



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Departamento de Neurobiología  
Conductual y Cognitiva

**“Interacciones histaminérgicas y colinérgicas en el núcleo basal  
magnocelular y la corteza insular durante la formación de la memoria  
al sabor aversivo”**

## T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**M. en C. Liliana Purón Sierra**

**Tutora Principal:**

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

**Miembros del comité tutor**

**Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez**  
Facultad de Psicología  
Ciudad Universitaria, Distrito Federal

**Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar**

Instituto de Neurobiología  
Departamento de Desarrollo y Neurofisiología  
Campus Juriquilla, Querétaro

Querétaro, Querétaro, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **Interacciones histaminérgicas y colinérgicas entre el núcleo basal magnocelular y la corteza insular durante la formación de la memoria al sabor aversivo**

---

P r e s e n t a:

**M. en C. Liliana Purón Sierra**

---

# ÍNDICE

---

<b>I. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS</b> .....	iii
<b>II. ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>III. RESUMEN</b> .....	vii
<b>IV. ABSTRACT</b> .....	viii
<b>V. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>VI. ANTECEDENTES</b> .....	11
<b>6.1 El sistema colinérgico</b> .....	11
6.1.1 Localización de sistema colinérgico.....	12
6.1.1.1 Neuronas de proyección.....	12
6.1.1.2 Circuitos locales.....	14
6.1.1.3 Receptores colinérgicos.....	15
<b>6.2 El sistema colinérgico en el aprendizaje</b> .....	17
<b>6.3 El condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS)</b> .....	20
6.3.1 Sustratos anatómicos del CAS.....	22
6.3.2 Corteza Insular.....	24
6.3.2.1 Localización anatómica de la corteza insular.....	25
6.3.3 Núcleo basal magnocelular (NBM).....	28
6.3.3.1 Grupos neuronales del NBM.....	29
6.3.3.2 Conexiones del NBM.....	30
6.3.4 Actividad colinérgica en el CAS.....	31
<b>6.4 El sistema histaminérgico</b> .....	34
6.4.1 Receptores para histamina en el SNC.....	37
6.4.2 La histamina en el aprendizaje.....	40
<b>6.5 Interacciones entre el sistema colinérgico e histaminérgico</b> .....	42
<b>VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	48
<b>VIII. HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	54
<b>XIX. HIPÓTESIS PARTICULARES</b> .....	54
<b>X. OBJETIVOS</b> .....	55
<b>XI. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES</b> .....	55

<b>XII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>12.1</b> Animales.....	57
<b>12.2</b> Inmunofluorescencia.....	57
<b>12.3</b> Implantación de cánulas.....	59
<b>12.4</b> Entrenamiento del Condicionamiento de Aversión al Sabor.....	60
<b>12.5</b> Procedimiento para microdiálisis en libre movimiento.....	61
<b>12.6</b> Inyecciones locales.....	62
<b>12.7</b> Análisis de Acetilcolina mediante HPLC.....	63
<b>12.8</b> Histología.....	64
<b>12.9</b> Análisis estadístico.....	65
<b>XIII. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>13.1</b> Verificación del sitio de sondas.....	67
<b>13.2</b> Localización de los receptores a histamina H <sub>3</sub> en la corteza insular.....	67
<b>13.3</b> Localización de los receptores a histamina H <sub>1</sub> en el NBM.....	68
<b>13.4</b> Co-localización de los receptores a histamina H <sub>3</sub> en células GABAérgicas de la CI.....	69
<b>13.5</b> Co-localización de los receptores a histamina H <sub>1</sub> en células colinérgicas del Núcleo basal magnocelular.....	69
<b>13.6</b> La inyección de RAMH en la CI, minutos antes de la adquisición del CAS no afecta la ejecución de la tarea.....	70
<b>13.7</b> La inyección de RAMH en la CI modifica la liberación de ACh durante la adquisición del CAS.....	72
<b>13.8</b> La administración de RAMH en la CI, antes de la adquisición del CAS afecta la evocación de la memoria del CAS.....	73
<b>13.9</b> La inyección de RAMH minutos antes de la adquisición del CAS afectan los niveles extracelulares de ACh en la corteza insular durante la evocación de la memoria.....	75
<b>13.10</b> La inyección de pirilamina en el NBM, antes de la adquisición del CAS no afecta la ejecución del CAS.....	76
<b>13.11</b> Inyecciones de pirilamina en el NBM durante la adquisición del CAS modifican la liberación de ACh en la CI.....	77
<b>13.12</b> La inyección de pirilamina durante la adquisición del CAS, impide la evocación de la memoria del CAS.....	79

13.13 La inyección de pirilamina en el NBM minutos antes de la adquisición del CAS afectan los niveles extracelulares de ACh en la CI durante la evocación de la memoria.....	80
<b>XIV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>82</b>
<b>XV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>XVI. REFERENCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>XVII. ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>104</b>
<b>XVIII. ANEXO: ARTÍCULO.....</b>	<b>107</b>

---

---

## **I. AGRADECIMIENTOS:**

---

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme el apoyo económico durante la realización de mi trabajo doctoral, en el instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Querétaro, Querétaro, juriquilla. CONACYT C54524, CONACYT 152208, PAPPIT IN220991. Becario No. 208245

A la Dra. Isabel Miranda Saucedo por todo el respaldo profesional que me brindó y por todas las facilidades para la realización de esta tesis.

A la técnico académico Dra. Gabriela Vera Rivera por su apoyo en la parte técnica e instrumental del HPLC para la detección de Acetilcolina. Gracias.

Al técnico laboratorista, Alejandro Rangel Hernández por su gran apoyo en el cuidado de mis animales y por su valiosa amistad. Gracias.

A la técnico Elsa Nydida Hernández Ríos, por su apoyo incondicional con el confocal, su tiempo y su amistad.

A Abraham Rosas Arellano por enseñarme, con toda la paciencia del mundo todo lo relacionado con las inmunofluorescencias. Mil Gracias j

Al M.V.Z. Martín García Servín por facilitarme los animales para la realización de esta tesis.

---

---

## DEDICATORIAS

---

---

A mi esposo Ernesto, por su infinita paciencia y todo el apoyo incondicional que me ha dado y me sigue dando todos los días, por su amistad, consejos, por todo lo que hemos pasados juntos y por todo lo que pasaremos hasta hacernos viejos.

A Larissa y Lía, por que llenan mi vida con sus risas, travesuras y peripecias, porque son todo para mí.

A mi hermana Ana, mi gran amiga, mi apoyo incondicional y por ser un gran aporte para que se llevara a cabo todo esto.

A mis padres Raquel Sierra y J. Ascensión Purón, por el apoyo con las pequeñas en momentos difíciles.

---

---

## II. ABREVIATURAS

---

---

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropinato
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la Varianza
<b>BASi</b>	Bioanalytical Systems
<b>BLA</b>	Amígdala basolateral
<b>CAB</b>	Cerebro anterior basal
<b>CAS</b>	Condicionamiento de Aversión a los Sabores
<b>CA1</b>	<i>Cornu Ammonis</i> 1 (región de hipocampo)
<b>ChAT</b>	Colina acetiltransferasa
<b>Ch4</b>	Región colinérgica 4
<b>CMA</b>	Microdialysis Company Harvard
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAO</b>	Diaminoxidasa
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>EC</b>	Estímulo condicionado
<b>EI</b>	Estímulo incondicionado
<b>GAD<sub>65</sub></b>	Glutamato descarboxilasa 65
<b>GABA</b>	Ácido gama- aminobutírico
<b>GMPc</b>	Guanosin monofosfato cíclico
<b>HDC</b>	Histidina descarboxilasa
<b>HMT</b>	Histamina metil transferasa
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Ejecución
<b>H<sub>1</sub></b>	Receptor a histamina 1
<b>H<sub>3</sub></b>	Receptor a histamina 3
<b>i.p.</b>	intraperitonealmente

<b>INB</b>	Instituto de Neurobiología
<b>LiCl</b>	Cloruro de Litio
<b>LTP</b>	Potenciación a Largo Plazo
<b>MAO</b>	Monoamina oxidasa
<b>mM</b>	milimolar
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>NBM</b>	Núcleo Basal Magnocelular
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NPB</b>	Núcleo parabraquial
<b>NVPM</b>	Núcleo ventral posteromedial del tálamo
<b>NTMH</b>	Núcleos tuberomamilares del hipotálamo
<b>NTS</b>	Núcleo del tracto solitario
<b>PBS</b>	Buffer fosfato
<b>PI</b>	Fosfatidil inositol
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PKA</b>	Proteín cinasa A
<b>PKC</b>	Proteín cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>RAMH</b>	R-alfa-metil-histamina
<b>RC</b>	Respuesta condicionada
<b>RI</b>	Respuesta incondicionada
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nerviosos Periférico
<b>TTX</b>	Tetradotoxina

---

---

### III. RESUMEN

---

---

Se ha mostrado que el sistema colinérgico puede modificar las propiedades funcionales de la corteza durante la formación de la memoria. Se ha encontrado un aumento en la actividad de Acetilcolina (ACh) extracelular, durante el procesamiento de un estímulo novedoso y esto no ocurre cuando se trata de un estímulo familiar, manifestando que el papel de este neurotransmisor es crítico durante las primeras etapas de la formación de una memoria. Este hecho ocurre también en la corteza insular (CI), una estructura importante para la formación de la memoria gustativa del condicionamiento de aversión al sabor (CAS), ya que recibe proyecciones colinérgicas, provenientes del núcleo basal magnocelular (NBM). Existe poca información sobre cómo se modula el sistema colinérgico en la CI durante la formación de una memoria gustativa. Reciente evidencia sugiere que el sistema colinérgico puede interactuar con otros sistemas como el sistema histaminérgico en aspectos críticos de la formación de una memoria. De modo que el presente estudio, evaluó la presencia de dos tipos de receptores para histamina:  $H_3$  en el CI y  $H_1$  en el NBM, así como la influencia de su actividad sobre la liberación de ACh en la CI durante el aprendizaje del condicionamiento de aversión al sabor (CAS). Resultados de inmunofluorescencia determinaron la presencia de los receptores  $H_3$  en la CI y  $H_1$  en el NBM. Utilizando la técnica de microdiálisis en libre movimiento se inyectaron un agonista del receptor  $H_3$ , R- $\alpha$ -metilhistamina (RAMH) en la CI o un antagonista del receptor  $H_1$ , pirilamina en el NBM durante el aprendizaje del CAS, mostrando, en ambos casos, una disminución en la liberación de ACh en el CI, durante la adquisición del CAS, correlacionada al impedimento en la formación de la memoria gustativa. Este estudio demostró que las proyecciones colinérgicas del NBM en la CI, se encuentran finamente sincronizados por la actividad histaminérgica de los receptores a histamina  $H_1$  en el NBM y  $H_3$  en la CI durante el aprendizaje del CAS.

---

---

## IV. ABSTRACT

---

---

The ability of acetylcholine (ACh) to alter specific functional properties of the cortex endows the cholinergic system with an important modulatory role in memory formation. For example, an increase in ACh release occurs during novel stimulus processing, indicating that ACh activity is critical during early stages of memory processing. During novel taste presentation, there is an increase in ACh release in the insular cortex (IC), a major structure for taste memory recognition. There is extensive evidence implicating the cholinergic efferents of the nucleus basalis magnocellularis (NBM) in cortical activity changes during learning processes, and new evidence suggests that the histaminergic system may interact with the cholinergic system in important ways. However, there is little information as to whether changes in cholinergic activity in the IC are modulated during taste memory formation. Therefore, in the present study, we evaluated the influence of two histamine receptor subtypes, H<sub>1</sub> in the NBM and H<sub>3</sub> in the IC, on ACh release in the IC during conditioned taste aversion (CTA). Injection of the H<sub>3</sub> receptor agonist R- $\alpha$ -methylhistamine (RAMH) into the IC or of the H<sub>1</sub> receptor antagonist pyrilamine into the NBM during CTA training impaired subsequent CTA memory, and simultaneously resulted in a reduction of ACh release in the IC. This study demonstrated that basal and cortical cholinergic pathways are finely tuned by histaminergic activity during CTA, since dual actions of histamine receptor subtypes on ACh modulation release each have a significant impact during taste memory formation.

# INTRODUCCIÓN

---

---

---

## V. INTRODUCCIÓN

---

El aprendizaje es un proceso mediante el cual se manifiestan cambios adaptativos en la conducta individual, como resultado de una experiencia, estos cambios en la conducta pueden ser relativos o permanentes, los cuales permiten la adaptación y sobrevivencia del individuo en el medio, pues las nuevas conductas pueden ser utilizadas para subsistir y resolver nuevos retos. Al almacenamiento de la información aprendida se le conoce como memoria (McGaugh, 1973).

Las investigaciones relacionadas al aprendizaje y la memoria, han utilizando modelos de la psicología cognitiva y la biología experimental para tratar de comprender los procesos biológicos que ocurren en el cerebro, mientras un individuo aprende. Los resultados de estos estudios han permitido generar hipótesis sobre cómo se conjuntan y organizan circuitos especializados, en el procesamiento de la información y como se lleva a cabo su almacenamiento (Purves et al., 2007).

