepinephrine release in hypothalamic paraventricular nucleus and amygdala is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the nucleus tractus solitarius. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(2):837–44.

- [8] Radna RJ, MacLean PD. Vagal elicitation of respiratory-type and other unit responses in basal limbic structures of squirrel monkeys. *Brain Res* 1981; 213(1):45–61.
- [9] Rogers RC, Fryman DL. Direct connections between the central nucleus of the amygdala and the nucleus of the solitary tract: an electrophysiological study in the rat. *J Auton Nerv Syst* 1988;22(1):83–7.
- [10] Williams CL, Men D, Clayton EC, Gold PE. Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. *Behav Neurosci* 1998;112(6):1414–22.
- [11] Hassert DL, Miyashita T, Williams CL. The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 2004;118(1):79–88.
- [12] Groves DA, Bowman EM, Brown VJ. Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci Lett* 2005;379(3):174–9.
- [13] Van Bockstaele EJ, Peoples J, Telegan P. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* 1999;412(3):410–28.
- [14] Fallon JH, Koziell DA, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 1978;180(3):509–32.
- [15] Florin-Lechner SM, Druhan JP, Aston-Jones G, Valentino RJ. Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res* 1996;742(1e2):89–97.
- [16] Zardetto-Smith AM, Gray TS. Organization of peptidergic and catecholaminergic efferents from the nucleus of the solitary tract to the rat amygdala. *Brain Res Bull* 1990;25(6):875–87.
- [17] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th Edn. San Diego: Academic Press; 1998.
- [18] Appleyard SM, Marks D, Kobayashi K, Okano H, Low MJ, Andresen MC. Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J Neurosci* 2007;27(48):13292–302.
- [19] Allchin RE, Batten TF, McWilliam PN, Vaughan PF. Electrical stimulation of the vagus increases extracellular glutamate recovered from the nucleus tractus solitarius of the cat by in vivo microdialysis. *Exp Physiol* 1994;79(2): 265–8.
- [20] Miyashita T, Williams CL. Glutamatergic transmission in the nucleus of the solitary tract modulates memory through influences on amygdala noradrenergic systems. *Behav Neurosci* 2002;116(1):13–21.
- [21] Williams CL, McGaugh JL. Reversible lesions of the nucleus of the solitary tract attenuate the memory-modulating effects of posttraining epinephrine. *Behav Neurosci* 1993;107(6):955–62.
- [22] Raedt R, Clinckers R, Mollet L, Vonck K, El Tahry R, Wyckhuys T, et al. Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *J Neurochem*. 117(3): p.461–9.
- [23] Gieroba ZJ, Blessing WW. Fos-containing neurons in medulla and pons after unilateral stimulation of the afferent abdominal vagus in conscious rabbits. *Neuroscience* 1994;59(4):851–8.
- [24] Sara SJ, Devauges V. Priming stimulation of locus coeruleus facilitates memory retrieval in the rat. *Brain Res* 1988;438(1–2):299–303.
- [25] Segal M, Markram H, Richter-Levin G. Actions of norepinephrine in the rat hippocampus. *Prog Brain Res* 1991;88:323–30.
- [26] Clayton EC, Williams CL. Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 2000;112(1–2):151–8.
- [27] McIntyre CK, Hatfield T, McGaugh JL. Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur J Neurosci* 2002;16(7):1223–6.
- [28] Williams CL, Men D, Clayton EC. The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. *Behav Neurosci* 2000;114(6): 1131–44.

Elsevier Editorial System(tm) for Neurobiology of Learning and Memory
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Nucleus of solitary tract stimulation increases noradrenergic neurotransmission in the basolateral amygdala and enhances visceral aversive stimulus during conditioned taste aversion

Article Type: Regular Article

Keywords: Taste learning, glutamate, solitary nucleus tract, basolateral amygdala, aversive stimulus, aversive memory.

Corresponding Author: Dr Maria-Isabel Miranda, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto de Neurobiología

First Author: Nadia E Garcia-Medina

Order of Authors: Nadia E Garcia-Medina; Gabriela A Vera; Maria-Isabel Miranda, PhD

Abstract: Taste memory depends on motivational and post-ingestional consequences after a single taste-illness pairing. During conditioned taste aversion (CTA), the taste and visceral pathways reach the nucleus of the solitary tract (NTS), which is the first relay in the CNS and has a vital function in receiving chemical stimuli and peripheral signals related to vagal stimulation. The specific aim of the present set of experiments was to determine if the NTS is involved in noradrenergic and glutamatergic activation of the basolateral amygdala (BLA) during CTA. Using *in vivo* microdialysis, we examined whether chemical NTS stimulation induces norepinephrine (NE) and/or glutamate changes in the BLA during visceral stimulation with intraperitoneal (i.p) injections of low (0.08 M) and high (0.3 M) concentrations of lithium chloride (LiCl) during CTA training. The results showed that CTA can be elicited by chemical NTS stimulation (Ringer's high potassium solution; 110 mM KCl) and by intra-NTS microinjections of glutamate, immediately after low LiCl i.p. injections. Visceral stimulation (i.p. LiCl) induced a significant increase in NE release and a modest glutamate release in the amygdala; these effects can also be elicited by intra NTS chemical stimulation just after a weak visceral stimulation. In contrast, chemical NTS stimulation before low LiCl i.p. injections did not have any effect on the acquisition of CTA. These results indicate that the NTS mainly mediates the visceral stimulus processing by releasing NE in the BLA, but not by directly modulating glutamate release in the BLA during CTA acquisition, supporting previous evidence that the NTS has an important function in the transmission of signals from the periphery to brain systems that process aversive memory formation.

Suggested Reviewers: Cedric L Williams

Professor, Psychology
clw3b@virginia.edu

Relationship between emotionally arousing events and their capacity to modulate brain systems that encode new experiences into memory

Paul Gold

Distinguished Professor of Biology
pegold@syr.edu

Aging, Cell Signaling and Communication, Learning, Memory, and Plasticity, Neurological and Psychiatric Conditions

Ilene Bernstein
ileneb@u.washington.edu
Behavioral Neuroscience, Mechanisms Affecting Learning, Motivation & Taste Preference

Christa McIntyre
Assistant Professor
christa.mcintyre@utdallas.edu



July 17, 2013

Editor-in-Chief of Neurobiology of Learning and Memory

Dear Dr. T. Abel:

We would like to submit the enclosed paper "*Nucleus of solitary tract stimulation increases noradrenergic neurotransmission in the basolateral amygdala and enhances visceral aversive stimulus during conditioned taste aversion*" for publication as a research regular article in the journal Neurobiology of Learning and Memory.

In this study, we provide evidence of the neurotransmission interactions between the nucleus of solitary tract (NTS) and amygdala during taste and visceral stimuli association, showing that NTS stimulations immediately after, but not before, a mild visceral periphery stimulation that is not by itself enough to induce a significant conditioned taste aversion (CTA), are able to enhance noradrenergic neurotransmission in the basolateral amygdala and modulate taste memory storage processes.

In addition, the results reported in this manuscript indicate that the NTS mainly mediates visceral stimulus processing by releasing norepinephrine in the BLA, but not by directly modulating glutamate release in the BLA during CTA acquisition, which supports previous evidence that noradrenergic NTS activity has an important function in the transmission of signals from the periphery to brain systems that process aversive memory formation.

We hope that you find our manuscript acceptable as a regular research contribution in the journal Neurobiology of Learning and Memory.