De tal manera, se conoce que el aprendizaje y la memoria dependen de un proceso neuroquímico continuo, que los neurobiólogos han descrito en tres fases: La adquisición o aprendizaje, la consolidación y la recuperación o la evocación de la información (Kandel et al., 2012), las cuales se describen a continuación.

El proceso de adquisición, se inicia cuando el sujeto está expuesto a uno o varios estímulos, mismos que al ser procesados a nivel central, acoplan mecanismos neuronales entre varias estructuras, para que la información derivada de la experiencia sea almacenada (Kandel et al., 2012).

Durante la consolidación de la información, se llevan a cabo eventos bioquímicos que conducen la expresión de genes, síntesis de nuevas proteínas, así como modificaciones neuronales que favorecen el almacenamiento de la información de manera perdurable, permitiendo la evocación de la memoria cuando se requiera (Sweatt, 2010).

Se ha mostrado que la memoria puede presentarse en dos formas: una a corto plazo y otra a largo plazo. En la memoria a corto plazo, la información es transitoria y/o lábil, carente del proceso de consolidación, pues permanece sólo por instantes, segundos o minutos y sólo puede usarse por un tiempo limitado (Bermúdez-Rattoni et al., 2001). En cambio la memoria a largo plazo, es una memoria lo suficientemente robusta, que permite que la información procesada pueda persistir por un largo tiempo: meses, años e incluso toda la vida, gracias al proceso de consolidación (McGaugh, 1973).

Se ha mostrado que la evocación de una memoria, involucra la activación de las mismas áreas cerebrales y de otras más, que procesaron la información adquirida. La evocación resulta más eficaz, cuando se produce en el mismo contexto y en presencia de las claves o estímulos similares presentes durante el aprendizaje (Byrne et al., 2009).

Desde el punto de vista de la psicología experimental, existen dos tipos de aprendizaje que permiten comprender la naturaleza de los cambios conductuales en el individuo (Figura 1).



Figura 1. Clasificación de aprendizaje. El esquema muestra dos tipos de aprendizaje: Asociativo y No Asociativo. El aprendizaje asociativo se forma por la asociación de estímulo-respuesta, a su vez este tipo de aprendizaje se divide en dos grandes clasificaciones: condicionamiento instrumental y clásico. El aprendizaje no asociativo se basa en el aprendizaje involuntario de las características del estímulo, como modalidad, intensidad y frecuencia (Modificado de Bermúdez-Rattoni et al., 2001).

El aprendizaje no asociativo, es aquel aprendizaje que ocurre cuando el individuo está expuesto un estímulo aislado, por lo que el sujeto aprende a conocer las características particulares de ese estímulo sin asociarlo a ninguna consecuencia. Este tipo de aprendizaje se subdivide en: la habituación y la sensibilización (Sweatt, 2010).

La *habituación* es una disminución en la respuesta conductual del sujeto, ante un estímulo de la misma modalidad, intensidad y frecuencia, presentado en repetidas ocasiones (Kandel, 2012). Por ejemplo, un sujeto se sobresalta cuando escucha por primera vez el silbido del tren. Si el ruido continúa escuchándose de manera constante por un largo tiempo, el sujeto termina acostumbrándose al ruido y ya no se sobresalta, pues el sujeto ha aprendido las propiedades de ese estímulo frecuente.

Por su parte, la *sensibilización* es entendida como la respuesta incrementada del sujeto frente a una variedad de diferentes estímulos, luego de una primera experiencia con un estímulo intenso o nocivo. Por ejemplo, un sujeto responde de forma más enérgica a un estímulo táctil, después de haber recibido un pellizco doloroso como primer estímulo. Así pues, la sensibilización puede anular los efectos de la habituación. Cuando sucede esto se le conoce como *deshabitación*. La deshabitación, consiste entonces en la recuperación de la respuesta inicial del individuo ante diferentes estímulos ambientales que pueden ser de diferentes modalidades (Sweatt, 2010).

Algunos autores sugieren que el aprendizaje no asociativo, es un proceso de aprendizaje que pasa inadvertido por el sujeto, al igual que su evocación, pues el sujeto puede ejecutar una acción aprendida sin que éste se encuentre consciente de su expresión (McGaugh, 1973).

A diferencia del aprendizaje no asociativo, el aprendizaje asociativo, es aquel que permite establecer una relación entre uno o varios estímulos, con su respuesta o consecuencia (Bermúdez-Rattoni et al., 2001).

De acuerdo a la naturaleza de la respuesta, se han definido dos tipos de aprendizaje asociativo: el *condicionamiento clásico*, que implica establecer una relación de estímulo-respuesta y *el condicionamiento operante o instrumental*, que modifica una conducta original del individuo como resultado de un reforzamiento; para el condicionamiento instrumental las respuestas del sujeto son controladas por las consecuencias y no por los estímulos que las anteceden (McGaugh, 1973). Ambos paradigmas han sido utilizados en el ámbito de la investigación experimental, para el estudio biológico, fisiológico y psicológico del aprendizaje y la memoria, por lo que serán explicados brevemente.

El *condicionamiento clásico*, fue implementado y estudiado por el fisiólogo Iván Pavlov, quien interesado en estudiar la fisiología del sistema digestivo, descubrió este tipo de aprendizaje asociativo. El experimento más conocido del condicionamiento clásico, fue el realizado con perros como modelo experimental. En estos experimentos, se hacía sonar una campana como estímulo condicionado (EC) a perros hambrientos, justo antes de darles el alimento, que funcionaba como estímulo incondicionado (EI). Los perros naturalmente comenzaban a salivar, siendo ésta una respuesta incondicionada (RI). Luego de varias presentaciones del EC antes y del EI (alimento), los perros fueron capaces de asociar el sonido del EC con el EI, convirtiendo la RI de salivación en una respuesta condicionada (RC). Posteriormente, cuando los animales escuchaban el EC, los animales producían una RC (Sweatt, 2010).

La esencia del condicionamiento clásico se encuentra en la asociación de dos estímulos: el *EC*, que puede ser una luz, un sonido, un estímulo táctil, entre otros asociado a una *RC*, que es respuesta fisiológica innata como la salivación, sed, doblez o retiro de extremidad, etc. Cuando el individuo es expuesto por primera vez a un EC, se producen solo respuestas fisiológicas, por lo que se requiere de sucesivas presentaciones del EC seguidas del EI (alimento, agua, etc.), para provocar que el EC se convierta en una señal anticipadora del EI, suscitando una RC (salivación, parpadeo o retiro de extremidad) (Shaw, 1990).

Una de las aportaciones del aprendizaje asociativo del condicionamiento clásico al ámbito de la biología experimental, es que la asociación de “estímulo-respuesta”, permiten la

explicación y reproducción de aprendizajes predictivos, en ambientes controlados de estudio donde se utilizan descargas eléctricas, como estímulos nocivos y alimentos o agua como estímulos positivos, ambos facilitadores de una conducta determinada, además de que se pueden entrenar sujetos de distintas especies, para la medición de distintas respuestas incondicionadas (Sweatt, 2010).

Basados en estos conceptos aparece una segunda clasificación de aprendizaje planteado por E. Thordinke y estudiado sistemáticamente por (Skinner, 1974), el cuál fue nombrado condicionamiento instrumental u operante. Este tipo de aprendizaje asociativo propone una modificación de la conducta del sujeto ante los estímulos que se le presenten, los cuales pueden reforzar o reprimir la aparición de dichas conductas (Skinner, 1974).

Al contrario de la relación predictiva del condicionamiento clásico, que examina la tendencia de las respuestas reflejas, el condicionamiento operante analiza y estudia los cambios en la conducta que se producen espontáneamente como respuesta a un estímulo identificable. A este condicionamiento también se le ha nombrado como aprendizaje de “ensayo y error”, pues se dice que las conductas operantes son emitidas, en lugar de provocarlas y el sujeto aprende con base en sus errores (McGaugh, 1973).

El primero en acuñar el término de ensayo y error fue Thordinke, (1903) quien gracias a sus estudios de laboratorio realizados con gatos privados de alimento, demostró la importancia de un reforzador positivo. En este experimento los gatos hambrientos se encontraban confinados en una caja de madera y tenían que aprender a abrir el pestillo de la puerta, para encontrar comida en el exterior, la cual funcionaba como un reforzador positivo. De modo que los gatos tenían que hacer uso de sus habilidades con las patas (conducta innata) para abrir la puerta y alcanzar el alimento (Thorndike,1903).

En otros experimentos, Skinner (1974), utilizó ratas privadas de alimento, y también mostró la importancia de un reforzador positivo para que la conducta, que originó la recompensa, se repita. Las ratas hambrientas eran introducidas en un campo abierto, en donde manifestaban su conducta exploratoria de manera aleatoria. Casualmente la rata presionaba una palanca, misma que le permitió obtener alimento, lo que generó la

repetición de esta conducta para obtener más alimento que funcionaba como reforzador (Skinner, 1974).

Gracias a los experimentos de Thorndike, (1903) y Skinner, (1974) se lograron sentar las bases para el condicionamiento instrumental u operante. En este tipo de aprendizaje, los animales deben recibir inmediatamente después de modificar su conducta (presionar la palanca o abrir un pestillo de la puerta) un reforzador positivo como la comida, para incrementar la probabilidad de que esa conducta particular, se repita o, en otro caso, un reforzador negativo como un choque eléctrico para evitar acercarse a la comida. De modo que si el reforzador se retrasa demasiado, entonces el condicionamiento se debilita y la conducta se pierde. Por lo tanto se requiere de una secuencia de tiempo óptima para que se aprenda la tarea (Skinner, 1974).

Durante mucho tiempo se pensó que el aprendizaje asociativo se podía inducir de manera arbitraria, eligiendo sólo dos estímulos al azar; sin embargo, estudios recientes han mostrado que el aprendizaje asociativo sea clásico u operante, se encuentra limitado de acuerdo al tipo de estímulo que recibe el sujeto, pues los individuos aprenden a asociar sólo aquellos estímulos relevantes para su supervivencia, de acuerdo a las necesidades de la especie y de su ambiente; de modo que los factores genéticos de la especie, presentes en el individuo juegan un papel fundamental para el aprendizaje asociativo de ciertos tipos de experiencias según la especie (Kandel et al., 2012).

Los modelos del condicionamiento clásico u operante, establecieron las bases sistemáticas, para el análisis observacional de la conducta de los animales en un laboratorio, permitiendo el surgimiento de protocolos que pueden generalizarse a cualquier especie. Quien también, hizo uso de las bases sistémicas del aprendizaje asociativo para la comprensión de la memoria fue Karl Lashley, quien se dedicó a localizar el engrama o trazo de la memoria en el cerebro de ratas (Lashley, 1950).

Lashley, (1950) realizó lesiones en la corteza frontal de ratas y a los pocos días después de que los animales se recuperaron de la cirugía, fueron entrenados en una tarea sencilla de aprendizaje, como el laberinto de múltiples pasillos. En esta tarea el animal tenía que

recorrer el laberinto, evitando entrar en el pasillo equivocado para llegar a la salida, donde había alimento que funcionaba como reforzador de la conducta. Lashley, observó con asombro que a pesar de que los animales tenían lesiones extensas en la corteza, podían recorrer el laberinto en forma normal. Sin embargo, si realizaban lesiones más grandes y bilaterales que abarcaban la corteza frontal y la corteza parietal, los animales presentaban serias dificultades en el aprendizaje del laberinto. Posteriormente al observar los resultados de los estudios histológicos de las lesiones producidas en el cerebro, Lashley notó que éstas también afectaban al hipocampo (una estructura perteneciente al sistema límbico, muy relacionada con la memoria) (Lashley, 1950).

Lashley concluyó que las lesiones corticales pequeñas no tenían efectos en la ejecución de la tarea y para que así fuera, se necesitaba realizar lesiones más grandes. Posteriormente, repitió los experimentos en monos, obteniendo los mismos resultados, por lo que concluyó que la memoria se almacena de forma difusa en toda la corteza cerebral y que no podía localizarse en un sitio en particular (Lashley, 1950).

Actualmente, la hipótesis generada por M. Hasselmo y colaboradores, plantea una excelente respuesta a los cuestionamientos de Lashley, pues proponen que la memoria no se encuentra ubicada en alguna estructura particular del cerebro, sino más bien, está distribuida en varios y complejos circuitos neuronales, los cuales son activados cada vez que se extraen memorias antiguas o se almacena información nueva (Hasselmo et al., 2000).

El uso de las técnicas de la psicofarmacología y la microdiálisis en conjunto con modelos de aprendizaje asociativo, han permitido comprobar hipótesis como la de Hasselmo et al., (2000). Por medio del uso de drogas antes o durante el entrenamiento de tareas, así como el análisis de la neuroquímica cerebral en distintas áreas del cerebro, se ha logrado comprender la función y organización de diversas estructuras que procesan la información procedente de los estímulos presentes en el aprendizaje para la formación de la memoria. Los resultados de estas investigaciones, han mostrado que uno de los sistemas más

importantes para el ámbito conductual y cognitivo es el sistema colinérgico (Hasselmo et al., 2000), el cuál se describirá con mayor detalle en el apartado siguiente.