Sincerely,

María-Isabel Miranda PhD.

Instituto de Neurobiología, UNAM.

Highlights

- Norepinephrine in the amygdala correlates with the strength of taste aversive memory.
- Nucleus of the solitary tract stimulation increases amygdala norepinephrine and CTA.
- Glutamate in the nucleus of the solitary tract induces taste aversion learning.
- Norepinephrine, but not glutamate, is modulated by the solitary tract during CTA.

Nucleus of solitary tract stimulation increases noradrenergic neurotransmission in the basolateral amygdala and enhances visceral aversive stimulus during conditioned taste aversion

Nadia Edith Garcia-Medina¹, Gabriela Vera¹ and María-Isabel Miranda^{1*}.

¹ Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla No. 3001 Juriquilla, Querétaro, Qro. 76230.

* Corresponding author: mirandami@unam.mx

*Correspondence should be addressed to: Dr. María Isabel Miranda. Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla No. 3001, Juriquilla, Querétaro, Qro. 76230, México. Fax: +5255 56234046. e-mail: mirandami@unam.mx

Running title: NTS modulation during taste aversive conditioning

Keywords: Taste learning, glutamate, solitary nucleus tract, basolateral amygdala, aversive stimulus, aversive memory.

ABSTRACT

Taste memory depends on motivational and post-ingestional consequences after a single taste–illness pairing. During conditioned taste aversion (CTA), the taste and visceral pathways reach the nucleus of the solitary tract (NTS), which is the first relay in the CNS and has a vital function in receiving chemical stimuli and peripheral signals related to vagal stimulation. The specific aim of the present set of experiments was to determine if the NTS is involved in noradrenergic and glutamatergic activation of the basolateral amygdala (BLA) during CTA. Using *in vivo* microdialysis, we examined whether chemical NTS stimulation induces norepinephrine (NE) and/or glutamate changes in the BLA during visceral stimulation with intraperitoneal (i.p) injections of low (0.08 M) and high (0.3 M) concentrations of lithium chloride (LiCl) during CTA training. The results showed that CTA can be elicited by chemical NTS stimulation (Ringer's high potassium solution; 110 mM KCl) and by intra-NTS microinjections of glutamate, immediately after low LiCl i.p. injections. Visceral stimulation (i.p. LiCl) induced a significant increase in NE release and a modest glutamate release in the amygdala; these effects can also be elicited by intra-NTS chemical stimulation just after a weak visceral stimulation. In contrast, chemical NTS stimulation before low LiCl i.p. injections did not have any effect on the acquisition of CTA. These results indicate that the NTS mainly mediates the visceral stimulus processing by releasing NE in the BLA, but not by directly modulating glutamate release in the BLA during CTA acquisition, supporting previous evidence that the NTS has an important function in the transmission of signals from the periphery to brain systems that process aversive memory formation.

Introduction

Taste memory formation begins when the branches of the facial, glossopharyngeal, and vagus nerves are activated and transmit taste activation to the rostral part of the nucleus of the solitary tract (NTS) (Yamamoto, 2006), which is the first central synaptic relay for gustatory information (Hamilton & Norgren, 1984). The NTS has an important role in modulating sensory aspects of gustatory function; for example, electrolytic lesions of the rostral NTS impair the response to sapid stimuli, as well as the innate gustatory preference or aversion; however, animals with lesions in the NTS can still use taste cues for learning aversion (Bures, Bermúdez-Rattoni, & Yamamoto, 1998). During taste memory formation, taste and visceral pathways converge in several brain structures such as the NTS, parabrachial nucleus (PBN), thalamus, central and basolateral nucleus of the amygdala (CEA and BLA, respectively), and insular cortex, where taste and malaise can be associated to create the taste memory representation (Bermudez-Rattoni, 2004). The NTS in particular receives projections from the CEA and BLA (Spray & Bernstein, 2004); electrophysiological studies demonstrated that the firing interval in the amygdala neurons increases significantly after electrical stimulation of NTS neurons (Radna & MacLean, 1981; Rogers & Fryman, 1988), and vagal nerve stimulation produces a significant increase in the number of amygdala neurons that express *Fos* (Naritoku, Terry, & Helfert, 1995). Consequently, recent studies demonstrate an important NTS-BLA interaction during memory formation (Clayton & Williams, 2000; Hatfield & McGaugh, 1999; Williams, Men, & Clayton, 2000).

NTS neurons also project directly to the locus coeruleus (Groves, Bowman, & Brown, 2005; Van Bockstaele, Peoples, & Telegan, 1999), the structure that provides the major source of norepinephrine (NE) innervations to the BLA as well as to several other structures (Fallon, Koziell, & Moore, 1978; Florin-Lechner, Druhan, Aston-Jones, & Valentino, 1996). Thus, vagal activation of the NTS may initiate NE release in the amygdala, either by direct NTS action on the BLA or via a polysynaptic pathway involving the locus coeruleus (Garcia-Medina & Miranda 2013; Williams, Men, & Clayton, 2000). There is evidence that β -adrenoreceptors in the BLA are involved during taste or taste-malaise association, since microinfusions of the β -adrenergic antagonist propranolol into the BLA and insular cortex prevented incidental taste learning but did not affect associative/aversive taste learning (Miranda, Rodriguez-Garcia, Reyes-Lopez, Ferry, & Ferreira, 2008).

In addition to these findings, the amino acid glutamate is another neurotransmitter involved during synaptic communication between vagal afferents and neurons in the NTS (Miyashita & Williams, 2002). Vagal afferents contain glutamate (Sykes, Spyer, & Izzo, 1997), which is significantly increased in the NTS by direct stimulation of vagal afferents (Allchin, Batten, McWilliam, & Vaughan, 1994). Furthermore, electrophysiological experiments showed that the NTS excitatory postsynaptic potentials (EPSPs), after electrical stimulation of the vagus tract, are completely suppressed by intra-NTS infusion of a glutamate, non-NMDA receptor antagonist, and that NMDA receptors may have only a modulatory role (Andresen & Yang, 1990). During conditioned taste aversion (CTA), a visceral stimulus (e.g., LiCl injection) induces a dramatic increase in glutamate release in the amygdala, indicating that glutamatergic

activation of the amygdala can partially imitate the visceral stimulus during CTA (Garcia-Medina & Miranda, 2013; Miranda, Ferreira, Ramirez-Lugo, & Bermudez-Rattoni, 2002). The current evidence highlights the importance of the NTS for understanding the mechanism of vagal-mediated memory enhancement, since the NTS is the target area for vagal afferents and contains neurons that project to regions of the brain such as the amygdala that exhibit activity after periphery stimulation (Appleyard et al., 2007; Hassert, Miyashita, & Williams, 2004; Radna & MacLean, 1981; Ricardo & Koh, 1978; Zardetto-Smith & Gray, 1990). Although the ability of vagal or NTS input to influence the amygdala has been demonstrated in previous research, there is still scarce information about the neurotransmitters, and the degree to which their transmission is mediated by the NTS during the convergence of taste and visceral stimuli that allows taste memory formation.

Accordingly, the main goal of this research was to evaluate whether the activity of the NTS promotes NE and glutamate release in the BLA upon visceral stimulation during the acquisition of CTA. We examined the effects of bilateral infusions of high potassium Ringer's solution into the NTS before or immediately after i.p. injection of low concentrations of LiCl and simultaneously, we used microdialysis in freely moving rats to evaluate the release of NE and glutamate in the BLA during CTA acquisition.