# ANTECEDENTES

---

---

---

## VI. ANTECEDENTES:

---

### 6.1 El Sistema colinérgico

La Acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor en ser descubierto y ha sido ampliamente estudiado. Inicialmente se identificó como un posible mediador de la función celular por Hunt en 1907; para 1914 Sir Henry Dale, aisló y caracterizó la ACh mostrando que tiene la capacidad de regular las acciones parasimpáticas del sistema nervioso periférico (SNP) y que dichas acciones variaban de acuerdo al tipo de tejido. Observaciones posteriores de Otto Loewi en 1921, permitieron demostrar que la liberación de ACh provenía de la estimulación nerviosa, con un elegante y simple experimento con corazones de ranas. Loewi diseccionó dos corazones de rana, uno de ellos con el nervio vago, posteriormente perfundió ambos corazones con una solución salina o de Ringer. En este estado los corazones continuaron latiendo por varias horas. El corazón que conservaba el nervio vago fue estimulado eléctricamente, lo que ocasionó la salida de un líquido que provocaba un enlentecimiento de los latidos cardiacos. Loewi recogió el líquido del primer corazón y lo aplicó al segundo corazón, provocando el enlentecimiento del ritmo cardíaco en el segundo corazón. Loewi llamó a esta sustancia *Vagusstoff* o “sustancia vagal”. Más tarde se comprobó que se trataba de la acetilcolina (Brady et al., 2012).

Actualmente se sabe que ACh, tiene la función de regular la acción motora de vertebrados y que es el principal neurotransmisor en los ganglios periféricos del sistema nervioso autónomo (Byrne et al., 2009), además de modular el ciclo sueño-vigilia, la atención, plasticidad y memoria en el SNC (Pepeu et al., 2009).

La ACh es sintetizada en las terminales nerviosas a partir de la acetilcoenzima A (acetil CoA) y colina, en una reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Por lo tanto, la presencia de ChAT en una neurona, es un indicador de que ACh es sintetizada en esa célula. La recaptación de la ACh en la hendidura sináptica, está dada por la potente

enzima hidrolítica conocida como la acetilcolinesterasa (AChE), lo que asegura una rápida disminución de la concentración de ACh, después de su liberación desde la terminal presináptica. La AChE tiene una actividad catalítica muy alta, pues una sola enzima de AChE, hidroliza 5,000 moléculas de ACh por segundo (Purves et al., 2007).

Buscando mapear las rutas y núcleos colinérgicos del cerebro, se utilizaron técnicas como la inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, dirigidas a la AChE. Sin embargo, los resultados de estos estudios fueron inexactos debido a que la AChE, no solo se encuentra en la hendidura sináptica, sino también en neuronas no colinérgicas (Trevor, 1995). Para la década de 1980, los anticuerpos específicos para la ChAT fueron viables y se utilizaron para definir por primera vez los núcleos colinérgicos, además del uso de diversos trazadores para conocer las proyecciones de estos núcleos hacia diversas áreas del cerebro de distintos mamíferos (Descarries et al., 2004).

### **6.1.1 Localización del sistema colinérgico**

Varios grupos de investigadores mostraron la morfología y distribución de los núcleos productores de ACh en el SNC. Estos núcleos fueron divididos en dos para su estudio, de acuerdo al tipo de neuronas que contienen: neuronas de proyección o interneuronas de circuitos locales (Mesulam et al., 1983a).

#### **6.1.1.1 Neuronas de proyección**

Las neuronas de proyección se han clasificado en seis grupos (Ch1-Ch6), de acuerdo a los trabajos de Mesulam et al., (1983a) y se encuentran distribuidas rostro-caudalmente desde el bulbo olfatorio hasta la parte posterior del pedúnculo cerebral. Los principales grupos colinérgicos se encuentran en el complejo del cerebro anterior basal (CAB), los cuales inervan ampliamente a la neocorteza, hipocampo, amígdala y bulbo olfatorio (Trevor, 1995).

El sector Ch1, es el grupo más pequeño de los seis grupos y se conforma por neuronas contenidas en el *septum* medial, estas neuronas proyectan principalmente hacia el hipocampo. El sector Ch2 consiste en neuronas pertenecientes al área del núcleo vertical de la banda diagonal de Broca, estas células se encuentran al lado del núcleo del *septum* medial del sector Ch1, por lo que también proyectan ACh hacia el hipocampo. Las células del grupo Ch3 se encuentran en el núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca. La parte lateral de este sector, proyecta hacia el bulbo olfatorio y una porción medial de este núcleo es una continuación del sector Ch2, los cuales proyectan hacia la corteza piriforme, el cíngulo y corteza entorrinal. El sector Ch4 se encuentra distribuido en la sustancia *inominata*, globo pálido, núcleo basal magnocelular (NBM) y porciones de la cápsula interna, cabe destacar que el NBM, es el principal núcleo de éste sector, pues sus células colinérgicas proyectan al manto cortical y la amígdala (Mesulam et al., 1983a).

Las neuronas pertenecientes a los grupos Ch5 y Ch6 se encuentran en el tallo cerebral y constituyen el principal componente del sistema reticular activador ascendente. Las neuronas del grupo Ch5 se encuentran en la región de los pedúnculos pontinos, continúa a la formación reticular y a la sustancia negra. El grupo Ch6, está conformado por los grupos de células localizados en el núcleo tegmental laterodorsal. Tanto los grupos Ch5, como los grupos Ch6 inervan al diencefalo y telencefalo incluyendo al colículo superior, tálamo, núcleo preóptico, entre otras estructuras del cerebro medio (Mesulam et al., 1983a) (Figura 2).

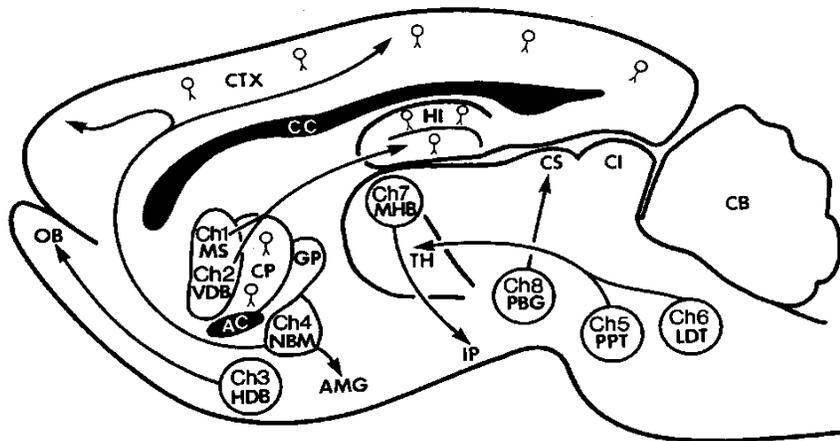


Figura 2. Principales grupos colinérgicos y sus proyecciones en un plano sagital de cerebro de ratona. Las neuronas colinérgicas centrales han sido subdivididas para su estudio en seis regiones llamadas Ch1-Ch6, los cuales se encuentran también en humanos y monos. El sector Ch1 corresponde a las células del *septum* medial (MS); Ch2 corresponde al núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (VDB). Estos dos núcleos proyectan principalmente al hipocampo. El sector Ch3 corresponde al núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB), el cual proyecta principalmente hacia el bulbo olfatorio. Ch4 está formado por un sector compuesto por la sustancia innominata, globo pálido y el núcleo basal magnocelular (NBM), este sector proyecta tanto a la amígdala basolateral (AMG), como a toda la neocórtex. Ch5 se encuentra formado por los núcleos de los pedúnculos pontinos (PPT); Ch6 está conformado por el núcleo tegmental laterodorsal (LDT), estos dos núcleos proyectan principalmente al hipotálamo lateral (TH); el grupo Ch7 conformado por el núcleo medial habenuar (MHB) el cual proyecta hacia el núcleo interpeduncular (IP) y por último el Ch8 conformado por el núcleo posterior de la comisura magnocelular (PBG) que proyecta hacia el colículo superior (CS). Corteza (CTX), hipocampo (HI), Caudado putamen (CP), Globo Pálido (GP), Bulbo olfatorio (OB), Colículos superiores (CS), Núcleo Accumbens (NAcc-AC), Cuerpo Calloso (CC), cerebelo (CB) (Mesulam et al., 1983a).

### 6.1.1.2 Circuitos locales

Los circuitos locales se encuentran ampliamente distribuidos en las diversas estructuras. Se ha encontrado neuronas multipolares que forman circuitos locales en el caudado-putamen, el estriado, núcleo accumbens (NAcc), tubérculo olfatorio y el complejo de la isla de Callejas (Mesulam et al., 1983a).

Aunque muchas de las inervaciones colinérgicas del hipocampo provengan del *septum* medial y de la banda vertical de Broca, también se han encontrado circuitos locales de neuronas colinérgicas en el hipocampo (Blaker et al., 1988; Frotscher et al., 1986), al igual que en la neocórtex (Houser et al., 1983; Eckenstein et al., 1983), además de pequeños circuitos colinérgicos en el diencefalo, particularmente en el epitálamo y la habenua medial (Trevor, 1995).

La función de estos circuitos locales, al igual que la activación de diversas áreas cerebrales debida a las neuronas de proyección, están dadas por el tipo de receptores de ACh. Por lo que simultáneamente a los estudios anatómicos de los núcleos colinérgicos, se investigaron a detalle los tipos de receptores para ACh y los efectos que éstos ocasionan.

### **6.1.1.3 Receptores colinérgicos**

Basados en los efectos de los alcaloides naturales como la nicotina proveniente del tabaco o la muscarina, proveniente del hongo *amanita muscaria*, se encontró que la ACh posee dos tipos de receptores llamados nicotínicos y muscarínicos (Brady et al., 2012).

Los receptores nicotínicos para ACh, forman un canal constituido por 5 subunidades denominadas  $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma, \delta$ , las cuales constituyen un poro central por el cual se conducen cationes cuando ACh se une principalmente a las subunidades  $\alpha$ , provocando respuestas rápidas y breves (Changeux, et al., 1984; Brejc et al., 2001). Se ha mostrado que estos receptores se encuentran ubicados fundamentalmente en la parte postsináptica de la placa neuromuscular y que se encargan de iniciar la contracción muscular (Brady et al., 2012).

En el SNC los receptores nicotínicos se encuentran distribuidos en toda la corteza cerebral, tálamo, el núcleo interpeduncular y en menor medida en áreas del cerebro medio como la amígdala, su acción principal es la de provocar la liberación de neurotransmisores como ACh, serotonina, noradrenalina, dopamina y otros (Criado, 2011).

Los receptores muscarínicos están constituidos por una proteína transmembranal que contiene siete segmentos generalmente conservados, un asa intracelular en los segmentos 5-6, la cuál se encuentra unida a una proteína G. Se han descrito cinco subtipos de receptores muscarínicos denominados  $M_1$ - $M_5$ , todos ellos metabotrópicos acoplados a proteínas G (Brady et al., 2012). La activación de estos receptores se caracterizan por sus respuestas prolongadas, debido a la actividad de la cascada de cinasas, inducidas por la

activación de las proteínas G, cuyas acciones incluyen la activación del adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC).

Estudios de las consecuencias de la ingesta de alcaloides como la atropina y la escopolamina, permitió estudiar el efecto de los receptores muscarínicos en el cuerpo humano, sin embargo los efectos eran dispersos y poco específicos, por lo que estudios farmacológicos más especializados de estos alcaloides naturales, permitió la generación de antagonistas sintéticos más puros y específicos para los receptores muscarínicos, como la pirenzepina. El estudio particular de la pirenzepina y sus efectos, proporcionó las bases para la diferenciación de los subtipos de receptores muscarínicos, puesto que los receptores que mostraron altos sitios de afinidad a la pirenzepina fueron nombrados  $M_1$ , mientras los que presentaron baja afinidad fueron nombrados  $M_2$  (Hammer et al., 1980).

Para conocer la localización en el cerebro de los receptores  $M_1$ , se realizaron estudios de autoradiografía utilizando pirenzepina [ $H^3$ ]. Los resultados de estos trabajos mostraron altas densidades de éstos receptores en la corteza cerebral, giro dentado del hipocampo, caudado-putamen, el núcleo olfatorio anterior, NAcc; moderadas concentraciones en la amígdala basolateral (BLA), áreas CA3 y CA4 de hipocampo, mientras que bajas concentraciones en el área del NBM, núcleo del septum, banda horizontal y vertical de broca (Schwab et al., 1992).

Utilizando estudios similares con el fármaco AF-DX 116 [ $H^3$ ], radioligando específico para marcar los receptores  $M_2$ , se encontró una distribución de estos receptores, en áreas de los núcleos talámicos, los colículos superiores, el hipotálamo dorsomedial, el núcleo septal, el bulbo olfatorio, el núcleo motor del trigémino que mostraron grandes densidades del fármaco tritiado (Wang et al., 1989).