Materials and methods

Animals

Seventy male Sprague-Dawley rats for pharmacology experiments and twenty-nine for microdialysis experiments (Instituto de Neurobiología breeding colony,

weighing 250 to 300 g) were individually housed with access to food and water (except during behavioral tests) and maintained at 23 °C in an inverted 12-h/12-h dark-light cycle. All experimental procedures were performed during the dark phase. Experiments were performed in accord with the rules in health matters (Ministry of Health, Mexico), according to the Mexican Laws for Animal Care (Norma Oficial Mexicana SAGARPA) and the approval of the local Animal Care Committee (Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM), complied with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and Rules in Health Matters (Ministry of Health, México).

Guide cannula implantation

Animals were anaesthetized with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg) i.p. and implanted with bilateral, 23-gauge stainless steel cannulae either 2.0 mm above the NTS (AP=-13.3 mm, L=± 1.0 mm, V=-5.6 mm from bregma). For microdialysis groups, animals were implanted with stainless steel cannulae and an additional unilateral 2.0 mm microdialysis guide (BAS, West Lafayette, IN) above the left BLA (AP=-2.8, L=± 5.0 mm, V=-6.5 mm from bregma) (Paxinos, 1998). Cannulae were fixed to the skull with two surgical screws and dental acrylic cement. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent clogging.

Conditioned taste aversion

One week after surgery, the rats were water deprived for 24 h and then habituated to drink water, from a spout inserted into a graduated cylinder, for 15 min per day for 5 days until a stable water consumption baseline was reached.

On day 6, the rats were randomly separated into groups, and the acquisition of CTA was performed. The water was replaced by a 0.1% sodium saccharin solution, and the rats were allowed to drink for 20 min.

Thirty minutes after exposure to saccharin, 3 ml of a low (0.08 M) or high (0.3 M) concentration of LiCl was injected i.p. Before or immediately after the LiCl injections, bilateral NTS infusions were made with normal (82 mM KCl) or high (110 mM KCl) potassium Ringer solution. The CTA retrieval test was performed 24 h later by again presenting 0.1% saccharin for 20 min but without LiCl injection. Taste aversion was evaluated as the decrease in %CTA Acquisition: $\text{test ml consumption} \times 100 / \text{Acquisition ml consumption}$.

Microdialysis procedure during CTA

Five or six days after surgery, the animals were deprived of water for 24 h and then habituated to the microdialysis chamber once a day for 45 min trials. They were allowed to drink water from a graded bottle during one 15 min period for 5 days or until stable water consumption baseline was reached. On the next day, the microdialysis assay was performed concurrently in the BLA. The rats were randomly separated into the following groups: the control group CTA (Control) received an injection of 0.3 M LiCl and immediately thereafter an infusion of Ringer's solution (82 mM KCl); the low LiCl group (Low LiCl) received i.p. injections of 0.08M LiCl; and the low LiCl with high potassium Ringer's group (Low LiCl-K⁺) received i.p. 0.08 M LiCl and immediately thereafter an infusion of Ringer's solution containing 110 mM KCl for artificial depolarization. Dialysis was started when 30-gauge injection needles were inserted into the NTS cannulae. The injection needles protruded 2 mm beyond the cannulae for the

NTS, and they were connected via polyethylene tubing to two, 10- μ l Hamilton syringes driven by an infusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). Then, the probe inlet was connected (dialysis probes, BAS with 10% recovery rates, with a total membrane length of 2 mm) to the microinfusion pump system (CMA/Microdialysis, West Lafayette, IN), which circulated the probe continuously at a rate of 2 μ l/min with Ringer's solution (118 mM NaCl / 4.7 mM KCl/2.5 mM CaCl₂) and finally inserted into the cannula directed to the BLA. The first 60-min dialysis sampling was discarded, and then samples were collected every 15 min (30 μ l / sample). The samples collected to measure NE were preserved with 5 μ l of DHBA-HClO₄ solution (3,4-dihydroxybenzylamine and 0.1 M perchloric acid) During microdialysis a total of twelve samples were collected. The initial samples were considered baseline release (F0-F3); a 0.1% saccharin solution (SAC) was presented during collection of fraction four (F4). Then, two additional samples (F5 and F6) were collected. Beginning at F7, animals received an i.p. injection of LiCl (0.08 M or 0.3M) and immediately Ringer solution was infused (82 mM or 110 mM KCl, 1.5 μ l/min) via the microinjectors in the NTS. All dialysis samples were immediately frozen at -80 °C and subsequently analyzed by HPLC.

Chemical NTS stimulation during CTA

Two different NTS stimulation procedures were performed simultaneously with the BLA microdialysis during CTA acquisition: 1) Bilateral NTS infusions, before or immediately after LiCl i.p. injections, were made with Ringer solution containing 82 mM KCl (for Control and Low LiCl group) or 110 mM KCl (Low LiCl-K⁺ group), with a total volume of 0.5 μ l per side. 2) Bilateral infusions,

immediately after the LiCl i.p. injections, were made into the NTS with glutamate (1 µg/0.5 µl/min). The CTA retrieval test was performed 24 h later, again presenting 0.1% saccharin for 20 min but without i.p. injection.

Measurement of norepinephrine and glutamate extracellular levels

The content of NE or glutamate in each sample (30 µl / dialysate fraction) was determined by an HPLC system with electrochemical detection (BASinc, West Lafayette, Indiana, U.S.A.). The HPLC system consists of a delivery pump (model PM-80), a Rheodyne injector, an analytical reversed-phase column (UniJet ODS, 100x3 mm internal diameter, particle size 3 µm) (BASi) maintained at 29°C. NE was electrochemically detected by a glassy carbon working electrode at a voltage of +650 mV versus an Ag/AgCl reference electrode in the range of 20 nA. The mobile phase, at 0.6 ml/min flow rate, consisted of 190 mg disodium EDTA (0.5 mM) (Sigma-Aldrich), 230 mg octyl sodium sulfate (1 mM) (Sigma), 7.08 g chloroacetic acid (0.075 M) (Sigma-Aldrich) adjusted to pH 3.0 and 15 ml of HPLC grade acetonitrile. To evaluate the amounts of NE in the experimental samples, a calibration curve was constructed by injecting external standards containing a range of increased NE and DHBA concentrations. NE levels in the dialysate samples were expressed as ng/20 µl.

For glutamate analysis, each dialysate fraction was derivatized with o-phthaldialdehyde by adding a solution containing 1.0 M sodium sulfite and 0.1 M sodium tetraborate; then each fraction was injected to an analytical reversed-phase column (UniJet ODS, 100x3 mm internal diameter, particle size 3µm) (BASi) maintained at 20°C. The mobile phase, was maintained a flow rate of 0.6

ml/min and consisted of 8 g sodium phosphate dibasic buffer (J.T.Baker) in 150 ml of HPLC grade methanol adjusted to pH 5. NE was electrochemically detected by a glassy carbon working electrode at a voltage of +700 mV versus an Ag/AgCl reference electrode over a range of 20 nA. To evaluate the amounts of glutamate in the dialysis samples, a standard curve was obtained by injecting external standards of known concentration. Glutamate levels in the dialysis samples were expressed as pmol / 20 μ l.