También se uso hexahidro-sila-difenidol (HHSD) [ $H^3$ ], fármaco dirigido a los receptores  $H_3$ , el cual permitió observar una distribución de los receptores  $M_3$  en el cerebro de rata. Encontrando de un 20% a 30% del total de la densidad de todos receptores muscarínicos, en el tubérculo olfatorio, estriado, NAcc, tálamo e hipocampo, estas observaciones fueron

consistentes con estudios posteriores realizados con mRNA mensajero para M<sub>3</sub> (Bran et al., 1988).

Los radioligandos farmacológicos para los estudios de los receptores M<sub>4</sub>, mostraron una distribución del 40% de los receptores M<sub>4</sub> en el estriado y una muy baja proporción en corteza e hipocampo (Waelbroek, et al., 1990).

Aunque se ha descrito la presencia de los receptores M<sub>5</sub>, los estudios de la localización de estos receptores han sido escasos, pues aún no se establece la localización específica en las áreas del cerebro, pero se ha asociado a nivel periférico con la actividad de los vasos endoteliales (Vilaró et al., 1990).

En resumen, los estudios anatómicos y estructurales permitieron conocer la distribución de los núcleos colinérgicos, la proyección de sus fibras en áreas específicas del cerebro, así como la distribución de los subtipos de receptores, pero aún queda por conocer cuál es la importancia de estos receptores y cuáles son las acciones específicas del sistema colinérgico, sobre procesos cognitivos como la atención, memoria y aprendizaje. Por lo que a continuación se describirán algunos de los muchos trabajos que ponen en claro el papel modulador del sistema colinérgico en el aprendizaje y la memoria de tareas asociativas.

## **6.2 El sistema colinérgico en el aprendizaje**

La activación de los receptores muscarínicos, se ha asociado con la regulación de la actividad colinérgica en varios procesos cognitivos. Se ha descrito que el uso de antagonistas colinérgicos en diversas áreas interrumpe la actividad colinérgica, lo que conduce a la imposibilidad de formar y expresar una memoria.

Uno de los antagonistas colinérgicos más utilizados para estudios de aprendizaje es la escopolamina. Se ha demostrado que la administración intraperitoneal (i.p.), de este antagonista impide el aprendizaje del laberinto elevado, ya que el efecto del fármaco

incrementa el tiempo de exposición en el brazo abierto el día de la evocación de la tarea (Kruk et al., 2012). Además se encontró que la inyección de escopolamina en la corteza entorrinal medial, reduce las frecuencias gama y teta asociadas con la excitación neuronal en la corteza, en la fase de consolidación de una memoria (Newman et al., 2013).

También se mostró que la administración de atropina o escopolamina, bloquea el efecto excitador de ACh en la corteza, inducido por una estimulación eléctrica en el área colinérgica del CAB (Détari et al., 1999, Golmayo et al., 2003, Metherate et al., 1993). Estos trabajos sugieren que los receptores colinérgicos pueden regular la excitación neuronal cortical, necesaria para promover los mecanismos de consolidación de varias tareas.

Otra forma de estudiar el sistema colinérgico es mediante lesiones de neuronas o núcleos colinérgicos utilizando inmunotoxinas, que pueden actuar de manera específica sobre las neuronas colinérgicas, ocasionando excitotoxicidad por la activación de los receptores NMDA. Se ha reportado que el uso de 192 IgG saporina (una toxina selectiva para la destrucción de neuronas colinérgicas), ocasionó una pérdida completa de las proyecciones de ACh en la corteza y el hipocampo, así como un impedimento para formar la memoria del laberinto acuático de Morris (Gonzalez et al., 2000). Además cuando se inyectó bilateralmente, 192 IgG saporina en el NBM, se observó una disminución de la atención en una tarea visual y olfativa (Ljbojevic et al., 2014).

También se mostró que el uso de ácido quisquálico inyectado en el NBM, impide el aprendizaje de la evitación inhibitoria y reduce significativamente los niveles de ACh cortical (Dunnett et al., 1991).

En otros estudios se mostró que cuando se inyecta el ácido iboténico en el septum medial, en la banda diagonal de Broca y en el NBM, se impide la discriminación visual y espacial de una tarea, mostrando que estas áreas colinérgicas son necesarias en los procesos de atención en una tarea de discriminación visual (Voytko et al., 1994).

Otros trabajos encontraron que ratones knockout para los receptores muscarínicos M<sub>1</sub>, son capaces de ejecutar tareas de discriminación visual de dos opciones, reconocimiento al objeto y laberinto acuático de Morris; pero no lograron evocar estos tipos de memoria para estos modelos, sugiriendo que la función de los receptores muscarínicos M<sub>1</sub>, esta relacionada a la consolidación de la memoria (Bartko et al., 2011).

A través de estudios de microdiálisis se ha analizado la participación de diversos neurotransmisores involucrados en la formación de la memoria. Analizando los trabajos de varios autores se ha encontrado que los niveles extracelulares de ACh, favorecen la activación de los mecanismos intrínsecos neuronales en diversas áreas cerebrales durante la atención y ejecución de respuestas en distintos tipos de aprendizaje.

Se ha mostrado que el incremento en la dificultad del aprendizaje, de una tarea operante induce la liberación de ACh, de acuerdo a la demanda de atención de la rata (Himmelheber et al., 2000). De manera similar, se observó un marcado incremento de ACh cortical, durante la ejecución de una tarea operante, que requiere atención sostenida para obtener alimento como recompensa (Kozak et al., 2006).

Por otro lado, la atención en el aprendizaje de pistas visuales asociadas a una recompensa alimenticia, durante el aprendizaje de una tarea, también esta relacionada con incrementos de la actividad colinérgica en la corteza prefrontal (Parikh et al., 2007). Estos resultados sugieren que la ejecución sostenida por la motivación, está relacionada al aumento de la actividad de las terminales colinérgicas en la corteza.

El incremento de ACh cortical, también se ha observado cuando el sujeto es expuesto a ambientes novedosos. Interesantemente, se reportó que cuando un animal es colocado en un ambiente novedoso, hay un gran incremento de ACh extracelular en la corteza cerebral e hipocampo, asociado con la actividad exploratoria del animal en campo abierto (Giovannini et al., 2001) y laberinto en Y (Giovannini et al., 1997). Esto también se ha encontrado en las interneuronas del estriado dorsomedial, cuando un animal es expuesto a un laberinto con recompensa (Ragozzino et al., 2009).

Pero no solamente el ambiente novedoso incrementa los niveles de ACh, sino todos los estímulos novedosos con los que se encuentra el sujeto experimental. Por ejemplo, la estimulación táctil, auditiva o visual induce un incremento de ACh en la corteza parietal. Sugiriendo que la ACh se encarga de procesar el estímulo novedoso (Inglis et al., 1995; 1994; Acquas et al., 1996).

Interesantemente, se ha descrito que durante la habituación a un estímulo, provocada por la repetida exposición a un ambiente o estimulación sensitiva, no se observan cambios extracelulares de ACh en el cerebro (Acquas et al., 1996; Giovannini et al., 1997; Forunier et al., 2004), pues la información novedosa ya ha sido procesada.

Estos trabajos muestran que el incremento de ACh extracelular, juega un papel importante en el mantenimiento de atención, ejecución de tareas operantes y espaciales y generación de respuestas condicionadas recién aprendidas, mientras que no se requiere de niveles altos de ACh cuando se trata un estímulo no novedoso o familiar. La hipótesis de Hasselmo (2005), ayuda a comprender la dinámica del sistema colinérgico, durante el aprendizaje de una tarea, pues de acuerdo a Hasselmo se requieren de altos niveles de ACh extracelular en la corteza, para procesar la información novedosa y de niveles bajos de ACh para llevar a cabo el proceso de consolidación de una memoria (Hasselmo et al., 1999). No obstante, aún no se conoce de qué manera se lleva a cabo la modulación de la actividad colinérgica extracelular. Este mismo esquema de la actividad colinérgica durante el aprendizaje se ha encontrado en modelos asociativos como el Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS), modelo principal de estudios en esta tesis.

### **6.3. El condicionamiento de aversión al sabor (CAS)**

El CAS es un modelo de aprendizaje asociativo sencillo pero robusto, por medio del cual los animales adquieren aversión a un determinado sabor cuando éste va seguido por un malestar visceral. Este modelo es un ejemplo notable de aprendizaje aplicado a la supervivencia de las especies, ya que permite la asociación entre un estímulo gustativo y

su retroalimentación visceral nociceptiva, luego de su ingestión, la cual determinará en gran parte la conducta futura alimenticia del individuo (Bures et al.,1998).

Desde el descubrimiento del modelo del CAS por John García en 1974, hasta el presente, el CAS ha sido utilizado de manera amplia para estudiar los procesos de formación de una memoria, pues presenta varias ventajas sobre otros paradigmas:

- No se requiere de aparatos, especializados para su estudio, pues sólo se necesita un alimento sólido o líquido y un agente irritante, contenido en una jeringa para llevar a cabo el entrenamiento del CAS.

- El entrenamiento del CAS en animales, presenta una rápida adquisición, pues basta con un solo ensayo EC-IC (sabor- agente irritante) para que se induzca el aprendizaje del CAS.

- Se tiene conocimiento de varias estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento de la información gustativa y visceral en este tipo de aprendizaje.

- El intervalo entre la presentación de los estímulos, sabor-agente irritante, puede ser bastante amplio hasta de 2 horas (Gutiérrez et al., 2003b).

- La amplia separación entre el estímulo gustativo y el estímulo visceral (irritación visceral) durante la adquisición, permite estudiar los mecanismos bioquímicos e intracelulares que subyacen al procesamiento del estímulo gustativo y visceral casi por separado (Figura 3) (Bures et al., 1998; Bermúdez-Rattoni, 2004).



Figura 3. Esquema del protocolo del CAS, durante las fases de adquisición y prueba. En la adquisición se le ofrece al animal un estímulo gustativo novedoso, en un lapso de tiempo, posteriormente se le administra intraperitonealmente (i.p.) un agente irritante (LiCl) que induce el malestar visceral. Tiempo después se realiza la prueba donde solo se le ofrece el estímulo gustativo. Por medio de su consumo se observa el aprendizaje del animal. La disminución del consumo del animal significa que generó aversión hacia ese sabor (Bures et al., 1998).

Por más de 25 años se ha utilizado el modelo del CAS, para averiguar lo que ocurre durante la formación de una nueva memoria (Bures et al., 1998). Esto ha permitido profundizar en el conocimiento de algunas rutas neuronales involucradas en el procesamiento de los estímulos gustativo y visceral del CAS, así como aquellas estructuras que procesan la información, para la formación de este especial tipo de memoria.

### 6.3.1 Sustratos anatómicos del CAS

El aprendizaje del CAS comienza con el procesamiento de un estímulo gustativo novedoso. El sabor, traducido a señales químicas, es captado por los receptores periféricos situados en las papilas gustativas de la lengua, laringe y faringe, las cuales inducen la activación de fibras sensitivas conformada por tres nervios craneales: facial (VII), glosofaríngeo (IX) y vago (X). Las terminales nerviosas de estos nervios, terminan rostro-caudalmente en el primer núcleo de relevo en el tallo cerebral, el núcleo del tracto solitario (NTS). Las neuronas gustativas localizadas en el tercio rostral del NTS, proyectan a la parte media del núcleo parabraquial (NPB), mientras que las neuronas de la zona ipsilateral del NPB reciben información visceral (Bures et al., 1998).

Las neuronas del NPB proyectan a su vez bilateralmente al núcleo ventral posterior medial del tálamo (VPM), dejando colaterales en su porción dorso-lateral hacia el área del hipotálamo lateral (LH), conocido como el centro de la alimentación; estas fibras proyectan al núcleo central de la amígdala, dejando colaterales ipsilaterales hacia el lecho de la estría terminal. Todas estas fibras terminan en la CI también conocida como la corteza gustativa (Bures et al., 1998) (Figura 4).

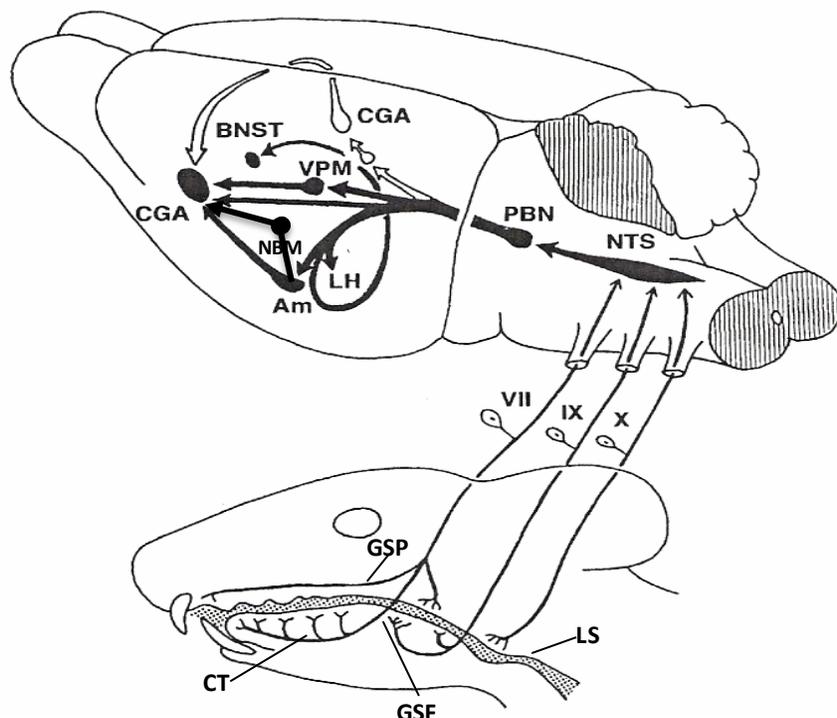


Figura 4. Activación de las rutas gustativa y visceral en la rata, durante el aprendizaje del CAS. El nervio VII (facial) inerva la cuerda del tímpano (CT) y la rama petrosa del nervio petroso (GSP); el nervio IX (glossofaríngeo) inerva el tercio medio de la faringe; el nervio X (vago) inerva el tercio posterior de la lengua o laringe superior (LS); estos nervios conducen la información hacia el tracto del núcleo solitario (NTS), que proyecta a su vez al núcleo parabraquial PBN y éste al núcleo ventral posterior medial del tálamo (VPM), terminando en el área gustativa de la corteza insular (CGA), existen proyecciones hacia el núcleo de lecho de la estría terminal (BNST); hipotálamo lateral (LH); amígdala (Am), núcleo basal magnocelular (NBM). Las flechas negras muestran las proyecciones ipsilaterales y en blanco se muestran las proyecciones contralaterales (modificado de Bures et al., 1998).

La ruta gustativa y visceral activa durante el aprendizaje del CAS, ha sido ampliamente estudiada mediante estudios electrofisiológicos y de lesiones en estructuras (Nuñez-Jaramillo et al., 2010). Los resultados de estos numerosos estudios han permitido conocer la función esencial de las estructuras participantes durante la formación de la memoria del CAS, entre las que destacan el NTS, NPB, BLA, NBM y la CI, esenciales para el

procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales en el aprendizaje del paradigma del CAS. Siendo el NBM y la CI, dos estructuras destacadas a estudiar en este trabajo de investigación, se describirá con mayor detalle la organización anatómica y neuroquímica de la CI y del NBM con el fin de comprender la importancia de la función de estas estructuras.

### **6.3.2 Corteza Insular**

Las conexiones anatómicas de la CI, claramente sugiere que esta estructura es una región que juega un papel fundamental en el procesamiento, integración y almacenamiento de la información gustativa novedosa y familiar (Bermudez-Rattoni, 2004; 2014).

Los primeros experimentos que permitieron establecer el rol cognitivo de la CI, se basaron en lesiones temporales y permanentes en esta estructura, realizadas antes o después de la adquisición del CAS. Estos estudios mostraron que las lesiones no producen deficiencias en la sensibilidad gustativa o gastrointestinal de los animales, sino que impiden la representación mnémica del gusto y sus consecuencias gastrointestinales, pues los animales con cortezas lesionadas eran capaces de detectar estímulos gustativos normalmente, pero no lograban evocar una memoria durante la prueba del CAS (Bures et al., 1998; Bermudez-Rattoni, 2004). Estos datos permiten establecer que la CI es una región indispensable para llevar a cabo la integración de los estímulos involucrados en el CAS.

Con respecto a la función de la CI sobre la formación de la memoria gustativa del CAS, algunos trabajos mostraron que la administración de un inhibidor de síntesis de proteínas como la anisomisina, administrada en la CI durante la ventana de tiempo de exposición al nuevo sabor en el aprendizaje del CAS, bloquea la expresión de la memoria del CAS, durante el día de la prueba (Rosenblum et al., 1993). Sugiriendo que los circuitos ocupados de procesar la información proveniente del aprendizaje del CAS, son distintos a aquellos que evocan a una memoria gustativa (Bures et al., 1991).

Esto sugiere la existencia de una organización definidas por capas y funciones en el área de la CI gustativa (Yamamoto et al., 1988). Donde se procesan y relacionan dos mecanismos independientes de la memoria del CAS, uno para la adquisición del CAS y otro para su evocación (Bermúdez-Rattoni, 2014). A continuación se presenta la organización anatómica de la CI para comprender mejor la importancia de esta estructura.

### **6.3.2.1 Localización anatómica de la corteza insular**

La CI en la rata se encuentra en el lóbulo temporal (áreas 13 y 14 de Krieg) a lo largo del surco rinal, comprende el área que va desde la corteza frontal lateral y la corteza perirrinal en dirección rostrocaudal, corresponde una porción ventral de la corteza somatosensorial a la corteza piriforme en la dirección dorsoventral (Saper et al., 1982).

La corteza gustativa, ocupa 1 mm de ancho por 3 mm de largo ocupando el 15 % del total de la CI (Bures et al, 1998). La porción anterior conforma las áreas corticales del gusto, mientras que su porción posterior conforma las áreas sensoriales viscerales (Yamamoto et al., 1988; Cechetto et al., 1987). Se ha reportado que las neuronas de la región posterior de la CI responden a estímulos viscerales, nociceptivos y gustativos en menor proporción (Hanamori, 2003; 2009). A pesar de la información específica que se ha obtenido gracias a los resultados experimentales de las estructuras, todavía no se han descrito la totalidad de estructuras que conforman el circuito gustativo-visceral.

Las conexiones anatómicas de la CI, claramente sugieren que esta región del cerebro juega un papel de integración y posible almacenamiento de la información visceral, puesto que se ha descrito que la CI recibe proyecciones del núcleo VPM del tálamo a lo largo del surco rinal (Kosar et al., 1986b), además de importantes proyecciones provenientes del sistema límbico, complejo amigdalino, núcleo dorsomedial del tálamo y de la corteza prefrontal, conexiones de gran relevancia para el procesamiento de estímulos de distintas modalidades (Kosar et al., 1986a).



2000). La región disgranular se ha relacionado con tareas que requieren de control ejecutivo en atención, incluyendo aquellos procesos de manipulación y uso de la información de la memoria de trabajo (Wager et al., 2003), respuestas inhibitorias y atención (Bures et al., 1998).

La capa agranular se llama así por estar carente de células en forma gránulo; está conectada con la corteza orbitofrontal intermedia y también recibe proyecciones del cíngulo y del lóbulo temporal intermedio. Esta capa se encuentra relacionada con reforzadores primarios del olor, tanto en seres humanos como en animales, también se relaciona con la quimiorrecepción avanzada, que modula la asociación de estados del comportamiento de ingesta y evitación de ambientes o alimentos nocivos (Dade et al., 2002).

La CI agranular rostral, la corteza orbital ventrolateral, la corteza prefrontal intermedia y el NAcc pertenecen a los circuitos ventrales del CAB (partes mesolímbicas/mesocorticales) que están implicados en el comportamiento ante el dolor, la cognición, la motivación y el estado de ánimo (Burkey et al., 1996, 1999; Suhara et al., 1992; Watanabe et al., 1997; Goldman et al., 1998). En todas estas áreas, se ha visto que la dopamina y el ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA), desempeñan un papel modulador en la actividad neuronal espontánea y en la corteza frontal, apoyando la idea de una inhibición necesaria en los circuitos mediada por las neuronas GABAérgicas (Godbout et al., 1991; Pirot et al., 1992; Gorelova et al., 2002).

La relevancia de esta capa proviene de las grandes neuronas piramidales de la capa V, que aunque escasas, la CI las contiene. Estas neuronas poseen receptores a GABA lo que ayuda a regular algunos circuitos (Margeta-Mitrovic et al., 1999). Esta capa agranular, proyecta principalmente a áreas anteriores al cíngulo, a la corteza del entorrinal, a la parte ventromedial del estriado y a la corteza del periamigdalóide. De igual forma, recibe aferencias de la corteza entorrinal, del estriado ventral intermedio y también del área hipotalámica lateral y del núcleo mediodorsal del tálamo, NAcc y amígdala (Allen et al., 1991; Hurley et al., 1991; Petrovich et al., 1996; Leonard, 1969).

Gracias a la interconectividad que posee la CI, con regiones del CAB y otras cortezas vecinas, se ha demostrado la relevancia de la actividad de la CI en procesos de aprendizaje relacionados a eventos o estímulos aversivos (Everitt et al., 1997; Wenk, 1997), así como en la codificación y asociación de los aspectos relacionados con el sabor (Braun et al., 1981). En este sentido destacan las conexiones colinérgicas que recibe del NBM (Mesulam et al., 1983b), las cuales son cruciales para el procesamiento de un estímulo gustativo novedoso durante las primeras etapas de adquisición del CAS (Miranda et al., 1999; Bermudez-Rattoni, 2004).

### **6.3.3 Núcleo basal magnocelular (NBM)**

El NBM es una estructura fundamentalmente colinérgica considerada como la principal fuente productora de ACh que proyecta hacia la corteza cerebral. Corresponde al sector Ch4 según Mesulam et al., (1984) (Figura 6).

Este núcleo se encuentra localizado en el complejo del CAB, anterior al hipotálamo y ventral a los ganglios basales (Semba et al., 1988b; Wenk, 1997; Detari et al., 1999). En su porción anterior limita con el tubérculo olfatorio y el NAcc, mientras que lateralmente lo hace con el complejo amigdaloides y la corteza piriforme (Mesulam et al., 1983a; Mesulam et al., 1984). Esta estructura es irregular, ya que se encuentra conformado por un grupo de neuronas colinérgicas pertenecientes al *septum* medial, la rama vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca, en su porción caudal que incluye también al globo pálido ventral y la sustancia innominata. Dicha organización anatómica se conserva en la gran mayoría de los mamíferos (Bigl et al., 1982; Mesulam et al., 1984; Nieuwenhuys, 2012) (Figura 6).

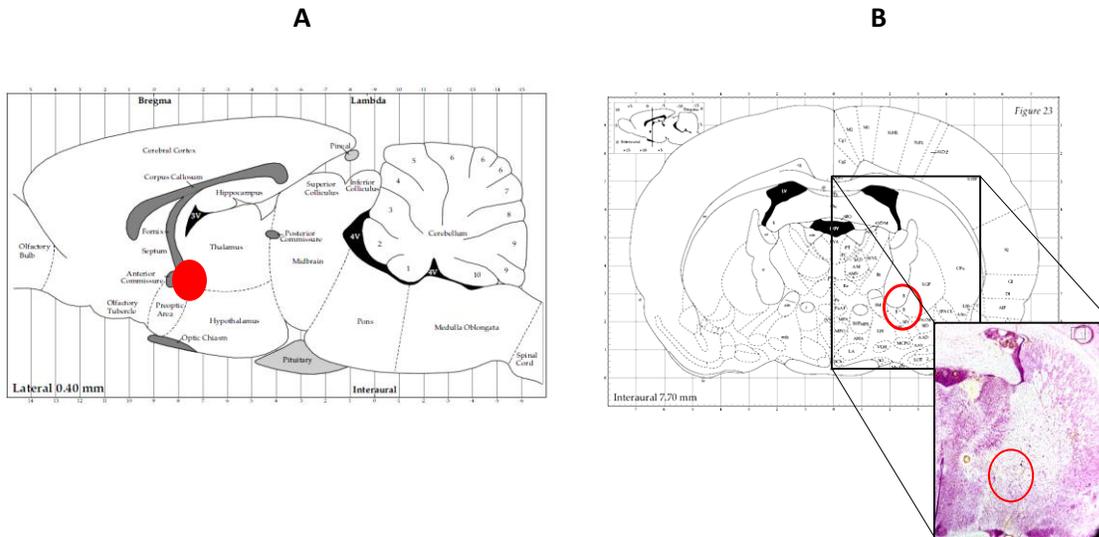


Figura 6. Localización anatómica del NBM en cerebro de rata. La figura A muestra una representación sagital del cerebro de rata, el círculo rojo indica el área correspondiente al NBM y sus estructuras circunvecinas. En B un corte coronal de cerebro de rata muestra la ubicación del NBM, dentro del círculo rojo, la figura anexa muestra una fotomicrografía del área correspondiente al NBM en cerebro de rata. Modificado de (Paxinos, 2004b).

### 6.3.3.1 Grupos neuronales del NBM

Las neuronas colinérgicas del NBM son de gran tamaño (18-43  $\mu\text{m}$ ), con largos axones y extensos arboles dendríticos multipolares, con somas ovalados y fusiformes (Semba et al., 1988; Detari et al., 1999). Estas neuronas se encuentran entre mezcladas con otras poblaciones neuronales entre las que destacan las neuronas GABAérgicas (Sarter et al., 2000; Semba et al., 1988a). Morfológicamente las células GABAérgicas son de menor tamaño a las colinérgicas (<15  $\mu\text{m}$ ) pudiendo desempeñar funciones de interneuronas (Semba et al., 1988; Detari et al., 1999).