Histology

After the CTA behavioral procedure, all animals were deeply anaesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with a 4% (vol/vol) solution of paraformaldehyde in phosphate buffer (0.15 M, pH 7.4). The brains were placed overnight in paraformaldehyde, transferred to a buffered 30% sucrose solution, and stored at 4 °C until they were cut. Coronal sections (50 μ m thick) were taken through the areas of the probe and injectors. The slide sections were stained with cresyl violet and observed under a light microscope to determine the injection needle tip and probe tip locations in the NTS or BLA, respectively, according to the atlas of Paxinos and Watson (1998).

Statistical analysis

The effect of chemical NTS stimulation during CTA was evaluated with a two-ways ANOVA followed by a *post-hoc* pairwise Fisher test. All results are expressed as the average \pm standard error. An ANOVA with repeated measures was used to compare neurotransmitter levels in the microdialysis fractions. To

analyze differences between fractions, we performed a simple ANOVA between each of the fractions. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Verification of probe and injector placement

Only brains with the cannula and microdialysis probe within the BLA, as well both injector tips in the NTS, were included in the statistical analysis (Fig. 1). Any infusion tracks not located within the complex of the BLA were excluded from analysis; in only a few cases (~ 10%), the needle tips were located at the borders of central and lateral amygdala nuclei.

High potassium or glutamate administered immediately after visceral stimulation in the NTS improves CTA acquisition

The effects of chemical NTS stimulation before i.p. LiCl injections and during CTA acquisition and retrieval, are show in figure 2-A. As expected, ANOVA between groups revealed no significant differences in water consumption during baseline and saccharin consumption on CTA acquisition day. However, on CTA retrieval day, significant differences were observed between groups ($F_{2,17} = 4.465$, $P < 0.05$); the low i.p. stimulation group (Low LiCl) and the low i.p. stimulation plus NTS depolarization group (Low LiCl K+) showed significant increases in saccharin consumption compared with the control CTA group, indicating that low LiCl concentration and low LiCl plus high potassium are unable to induce significant taste aversion memory.

The effects of chemical NTS stimulation by high potassium or glutamate infusions immediately after i.p. LiCl injections are shown in figure 2-B. As

expected, an ANOVA between groups revealed no significant differences in water consumption during base line and saccharin consumption during CTA acquisition day. Nevertheless, during retrieval day, significant differences were observed between groups ($F_{3,55} = 50.826$ $P < 0.01$); the low i.p. stimulation group (Low LiCl) had a significant increase in saccharin consumption compared with the control CTA group ($p < 0.001$). However, this increase relative to the CTA control group was absent in both the group with low i.p. stimulation plus depolarization (Low LiCl K⁺) and the group with low i.p. stimulation plus glutamate infused into the NTS (Low LiCl Glut), indicating that either potassium or glutamate infused into the NTS immediately after the low visceral stimulation can improve CTA memory formation.

NTS depolarization increases norepinephrine release in the amygdala during CTA acquisition

The effects of chemical NTS stimulation with high potassium during CTA are shown in Figure 3 (see insert). Similar to the preceding results, an ANOVA of microdialysis samples showed no significant differences among groups in baseline water or saccharine consumption during CTA acquisition (data not shown). These results indicate that the microdialysis procedure and injections in the NTS during CTA acquisition had no significant effect on motivation or liquid consumption during conditioning. Nevertheless, there was significant difference between groups in consumption (expressed as % of saccharin acquisition consumption) during CTA retrieval [$F_{2,11} = 17.634$, $P < 0.05$]. Thus, Low LiCl i.p. stimulation together with high potassium infusions in the NTS (Low LiCl-K⁺)

improved CTA, since they provoked a significant decrease in saccharin consumption during retrieval.

The extracellular NE levels in the amygdala during CTA acquisition are shown in figure 3. An ANOVA with repeated measures revealed no difference between groups [$F_{2,11}=1.064$, $P > 0.05$], significant differences between fractions [$F_{2,11}=2.576$, $P=.006$], but no significant group x fraction interaction [$F_{2,11}=1.622$, $P > 0.05$]. To analyze the source of differences between fractions, we performed an ANOVA for each of the fractions, which revealed significant differences among groups in the seventh fraction [$F_{2,11}=6.307$, $P < 0.05$]. Post-hoc analysis showed a significant difference between control and Low LiCl K⁺; as well between Low LiCl and Low LiCl K⁺ ($P < 0.05$).

NTS depolarization increases glutamate release in the amygdala during CTA acquisition

The effects of high potassium depolarization of the NTS during CTA are shown in figure 4 (see insert). ANOVA showed no significant differences among groups in baseline water or saccharine consumption during CTA acquisition (data not shown). These results indicate again that the microdialysis procedure and injections in the NTS during CTA acquisition had no significant effect on motivation or liquid consumption during conditioning. Nevertheless, there was significant difference in consumption between groups during CTA retrieval [$F_{2,12}=7.729$, $P < 0.05$]: with low LiCl there was a significant increase in consumption evaluated as % CTA acquisition; but induced a significant decrease in saccharin consumption during retrieval, indicating an improvement of CTA memory formation.

Figure 4 shows glutamate release in the amygdala during CTA acquisition. ANOVA with repeated measures revealed no significant differences between groups [$F_{2,12}=0.210$, $P>0.05$], no group x fraction interaction [$F_{2,12}=0.663$, $P>0.05$], but significant differences between fractions [$F_{2,12}=2.067$, $P=0.006$]. To analyze the source of differences between fractions, we performed an ANOVA for each of the fractions, which revealed significant differences among groups in the seventh fraction, [$F_{2,12}=3.07$, $P<0.05$]. Post-hoc analysis showed a significant difference between Low LiCl with control and Low LiCl K+ ($P<0.05$). These results indicate that i.p. injection of a low dose of LiCl, which alone does not induce CTA, together with high potassium infusion can induce CTA, but they do not change the amygdala glutamate release levels during acquisition.

Discussion

The findings from these experiments demonstrate effects that occur during taste aversive memory formation: 1) In the BLA there is an increase of NE which correlates with the strength of taste aversive memory. 2) Chemical NTS stimulation, immediately after weak visceral stimulation, mimics the NE release in the BLA and induces a strong CTA. 3) Increased glutamate levels in the NTS just after weak visceral stimulation also increase CTA learning. 4) NE release, but not the glutamate activity in the BLA, is modulated by the NTS during CTA acquisition.

The results demonstrate that NTS stimulations immediately after, but not before, a mild visceral periphery stimulation that is not by itself enough to induce a significant CTA, are able to enhance noradrenergic neurotransmission in the

BLA and modulate taste memory storage processes, providing evidence of the neurotransmission interactions between the NTS and amygdala during taste and visceral stimuli association. These experiments showed that visceral, but not taste stimuli, unleash the noradrenergic activation in the BLA which, in turn, may modulate the insular cortex through glutamate activity (Miranda, Ferreira, Ramirez-Lugo, & Bermudez-Rattoni, 2002). According to previous evidence the NTS has a significant role in modulating limbic structures, and noradrenergic activity in limbic and cortical structures regulates the processes that underlie the formation of several types of memory. For example, the administration of NE or noradrenergic agonists after training increases the retention of memory of spatial tasks (Clayton & Williams, 2000; Hatfield & McGaugh, 1999) or of memories with a high emotive and/or aversive content (Ferry & McGaugh, 1999; Ferry, Roozendaal, & McGaugh, 1999; Introini-Collison, Miyazaki, & McGaugh, 1991; Izquierdo et al., 1992; Liang, Chen, & Huang, 1995; Liang, Juler, & McGaugh, 1986). Here, we demonstrated that the NTS activity, mediated mainly by noradrenergic signals, modulates the visceral stimulus during CTA, but also that glutamatergic activity in the amygdala, which is not directly modulated by NTS, has an impact during visceral stimulus processing, indicating that release of glutamate in the BLA is mediated by other structures.