No obstante, los estudios inmunohistoquímicos de la población neuronal del NBM, han demostrado que una importante subpoblación de neuronas colinérgicas y GABAérgicas son neuronas de proyección cortical (Adams et al., 1986; Mesulam, 1984; Montero-Pastor et al., 2004). La distribución de estas dos poblaciones en el NBM no es homogénea, pues se ha observado que existe una relación de 9:1 entre células colinérgicas y GABAérgicas (Dudchenko et al., 1991; Sarter et al., 1994).

Además de la existencia de neuronas GABAérgicas en el NBM, también se ha mostrado que este núcleo contiene neuronas glutamatérgicas (Formaggio et al., 2011) y neuropeptidérgicas productoras de somatostatina, neuropeptido Y, encefalina, sustancia P o galanina (Semba et al., 1988b; Mesulam, 1995; Mufson et al., 2000).

### **6.3.3.2 Conexiones del NBM**

La importancia de la actividad del NBM radica en que esta estructura posee un papel crítico en la neuromodulación del sistema colinérgico cortical implicado en la activación cortical, atención y procesamiento de la información en actividades cognitivas (Sarter et al., 2000; Sarter et al., 2003; Zaborszky et al., 2003; Orsetti et al., 1996; Miranda et al., 1999).

El NBM envía proyecciones a varias estructuras encefálicas las principales se dirigen hacia la neocorteza (Mesulam et al., 1983a; Woolf, 1996, 1998), BLA, tálamo e hipotálamo, cuya función es la modulación de la actividad cortical (Rasmusson et al., 1992; Hasselmo, 1995, 1999; Rasmusson et al., 2000). Existen otras proyecciones menores hacia los núcleos del tallo cerebral en relación recíproca con los pedúnculos pontinos (Semba et al., 1988) y LC (Carnes et al., 1990), a través de las cuales se regula el ciclo del sueño y vigilia. Sin embargo, las funciones principales en las que se ha involucrado la actividad del NBM, es en los procesos cognitivos como la atención, el aprendizaje y la memoria (Everitt et al., 1997; McGaugh, 2000; Sarter et al., 2000; Mesulam, 1995; Sarter et al., 2003; Power, 2004).

El NBM recibe proyecciones provenientes del tallo cerebral, *locus coeruleus*, de los pedúnculos pontinos (PPT), de los propios núcleos colinérgicos latero dorsales y del Rafe en el tallo cerebral (Jones et al., 1989; Carnes et al., 1990; Bina, 1993). Además también recibe recíprocamente proyecciones de la corteza, núcleos caudado y putámen, del NAC, de los núcleos intralaminares del tálamo, de la BLA, del hipotálamo y de otras cortezas como la orbito frontal, entorrinal (Mesulam et al., 1984; Zaborszky et al., 1986; Semba et

al., 1988a; Carnes et al., 1990; Detari et al., 1999; Sarter et al., 1999; Sarter et al., 2000; Zaborszky et al., 2003). Hace algunos años se encontró que el NBM recibe proyecciones histaminérgicas provenientes de los núcleos tuberomilares del hipotálamo (NTMH) (Bacciottini, et al 2001; Cecchi et al 2001; Giannoni et al., 2009).

La interconectividad del NBM con diversas estructuras cerebrales ha propuesto que el sistema colinérgico del NBM, puede trabajar coordinadamente con otros sistemas de neurotransmisión, como el glutamatérgico originado en los PPT y *Rafe dorsal* (Détari, 1999; Détari et al., 1997; Dringenber et al., 1997; Rasmuson et al., 1993); el noradrenérgico procedentes del *Locus Coeruleus* (Berridge et al., 1996; Cape et al., 1998), el sistema histaminérgico (Giannoni, et al., 2009), de la misma manera que algunos neuropéptidos (Sarter et al., 2002; Manrique et al., 2007), todos implicados en la activación del manto cortical.

El NBM ha sido vinculado estrechamente a procesos cognitivos derivados de tareas de atención, aprendizaje y memoria, ya que parece modular la excitabilidad de las neuronas de la corteza a través de sus proyecciones colinérgicas, proporcionando las condiciones adecuadas para que se activen los mecanismos de la plasticidad sináptica (Rasmuson, 1993; Everitt et al., 1997; Hohmann, 2003).

La administración de neurotoxinas que bloquean o lesionan el NBM, antes de iniciar una sesión de entrenamiento, afectando significativamente el procesamiento de los estímulos en el aprendizaje de tareas asociativas (Evenden et al., 1989; McGaughy et al., 2002) entre las que se encuentra el aprendizaje del CAS (López-García et al., 1993, Miranda et al., 1999).

#### **6.3.4 Actividad colinérgica en el CAS**

Estudios llevados a cabo sobre la CI, para tratar de comprender cuáles eran los sistemas de neurotransmisión implicados en la integración de estímulos gustativos y viscerales en el CAS, reportaron la presencia de actividad GABAérgica, glutamatérgica y colinérgica en la

CI luego de una estimulación cortical, siendo la actividad colinérgica la más relevante en el estudio (López-García et al., 1990a).

Estudios previos del laboratorio averiguaron la importancia de la actividad colinérgica en la CI, durante la novedad del estímulo. Utilizando la técnica de microdiálisis en libre movimiento, se midió la actividad extracelular de ACh en la CI durante el CAS, mientras el NBM se encontraba bloqueado temporalmente por la administración local de tetrodotoxina (TTX, bloqueador selectivo de los canales de sodio dependientes de voltaje). Los resultados de este trabajo, mostraron una disminución significativa de ACh en la CI durante el consumo del estímulo novedoso (sacarina 0.1 %), como se muestra en la Figura 7. Posteriormente, el día de la evocación, los animales tratados con TTX no fueron capaces de evocar la memoria del CAS (Miranda, et al., 1999).

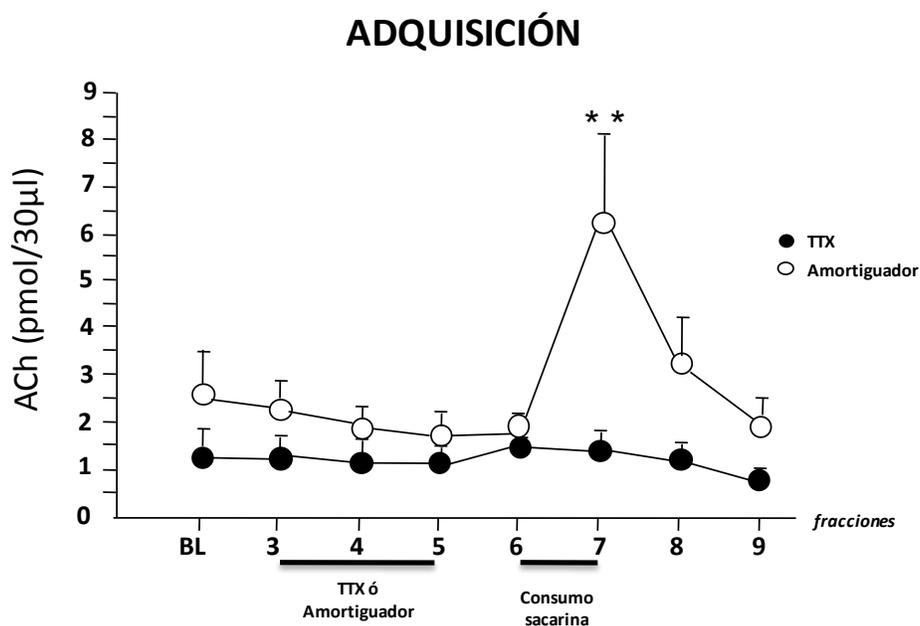


Figura 7. Liberación de ACh registrada en la CI durante el bloqueo del NBM con TTX, en la adquisición del CAS. Las ordenadas indican los niveles de ACh en pmol/30µl. En las abscisas se muestra el número de fracciones colectadas, durante el experimento. BL, línea basal (media de las dos primeras muestras), la línea debajo de las fracciones 3,4,5 indica el tiempo de inyección de TTX o amortiguador en el NBM; la línea debajo de la fracción 6, indica el momento en el que fue presentado el estímulo gustativo novedoso (sacarina 0.1%). Los círculos vacíos muestran los animales control inyectados con el amortiguador en el NBM. Los círculos llenos muestran los animales experimentales inyectados con TTX en el NBM (Miranda et al., 1999).

Resultados similares, fueron observados en otros estudios realizados en nuestro laboratorio, basados en el modelo de preferencia al sabor. En estos trabajos se logró observar como la novedad del estímulo favorece el incremento de la actividad colinérgica en la CI y que no existe modificación alguna de los niveles de ACh en la CI, cuando se procesa un estímulo familiar (Miranda et al., 2000) (Figura 8).

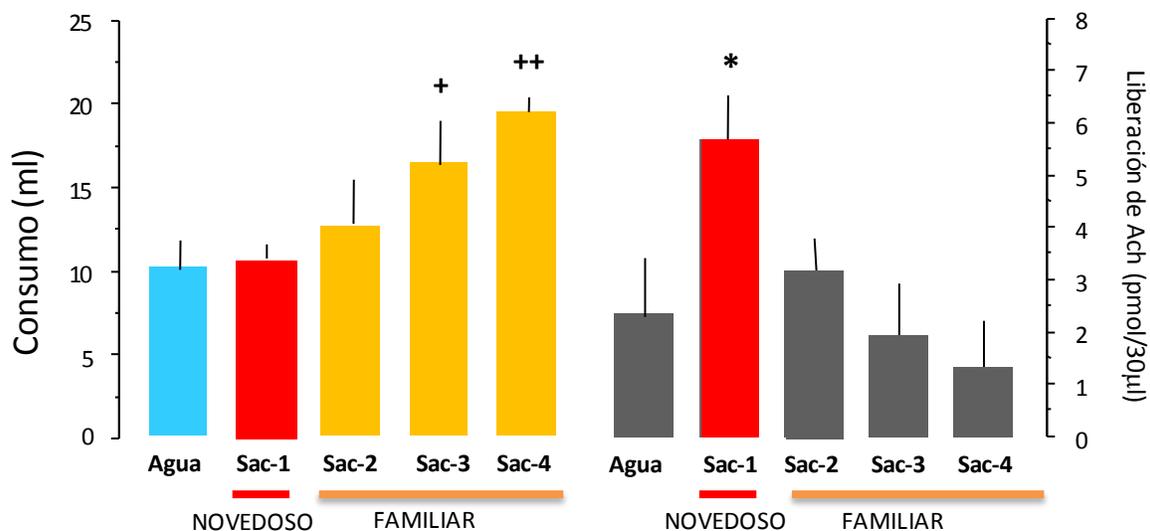


Figura 8. Liberación de ACh en la CI durante la presentación de un sabor novedoso (sacarina 0.1%) y cuando el sabor se torna familiar. Las barras del lado izquierdo muestran los consumos de los animales medido en mililitros. Las barras del lado derecho muestran la liberación de ACh en la CI, medido en pmoles, durante la presentación de la sacarina 0.1% en cuatro días consecutivos. Los animales se entrenaron con el modelo de respuesta apetitiva, éstos fueron privados de agua durante 24hrs para establecer una basal de agua, posteriormente se les presentó una probeta graduada con (sacarina 0.1%) durante 15 min. La probeta graduada con sacarina 0.1%, fue ofrecida cada 24 hrs durante 4 días. +  $p < 0.05$  con respecto a los consumos de agua, Sac-1 y Sac-2, ++  $p < 0.005$  con respecto a todos los demás días de consumo. \* $P < 0.05$  con respecto a la liberación de ACh de todos los demás días (Miranda et al., 2000).

Estos trabajos aportaron varios datos importantes a considerar para el presente trabajo:

- La actividad colinérgica de la CI, depende fundamentalmente de la actividad del NBM.
- Se observó un incremento de ACh en la CI, durante el procesamiento del estímulo novedoso, la cual se encuentra relacionada con la formación de la memoria del CAS, como se ha visto en otros modelos cognitivos descritos anteriormente.
- Cuando el sujeto es expuesto a un estímulo familiar, no existen cambios en la actividad colinérgica en la CI.

- Estos incrementos de ACh ocurren de manera similar en otros modelos asociativos de aprendizaje descritos anteriormente.

- Aún no se conoce, cuáles son los mecanismos que modulan la actividad colinérgica del propio NBM y la CI, durante el reconocimiento de un estímulo novedoso y un estímulo familiar en el paradigma del CAS.

Analizando varios trabajos de distintos grupos de investigadores, se encontraron los estudios del grupo de Blandina, cuyas evidencias muestran que el sistema histaminérgico es capaz de modular la actividad colinérgica del NBM y en la corteza (Blandina et al., 1996b; Blandina et al., 1996a; Giannoni et al., 2010; Benetti et al., 2013).