CTA requires only one acquisition trial and depends on the integration of the gustative and visceral stimuli (Bermudez-Rattoni, 2004; Bures, Bermúdez-Rattoni, & Yamamoto, 1998). The NTS receives, in the caudal region, a great number of visceral entries from different branches of the vagus nerve, as well as entries from the area postrema (which is sensitive to the toxins transported in blood), as well from the vestibular system (which is sensitive to motor

imbalances due to nausea). Rats with electrolytic lesions in the NTS cannot distinguish sapid stimuli; nevertheless, they are capable of establishing aversive taste memories to a lesser degree than non-lesioned animals (Grigson, Shimura, & Norgren, 1997; Shimura, Norgren, Grigson, & Norgren, 1997). Electrophysiological studies in NTS neurons have demonstrated the complex neural activity during acquisition, retrieval, and taste aversive extinction, suggesting that the capacity of neural activity in the NTS to affect behavior may be overridden by changes in other gustatory areas (McCaughey, Giza, Nolan, & Scott, 1997). Furthermore, recent immunohistology studies, using immediate early gene fos demonstrated, that the NTS responds differently depending on whether the stimulus is novel or is associated with an aversion or extinction process (Bernstein & Koh, 2007).

Previous research also showed that activation of the vagus by epinephrine may affect memory through influences of ascending vagal fibers on forebrain structures, such as the amygdala, that process cognitive information (Radna & MacLean, 1981), as demonstrated by the fact that enhancement in memory, produced by activation of peripheral vagal fibers, is completely blocked by amygdala lesions (Clark et al., 1998). Furthermore, activation of adrenergic receptors in the NTS facilitates epinephrine actions in memory formation and is attenuated by β -adrenergic receptor blockade in this nucleus, suggesting that epinephrine-induced memory enhancement may involve the initial activation of the vagus nerve with subsequent changes in NTS and amygdala catecholaminergic activity (Clayton & Williams, 2000). This is supported by evidence that NTS blockade suppresses the robust increase in amygdala norepinephrine release following peripheral injections of epinephrine (Williams,

Men, Clayton, & Gold, 1998). Moreover, NE modulates amygdala neuronal activity (Stone, Zhang, Hiller, Simon, & Hillman, 1997) and intra-amygdala NE agonist infusions facilitate memory consolidation (Liang, Chen, & Huang, 1995; Liang, Juler, & McGaugh, 1986). Recently, we demonstrated that general stimulation of the NTS in anesthetized rats, without any behavioral or vagal stimulation, induced an increase of NE release in the amygdala, providing direct evidence of the level and duration of the effect on the amygdala exerted by noradrenergic activation of the NTS and confirming the NTS role in modulating limbic structures (Garcia-Medina & Miranda, 2013).

During CTA the stimuli are processed through the NTS projections towards the parabrachial nucleus and other regions such as the central amygdala, BLA, and insular cortex. It has been shown that the visceral stimulus (e.g., high i.p. doses of 0.4 M LiCl) induces a significant increase in glutamate in the BLA (Miranda & Bermudez-Rattoni, 1999; Miranda, Ferreira, Ramirez-Lugo, & Bermudez-Rattoni, 2002), and also a less robust but significant increase in the insular cortex, which suggests that glutamatergic activity in the cortex is modulated by other structures, such as the BLA and NTS. Furthermore, it has been shown that infusions of propranolol into the BLA, after the gustative stimulus, interrupt the formation of the aversive taste memory (Miranda, LaLumiere, Buen, Bermudez-Rattoni, & McGaugh, 2003). Injections of the β -adrenergic receptor antagonist into the insular cortex immediately before CTA acquisition prevent taste memory formation, and this blockade of the aversive memory correlates with the degree of inactivation of these receptors (Miranda, Rodriguez-Garcia, Reyes-Lopez, Ferry, & Ferreira, 2008). The current results demonstrate that glutamatergic activity in the NTS is also able to modulate taste aversive

memory. Together, the results suggest that NE and glutamate in the BLA are essential for the processing of visceral stimuli, and that the interactions between the NTS and BLA could also regulate the intensity with which the CTA is formed. All these findings concur with the evidence that the NTS has a function during hormonal response to emotional experiences and in the transmission of information to limbic structures, such as the amygdala, during the consolidation of different types of memories ((Miyashita & Williams, 2003; Williams & McGaugh, 1994).

The present results confirm the importance of modulating taste memory storage processes of noradrenergic NTS projections to the BLA; moreover, they demonstrate that an elevated glutamate concentration in the NTS enhances aversive taste learning, supporting previous evidence that the NTS has an important function in the transmission of signals from the periphery to brain systems that process emotional memory formation.

Acknowledgments

García-Medina NE was a PhD student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received fellowship 169088 from CONACyT. This research was supported by DGAPA-PAPIIT IN201308, IN209911, and CONACyT 54524. We thank Biol. Alejandro Rangel Hernandez, Biol. Gerardo A. Soto Alonso and Dra. Dorothy Pless and Shaun Harris for the English revision.

References

- Allchin, R. E., Batten, T. F., McWilliam, P. N., & Vaughan, P. F. (1994). Electrical stimulation of the vagus increases extracellular glutamate recovered from the nucleus tractus solitarii of the cat by in vivo microdialysis. *Exp Physiol*, *79*(2), 265-268.
- Andresen, M. C., & Yang, M. Y. (1990). Non-NMDA receptors mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol*, *259*(4 Pt 2), H1307-1311.
- Appleyard, S. M., Marks, D., Kobayashi, K., Okano, H., Low, M. J., & Andresen, M. C. (2007). Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J Neurosci*, *27*(48), 13292-13302.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci*, *5*(3), 209-217.
- Bernstein, I. L., & Koh, M. T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses*, *32*(1), 99-103.
- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind*. Oxford University Press.
- Clark, K. B., Smith, D. C., Hassert, D. L., Browning, R. A., Naritoku, D. K., & Jensen, R. A. (1998). Posttraining electrical stimulation of vagal afferents with concomitant vagal efferent inactivation enhances memory storage processes in the rat. *Neurobiol Learn Mem*, *70*(3), 364-373.
- Clayton, E. C., & Williams, C. L. (2000). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res*, *112*(1-2), 151-158.
- Fallon, J. H., Koziell, D. A., & Moore, R. Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol*, *180*(3), 509-532.
- Ferry, B., & McGaugh, J. L. (1999). Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*, *72*(1), 8-12.
- Ferry, B., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an

- interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J Neurosci*, 19(12), 5119-5123.
- Florin-Lechner, S. M., Druhan, J. P., Aston-Jones, G., & Valentino, R. J. (1996). Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res*, 742(1-2), 89-97.
- Garcia-Medina, N. E., & Miranda, M. I. Nucleus of the solitary tract chemical stimulation induces extracellular norepinephrine release in the lateral and basolateral amygdala. *Brain Stimul*, 6(2), 198-201.
- Grigson, P. S., Shimura, T., & Norgren, R. (1997). Brainstem lesions and gustatory function: III. The role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats. *Behav Neurosci*, 111(1), 180-187.
- Groves, D. A., Bowman, E. M., & Brown, V. J. (2005). Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci Lett*, 379(3), 174-179.
- Hamilton, R. B., & Norgren, R. (1984). Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol*, 222(4), 560-577.
- Hassert, D. L., Miyashita, T., & Williams, C. L. (2004). The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav Neurosci*, 118(1), 79-88.
- Hatfield, T., & McGaugh, J. L. (1999). Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol Learn Mem*, 71(2), 232-239.
- Introini-Collison, I. B., Miyazaki, B., & McGaugh, J. L. (1991). Involvement of the amygdala in the memory-enhancing effects of clenbuterol. *Psychopharmacology (Berl)*, 104(4), 541-544.
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., & Medina, J. H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol*, 58(1), 16-26.
- Liang, K. C., Chen, L. L., & Huang, T. E. (1995). The role of amygdala norepinephrine in memory formation: involvement in the memory enhancing effect of peripheral epinephrine. *Chin J Physiol*, 38(2), 81-91.

- Liang, K. C., Juler, R. G., & McGaugh, J. L. (1986). Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res*, 368(1), 125-133.
- McCaughey, S. A., Giza, B. K., Nolan, L. J., & Scott, T. R. (1997). Extinction of a conditioned taste aversion in rats: II. Neural effects in the nucleus of the solitary tract. *Physiol Behav*, 61(3), 373-379.
- Miranda, M. I., & Bermudez-Rattoni, F. (1999). Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6478-6482.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11417-11422.
- Miranda, M. I., LaLumiere, R. T., Buen, T. V., Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (2003). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *Eur J Neurosci*, 18(9), 2605-2610.
- Miranda, M. I., Rodriguez-Garcia, G., Reyes-Lopez, J. V., Ferry, B., & Ferreira, G. (2008). Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiol Learn Mem*, 90(1), 54-61.
- Miyashita, T., & Williams, C. L. (2002). Glutamatergic transmission in the nucleus of the solitary tract modulates memory through influences on amygdala noradrenergic systems. *Behav Neurosci*, 116(1), 13-21.
- Miyashita, T., & Williams, C. L. (2003). Enhancement of noradrenergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract modulates memory storage processes. *Brain Res*, 987(2), 164-175.
- Naritoku, D. K., Terry, W. J., & Helfert, R. H. (1995). Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res*, 22(1), 53-62.
- Paxinos, G. a. W. C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California, USA: Academic Press.

- Radna, R. J., & MacLean, P. D. (1981). Vagal elicitation of respiratory-type and other unit responses in basal limbic structures of squirrel monkeys. *Brain Res*, 213(1), 45-61.
- Ricardo, J. A., & Koh, E. T. (1978). Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*, 153(1), 1-26.
- Rogers, R. C., & Fryman, D. L. (1988). Direct connections between the central nucleus of the amygdala and the nucleus of the solitary tract: an electrophysiological study in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 22(1), 83-87.
- Shimura, T., Norgren, R., Grigson, P. S., & Norgren, R. (1997). Brainstem lesions and gustatory function: I. The role of the nucleus of the solitary tract during a brief intake test in rats. *Behav Neurosci*, 111(1), 155-168.
- Spray, K. J., & Bernstein, I. L. (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.
- Stone, E. A., Zhang, Y., Hiller, J. M., Simon, E. J., & Hillman, D. E. (1997). Activation of fos in mouse amygdala by local infusion of norepinephrine or atipamezole. *Brain Res*, 778(1), 1-5.
- Sykes, R. M., Spyer, K. M., & Izzo, P. N. (1997). Demonstration of glutamate immunoreactivity in vagal sensory afferents in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Brain Res*, 762(1-2), 1-11.
- Van Bockstaele, E. J., Peoples, J., & Telegan, P. (1999). Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol*, 412(3), 410-428.
- Williams, C. L., & McGaugh, J. L. (1994). Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, 654(2), 251-256.
- Williams, C. L., Men, D., & Clayton, E. C. (2000). The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. *Behav Neurosci*, 114(6), 1131-1144.

- Williams, C. L., Men, D., Clayton, E. C., & Gold, P. E. (1998). Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. *Behav Neurosci*, 112(6), 1414-1422.
- Yamamoto, T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol*, 69(4), 243-255.
- Zardetto-Smith, A. M., & Gray, T. S. (1990). Organization of peptidergic and catecholaminergic efferents from the nucleus of the solitary tract to the rat amygdala. *Brain Res Bull*, 25(6), 875-887.

Figure legends

Figure 1. Diagram and photomicrographs of right coronal sections of cannula placement in the nucleus of solitary tract (NTS), and microdialysis guide cannula in the basolateral amygdala (BLA). The diagram squares approximate the areas considered to be correct locations for the injector and microdialysis probe.

Figure 2. Saccharin consumption during CTA acquisition and retrieval. (A) Effects of NTS depolarization before i.p LiCl (* $p \leq 0.05$ vs. Control CTA group) (Control; $n=7$, Low LiCl; $n=5$, Low LiCl K^+ ; $n=5$) (B) Effects of NTS depolarization or glutamate infusions immediately after i.p LiCl (* $p < 0.001$ vs. Control CTA group) (Control, $n=14$; Low LiCl, $n=17$; Low LiCl K^+ , $n=13$; Low LiCl-Glut, $n=11$).

Figure 3. Changes in extracellular norepinephrine levels in the BLA after stimulation of the NTS during CTA acquisition (* $P < 0.05$). F0-F3 were collected during basal levels of norepinephrine release. During F4 animals consumed saccharin solution. Thirty minutes after saccharin consumption (F7), animals received an i.p. LiCl injection (thin arrow) and bilateral NTS infusions as follows: Control group: i.p. 0.3 M LiCl plus normal Ringer in NTS (82 mM KCl); Low-LiCl Group: i.p. 0.08 M LiCl plus normal Ringer (82 mM KCl) in NTS; and Low-LiCl- K^+ Group: i.p. 0.08 M LiCl plus high potassium Ringer (110 mM KCl) in NTS. After this, four more fractions were collected (F8-F11) to end the microdialysis. (Control, $n=6$; Low LiCl, $n=4$; Low LiCl- K^+ , $n=4$).

Figure 4. Changes in glutamate release in the BLA after stimulation of the NTS during CTA acquisition (*P<0.05). The F1-F3 fractions were collected during basal glutamate release. During fraction F4 collection, animals consumed saccharin solution. Thirty minutes after of saccharin consumption (F7), animals received an i.p. injection of LiCl (thin arrow) and bilateral NTS infusions as follows: Control group: i.p. 0.3 M LiCl plus normal Ringer in NTS (82 mM KCl); Low-LiCl Group: i.p. 0.08 M LiCl plus normal Ringer (82 mM KCl) in NTS; and Low-LiCl-K⁺ Group: i.p. 0.08 M LiCl plus high potassium Ringer (110 mM KCl) in NTS. (Control, n= 5; Low-LiCl, n= 4; Low LiCl- K⁺, n= 6).

Figure 1-4

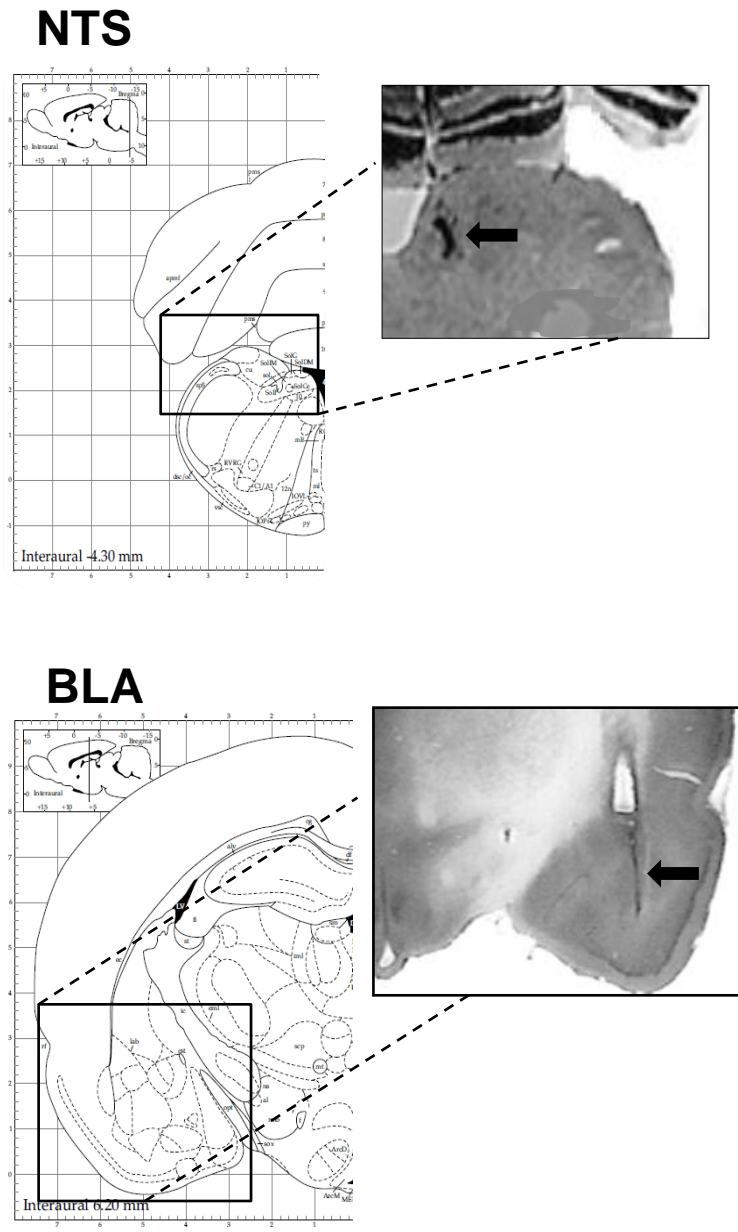


Figure 1.

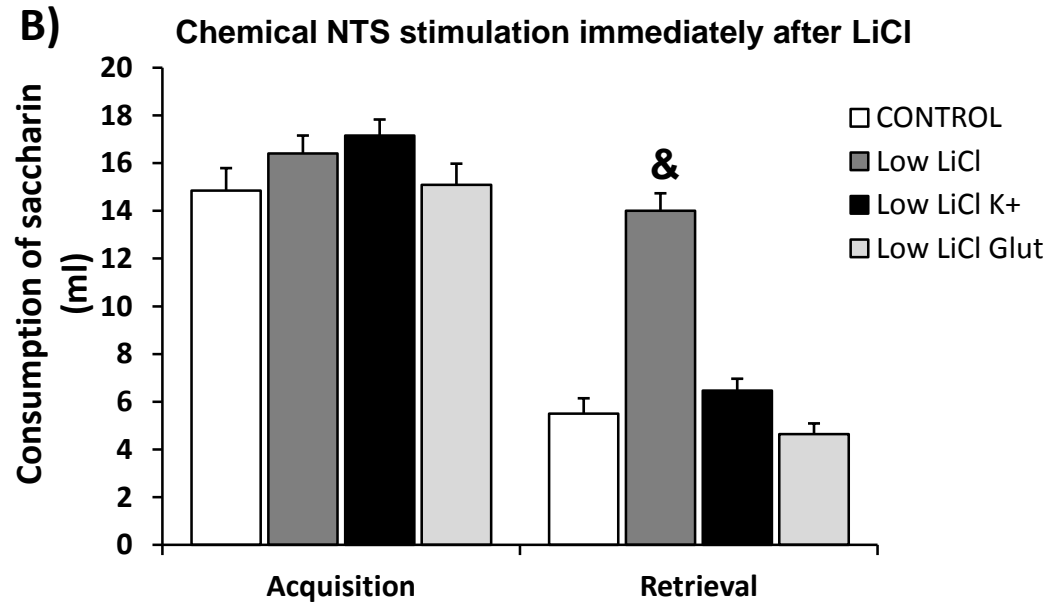
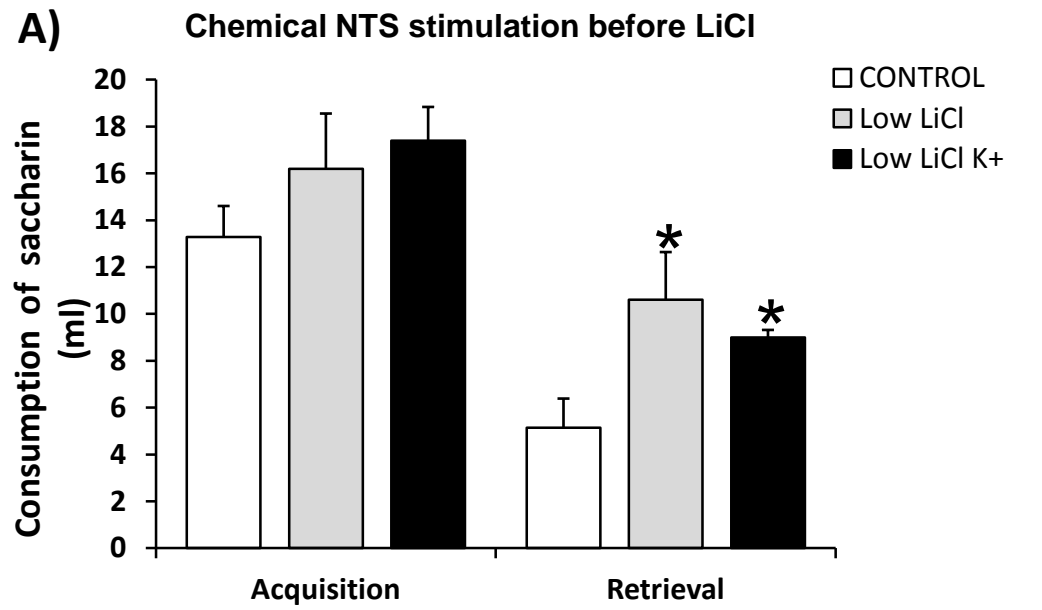
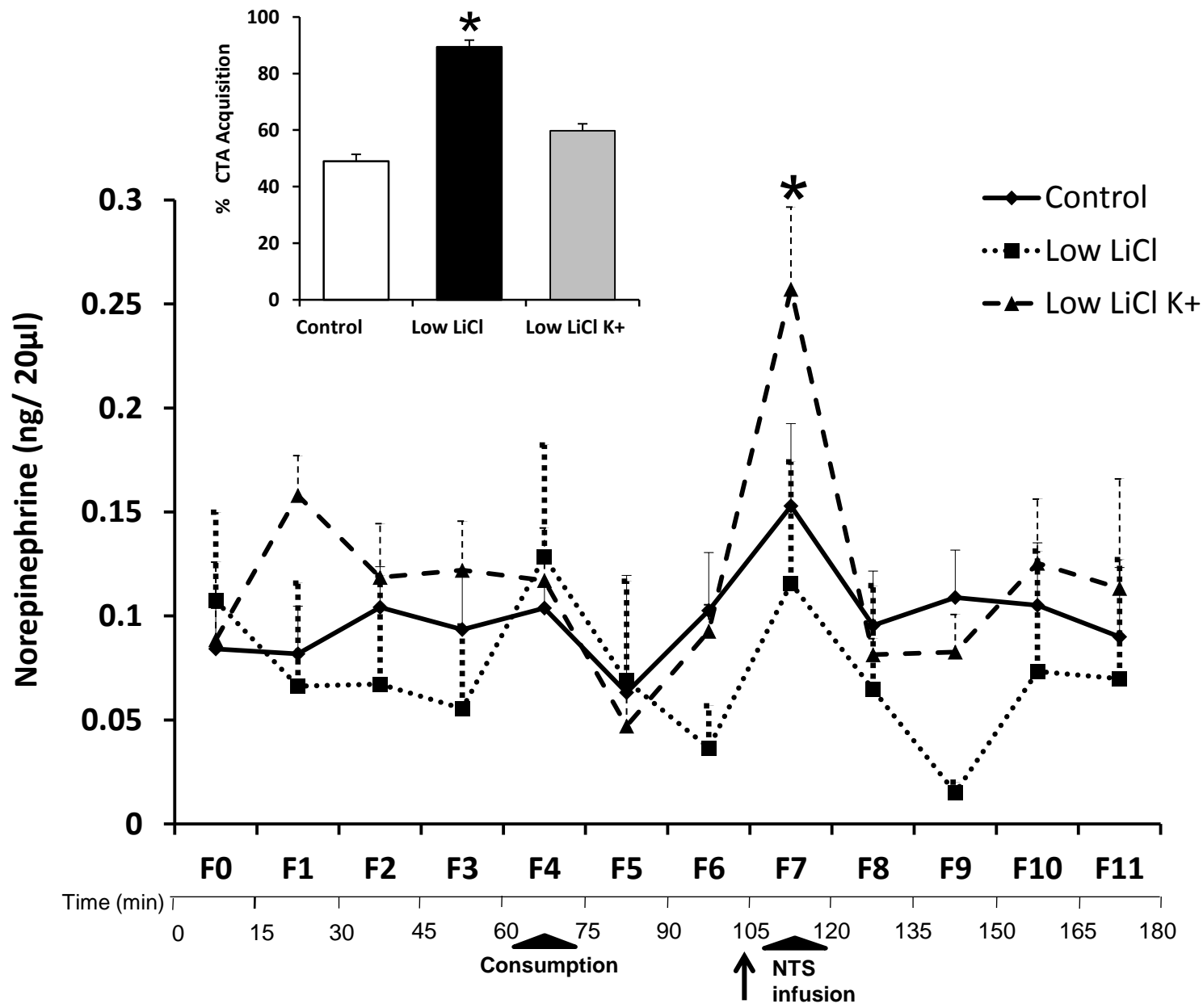