Uno de los motivos principales, por el cual resulta interesante analizar al sistema histaminérgico como modulador de la actividad colinérgica durante el aprendizaje, es que este sistema ha sido relacionado a la regulación de procesos complejos como la vigilia, atención y motivación (De Almeida et al., 1988; De Almeida et al., 1994; Torrealba et al., 2012; Valdes et al., 2010; Passani et al., 2011) y que son necesarios durante el procesamiento de los estímulos novedosos en una tarea de aprendizaje. A continuación se describirá con mayor detalle el sistema histaminérgico.

#### **6.4 El sistema histaminérgico**

Históricamente, la histamina fue descubierta en estado natural en el cornezuelo de centeno como resultado de una contaminación bacteriana. Sir Henry Dale y colaboradores en 1910, encontraron que los efectos de la histamina estaban relacionados con la contracción del músculo liso, las secreciones gástricas y la respuesta del sistema inmune ante un agente patógeno. Posteriormente se encontró que la histamina también es producida en el hipotálamo, cuyas funciones se han relacionado con los estados de alerta, motivación y atención en el SNC (Brady et al., 2012).

La histamina se sintetiza en la parte posterior de los núcleos tuberomamilares del hipotálamo (NTMH), a partir del aminoácido L-histidina, mediante la acción de la enzima

histidina descarboxilasa (HDC), la cual remueve el grupo carboxilo para generar histamina. La histamina posee dos rutas de degradación, llevadas a cabo por dos enzimas: una que trabaja a nivel periférico, la diamina oxidasa (DAO), que oxida la histamina para obtener ácido acético imidazol y otra en SNC, la histamina metil-transferasa (HMT) que convierte a la histamina en tele-metilhistamina, sustrato para la monoaminooxidasa (MAO) que sintetiza el ácido acético tele-metilimidazol (Figura 9).

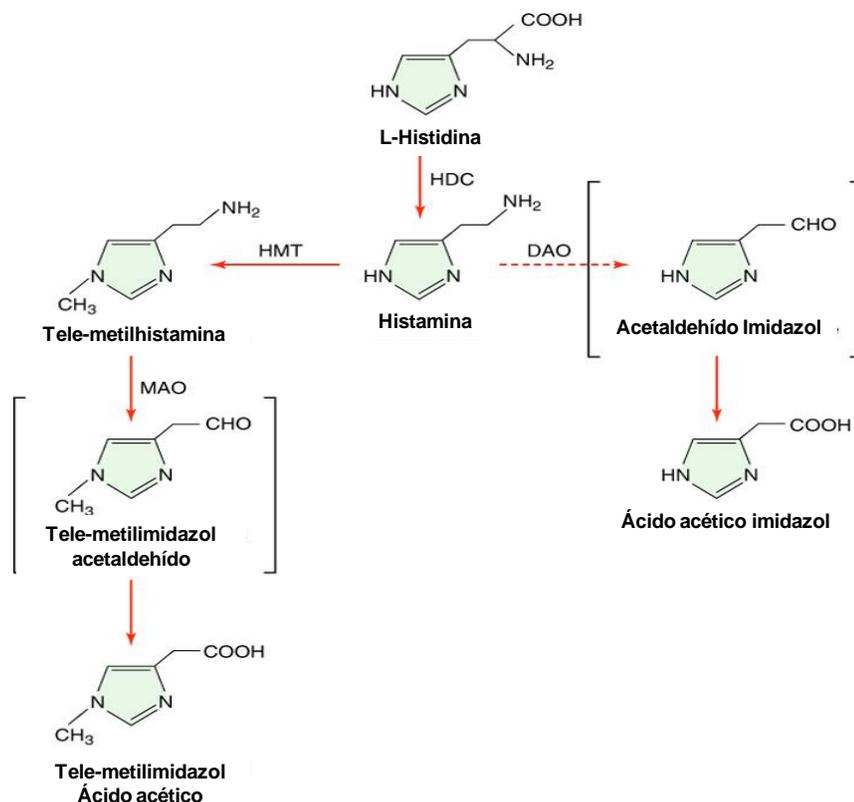


Figura 9. Síntesis y metabolismo de la histamina. Las flechas rojas continuas indican las rutas para la formación y degradación de histamina en el cerebro. Las flechas rojaspunteadas muestran las rutas adicionales que pueden ocurrir fuera del sistema nervioso. HDC, histidina descarboxilasa; HMT, histamina metiltransferasa; DAO, diamina oxidasa; MAO, monoamina oxidasa (Modificado de Brady et al., 2012).

La histamina producida en el SNC proviene de los NTMH, los cuales proyectan esencialmente hacia el tálamo, la corteza, el cerebro medio y al plexo coroideo (Figura 10)(Byrne et al., 2009). La población neuronal del NTMH es heterogénea pues incluye neuronas GABAérgicas, así como neuronas productoras de cannabinoides entre otras (Cenni et al., 2006).

Los NTMH reciben inervación del área preóptica del hipotálamo, del *septum*, de la corteza prefrontal, del subíulum y del área dorsal tegmental (Erickson et al., 1991; Wooterlod et al., 1987; 1988a; 1988b).

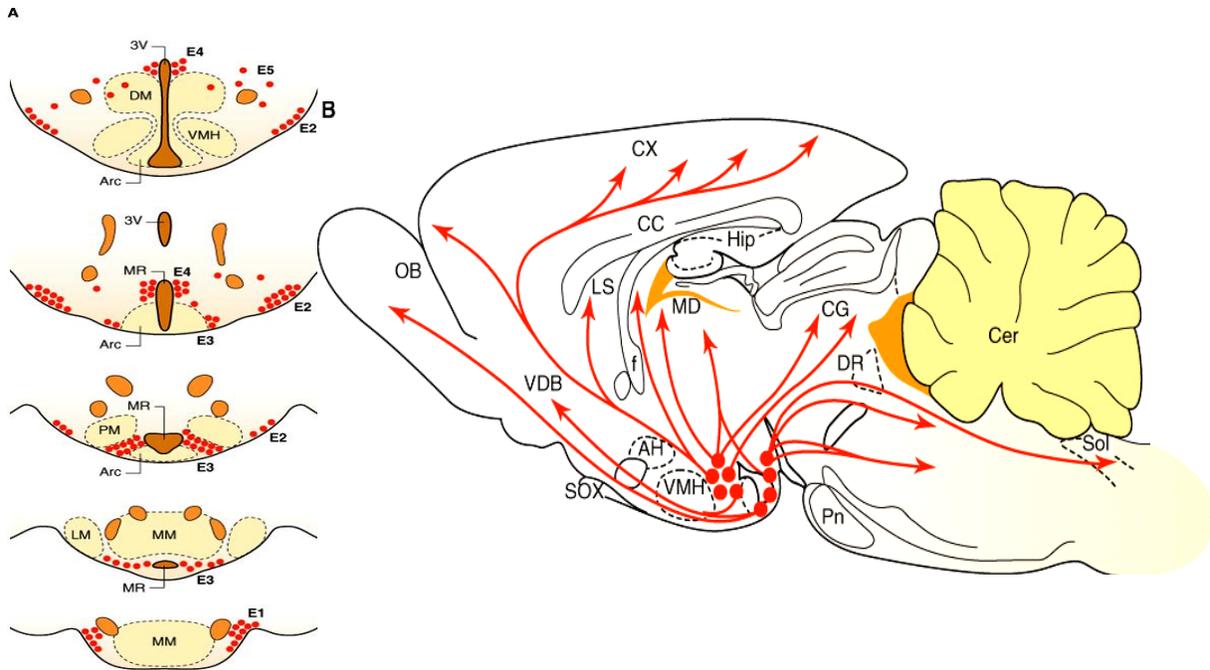


Figura 10. El sistema histaminérgico en el cerebro de rata. (A) Cortes frontales a través del hipotálamo posterior mostrando la localización de las neuronas histaminérgicas. Arc, núcleo arcuato; DM, núcleo dorsomedial; LM, núcleo mamilar lateral; MM, núcleo medial mamilar; MR, mamilar recesivo; PM, núcleo premamilar; 3V, tercer ventrículo; VMH, núcleo ventral hipotalámico (B) Vista sagital que muestra las proyecciones de las fibras ascendentes y descendentes de los núcleos histaminérgicos. AH, hipotálamo anterior; CC, cuerpo calloso; Cer, cerebelo; CG, sustancia gris; CX, corteza cerebral; DR, rafé dorsal; f, fornix; Hip, hipocampo; LS, septum lateral; MD, tálamo mediodorsal; OB, bulbo olfatorio; Pn, núcleo pontino; Sol, tracto del núcleo solitario; SOX, decusación supraóptica; VDB, Banda diagonal vertical; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico. (Brady et al., 2012).

Como se observa en la Figura 10, el sistema histaminérgico posee varios sitios de acción en áreas colinérgicas como el CAB y la neocorteza, (Giorgetti et al., 1997; Pillot et al., 2002; Hill et al., 1997). Varios autores han mostrado que el sistema histaminérgico puede interactuar en estructuras como el NBM (Bacciottini et al., 2001), la BLA (Blandina et al., 2004) y el hipocampo (Da Silveira et al., 2013), estructuras importantes para el aprendizaje de varias tareas.

Las acciones del sistema histaminérgico, se debe en parte a la activación de los diferentes subtipos de receptores, que actúan sobre estructuras particulares del cerebro y a la

naturaleza de las pruebas cognitivas usadas, para determinar si la histamina inhibe o facilita la acción de otros neurotransmisores (Blandina et al., 1996b). En seguida se describe con mayor detalle los receptores a histamina.

#### **6.4.1 Receptores para histamina en el SNC**

La histamina activa a cuatro tipos de receptores:  $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  y  $H_4$  (Figura 11), todos ellos acoplados a proteínas G y se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del cerebro y del SNP.

Los receptores  $H_1$  se encuentran generalmente acoplados a la proteína  $G_q$ , que al unirse a su ligando induce una respuesta celular, en la cual se estimula al fosfatidilinositol (PI) para la activación de la fosfolipasa C (PLC) con la subsiguiente generación de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Figura 12). Estos segundos mensajeros elevan el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular y activan a la proteína cinasa C (PKC). La activación de estos receptores también pueden estimular el metabolismo del glucógeno, modular la síntesis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y guanosina monofosfato cíclico (GMPc), así como la activación de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ), con la subsiguiente liberación de ácido araquidónico y sus metabolitos.

Muchas de estas acciones, se han encontrado en cerebros de vertebrados donde la activación de estos receptores puede provocar la excitación neuronal de varias áreas como la corteza cerebral, el hipotálamo y el tálamo, debido a la apertura de ciertos canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, que inducen el cambio de la conductancia de iones mediado por la cascada de  $IP_3$  y  $Ca^{2+}$  (Brady et al., 2012).

Los receptores  $H_2$  se encuentran acoplados a las proteínas  $G_s$  y  $G_q$  que, al ser activadas inducen a su vez la activación del adenilato ciclasa (AC), la cual provoca un incremento del AMPC dando como resultado la activación de la proteína cinasa A (PKA). Los resultados de algunos experimentos indican que este receptor también utiliza mecanismos de transducción adicional como la activación de la PLC e incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, de

la misma manera que induce el aumento de las concentraciones de IP<sub>3</sub>, metilación de fosfolípidos y disminución del ácido araquidónico (Arrang et al., 1995b; Leurs et al., 1995; Hill et al., 1997).

Se ha encontrado que este receptor produce excitación en la corteza cerebral de mamíferos e hipocampo, debido a la activación de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje, que inducen la excitación neuronal. También puede facilitar la despolarización por incremento en la conductancia de cationes (Brady et al., 2012).

En cuanto a los receptores H<sub>3</sub>, la unión a su ligando puede provocar dos respuestas: una donde actúa como un regulador negativo de la AC por medio de la proteína G<sub>i/o</sub> y otra donde puede disminuir la síntesis de histamina mediante la inhibición de la enzima HDC (Figura 11 y Figura 12). Esta enzima se encarga de remover el carbono de la L-histidina para convertirla en histamina, de manera que si se inhibe la acción de la enzima no habrá producción de histamina, esto se encuentra regulado por la vía AMPc-AC-PKA. Recientemente se ha reportado que este receptor funciona como activador de la ruta de las MAP-quinasas (MAPK) y que también modula la liberación de ácido araquidónico y el intercambio de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, así como la inhibición de las conductancias de Ca<sup>2+</sup> (Brady et al., 2012).

El receptor H<sub>4</sub> recientemente descrito y clonado, se ubica fundamentalmente en el hipocampo, donde al igual que el receptor H<sub>3</sub>, se acopla a la proteína G<sub>i/o</sub> y regula a la baja la actividad de la AC. Este receptor también puede acoplarse a varias proteínas G como la G<sub>α15</sub> y la G<sub>α16</sub>. Generalmente se encargan de la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y se le ha encontrado implicado en la ruta de activación de las MAPK (Brady et al., 2012).