Figure 2.



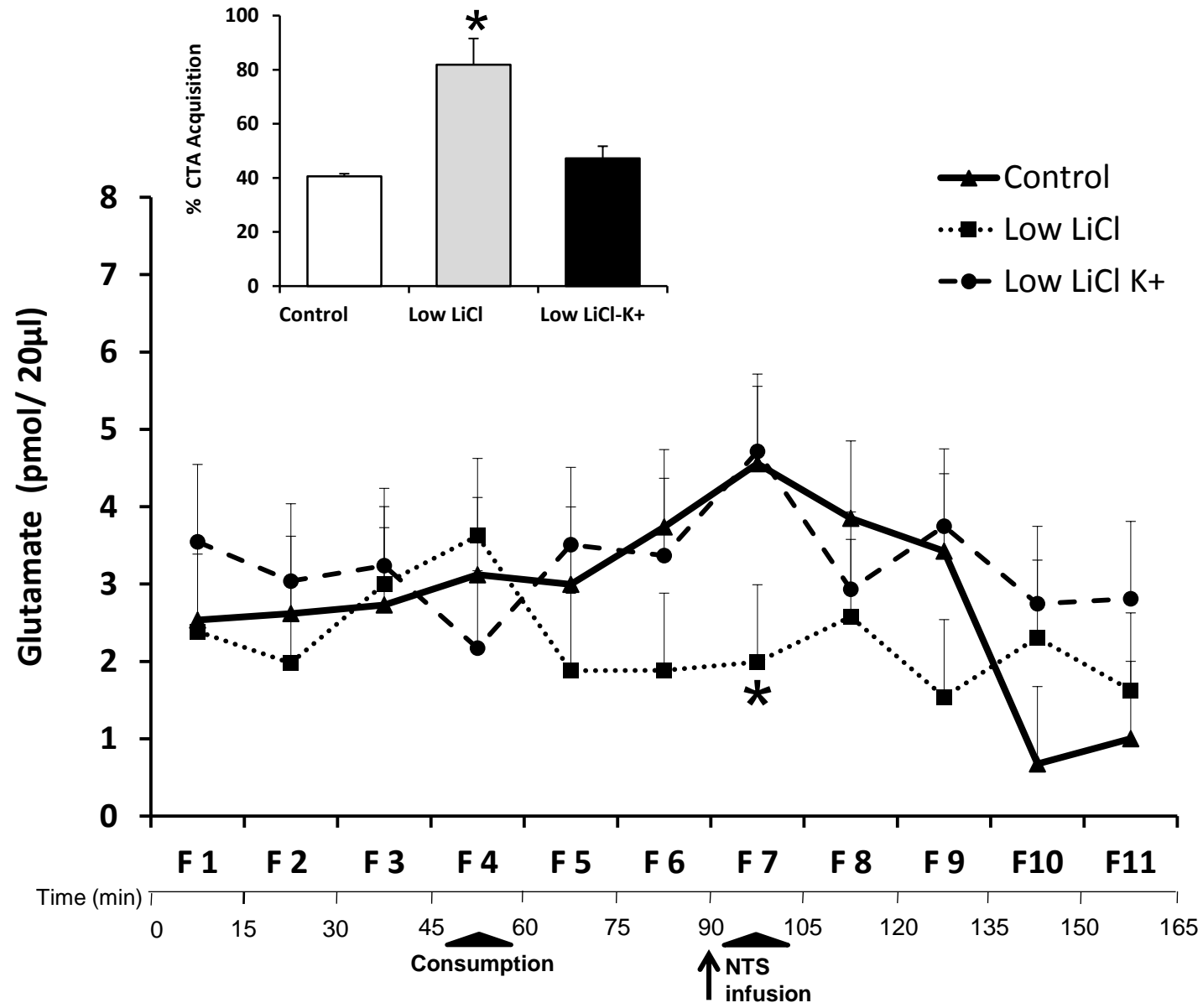


Figure 4.