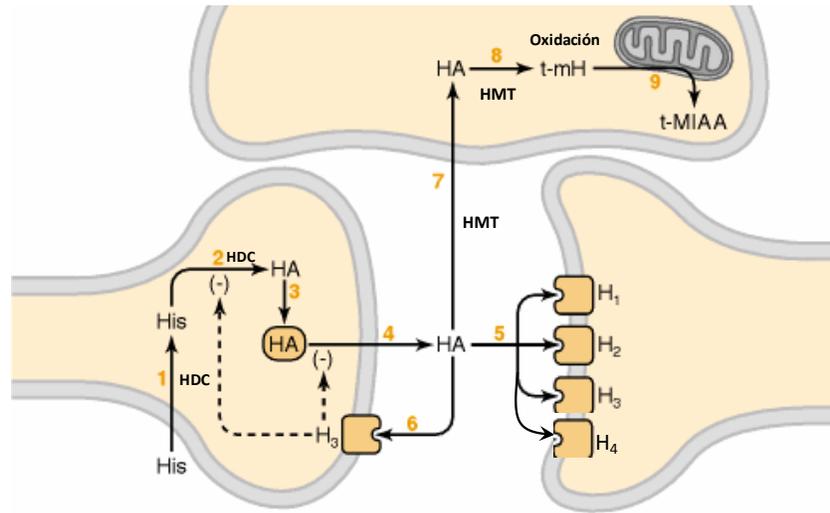


Figura 11. Dinámica del ciclo de vida de la histamina. Síntesis, liberación y metabolitos de la histamina: 1 L-histidina(his) transporte en las terminales nerviosas; 2 síntesis de histamina (HA) mediante la histidina descarboxilasa; 3 Formación de histamina y vesiculación; 4 Liberación de histamina y exocitosis; 5 Activación de receptores en la postsinapsis; 6 Retroalimentación negativa de la histamina mediada por los receptores H<sub>3</sub>; 7 transporte de histamina por medio de astrocitos aunque el mecanismo no es conocido, pero se cree que estos recapturan la histamina en las terminales nerviosas; 8 metabolismo de la histamina por medio de la N-metiltransferasa HMT; 9 oxidación por medio de la monoamina oxidasa t-MH. La localización de los pasos 7-9 aún no ha sido bien determinada (modificado de Siegel et al., 1999).

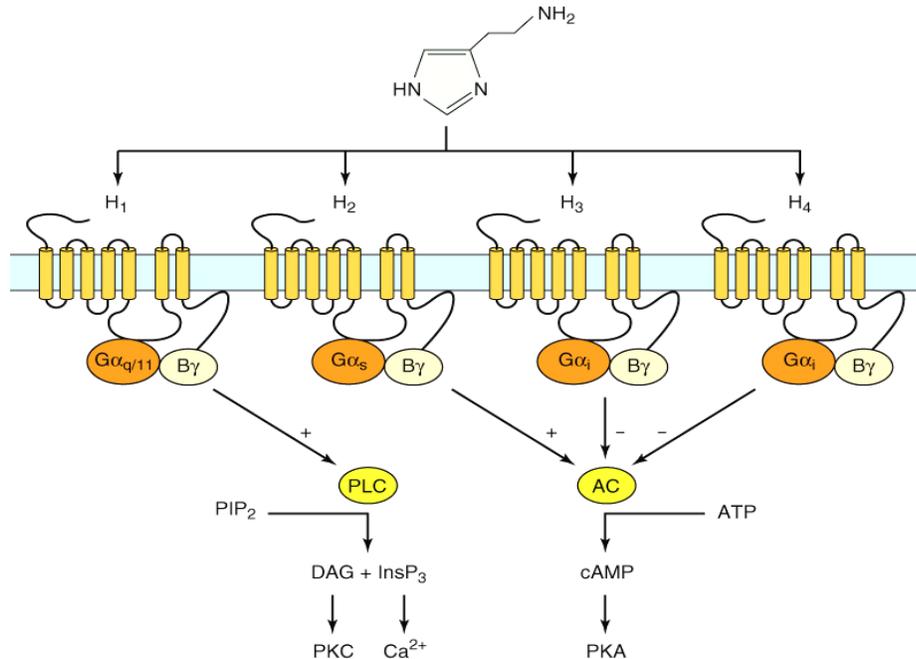


Figura 12. Activación de los distintos grupos de receptores a histamina en el cerebro. La histamina puede estar acoplada a una variedad de proteínas G y activar las rutas de segundos mensajeros. El receptor H<sub>1</sub> receptor activa al fosfatidilinositol vía proteína G<sub>q/11</sub>. Otros receptores son excitatorios como el receptor H<sub>2</sub> o inhibitorios (H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>) que regulan la actividad del adenilato ciclasa por medio de la actividad de las proteínas G vía G<sub>s</sub> y G<sub>i/o</sub>. Las rutas adicionales han sido descritas. Abreviaciones: PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol, 1,4,5-bifosfato IP<sub>3</sub>; FLC, fosfolipasa C; ADC, adenilato ciclasa; ATP adenosin trifosfato; AMPc cíclico; PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa (Brady et al., 2012).

El sistema histaminérgico, parece estar relacionado en la modulación de diversas estructuras relacionadas con la memoria. Aún son pocas las evidencias del papel exacto de la histamina sobre los procesos de aprendizaje y formación de la memoria, así como los circuitos en el que se encuentran involucradas las neuronas histaminérgicas, incluyendo la ubicación y el tipo de sus receptores.

#### **6.4.2 La histamina en el aprendizaje**

Algunos de los primeros estudios sobre el funcionamiento de la histamina en tareas de aprendizaje provienen de la administración intracerebroventricular (i.c.v.) o i.p. de distintos fármacos. Posteriormente, los resultados de estos trabajos sirvieron de base para continuar con estudios más especializados sobre la actividad de histamina.

La primera evidencia que se encontró, sobre el papel de histamina durante el aprendizaje fueron los trabajos de De Almeida et al.,(1986). En estos trabajos se inyectó histamina intracerebroventricular (i.c.v) a diferentes dosis, inmediatamente después de la adquisición de la tarea de evitación inhibitoria, encontrando que la histamina facilita la formación de la memoria(De Almeida et al., 1986).

Otros trabajos encontraron resultados afines, ya que después de administrar i.c.v. alfa-fluorometilhistidina (un inhibidor de la enzima de síntesis de la histamina), se impide la formación de la memoria para la tarea de la evitación inhibitoria activa, sugiriendo que la reducción en los niveles de histamina puede afectar el funcionamiento de importantes centros integradores que controlan los procesos de aprendizaje (Kamei et al., 1993).

Interesantemente, se encontró que al inhibir la liberación de histamina existe una disminución en la activación cortical y en la atención, impidiendo la formación de una memoria. Por el contrario, cuando se estimula la liberación de histamina, en varios modelos con condiciones neurodegenerativas, se logró superar las deficiencias en la ejecución de las tareas (Dere et al., 2010).

En este sentido Tasaka, (1994) encontró que la administración de L-histidina precursor de histamina, en el hipocampo de ratas lesionadas, es capaz de incrementar la histamina hipocampal, así como de reducir significativamente los deterioros en el aprendizaje y evocación de la evitación inhibitoria ocasionados por la lesión (Tasaka, 1994).

De Almeida et al., (1986) mostró que la administración i.c.v. de una combinación de antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> (cimetidina) y H<sub>1</sub> (prometazina), impide la evocación de la memoria de la evitación inhibitoria. Sugiriendo que los receptores a histamina pueden regular procesos relacionados a la consolidación de la memoria (De Almeida et al., 1986). De manera similar, otro grupo de investigadores encontró que la administración i.c.v. de pirlamina y prometazina (antagonistas de los receptores H<sub>1</sub>), impidie la formación de la memoria de la evitación inhibitoria activa, pues los animales prolongan su latencia de escape (Kamei et al., 1990).

En otras investigaciones, se mostró que los efectos de histamina pueden ser distintos en el hipocampo. En este experimento se administró histamina en el hipocampo ventral durante el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria activa, incrementando la latencia de escape del animal e impidiendo la formación de la memoria, posteriormente se administró ranitidina (antagonista de los receptores H<sub>2</sub>), con el fin de revertir el efecto provocado por la inyección de histamina, pero no se observó cambio alguno en la conducta; solo al administrar pirlamina (antagonista del receptor H<sub>1</sub>), se logró revertir los efectos ocasionados por la histamina, induciendo el aprendizaje de la tarea. Estos resultados sugirieron que los receptores H<sub>1</sub> pueden modular al hipocampo durante el aprendizaje de una tarea (Alvarez et al., 1996).

Por otro lado, se encontró que la administración oral de pirlamina y prometazina antagonistas del receptor H<sub>1</sub>, impide la adquisición de un aprendizaje de contextos aversivos (Bacciottini et al., 2001).

Conjuntamente, se encontró que los receptores H<sub>3</sub>, también participan durante el aprendizaje y memoria de tareas asociativas. La administración i.c.v. de imepip (agonista

para el receptor H<sub>3</sub>), impide la formación de la memoria de reconocimiento social, pues prolonga el tiempo de exploración olfatorio del sujeto, mientras que la administración de tioperamida (antagonista de H<sub>3</sub>), mejora la tarea. Estos datos sugieren que los receptores H<sub>3</sub>, para histamina también pueden regular procesos de memoria (Prast et al., 1996).

Otras investigaciones mostraron que la administración i.p. de R- $\alpha$ -metilhistamina (RAMH) e imepip (agonistas del receptor H<sub>3</sub>), antes de la prueba de reconocimiento al objeto y de la evitación inhibitoria impide la formación de la memoria, pues los sujetos disminuyeron el tiempo de exploración del objeto novedoso (Arrang et al., 1987b; Blandina et al., 1996).

Además se ha sugerido que los receptores H<sub>3</sub>, pueden poseer efectos moduladores sobre la actividad colinérgica, pues se mostró que la administración de tioperamida (antagonista de los receptores H<sub>3</sub>), puede revertir los efectos ocasionados por la inyección de escopolamina (antagonista muscarínico), en ratones entrenados en el laberinto elevado y la evitación inhibitoria de paso abajo (Miyazaki et al., 1995).

El conjunto de estas evidencias, sugiere que la manipulación del sistema histaminérgico puede afectar de diversas maneras las respuestas conductuales durante los procesos de aprendizaje y memoria. Como lo ha descrito Alvarez et al., (2001), quien sugiere las posibles situaciones en las que el sistema histaminérgico puede actuar en un circuito: Una neurona histaminérgica puede excitar a otra neurona, provocando la activación de un circuito, mientras que si la neurona histaminérgica activa a una neurona inhibitoria, ésta última puede inhibir al circuito (Alvarez et al., 2001). Además existe evidencia que muestra que la histamina puede interactuar con otros sistemas de neurotransmisión durante el aprendizaje entre los que destaca el sistema colinérgico.

## **6.5 Interacciones entre el sistema colinérgico e histaminérgico**

Se ha encontrado que el CAB y el *septum*, áreas colinérgicas relacionadas a procesos cognitivos, poseen un gran número de receptores H<sub>1</sub> para histamina (Bouthenet et al., 1988), además de recibir proyecciones histaminérgicas de los NTMH (Panula et al., 1989a;

1989b). De modo, que la estimulación de los NTMH, induce un incremento de ACh en el hipocampo (Mochizuki et al., 1994), así como la infusión de histamina en el CAB, induce la despolarización de neuronas colinérgicas en la corteza (Khateb et al., 1990; 1995).

Experimentos de microdiálisis, mostraron que la administración i.p. de pirilamina y clorfeniramina (antagonistas de los receptores H<sub>1</sub>), modulan los niveles extracelulares de ACh, en el hipocampo y la corteza frontal (Dringerber et al., 1997). También, la inyección de histamina en el NBM incrementó la liberación espontánea de ACh en la corteza parietal y la administración de pirilamina (antagonista de H<sub>1</sub>), disminuyó la respuesta. Demostrando que los receptores H<sub>1</sub> son capaces de modular la liberación de ACh cortical (Cecchi et al., 1998; 2001).

Estudios *in vitro*, mostraron que la liberación de ACh en la corteza entorrinal se encuentra modulada por los receptores H<sub>3</sub>. En estos experimentos, se indujo la liberación de ACh tritiada en rebanadas de cerebro y posteriormente se añadió al medio, RAMH (agonista del receptor H<sub>3</sub>), observándose una disminución significativa de ACh (Arrang et al., 1995a).

Otros estudios *in vitro*, reportaron resultados parecidos, ya que la activación de los receptores H<sub>3</sub> inhiben la liberación de acetilcolina tritiada en corteza entorrinal (Clapham et al., 1992). El efecto opuesto fue observado cuando se administró tioperamida (antagonista de H<sub>3</sub>), pues se incrementó la liberación de ACh en el hipocampo de ratas anestesiadas (Mochizuki et al., 1994).

Siguiendo estas evidencias, otros estudios con animales in vivo, mostraron que la administración i.p. de RAMH e imepip (agonistas de H<sub>3</sub>) a varias concentraciones, son capaces de inhibir la liberación extracelular de ACh en la corteza frontoparietal, inducida por alto potasio (Blandina et al., 1996). Además de que la inyección i.p. de RAMH e imepip, impiden el reconocimiento al objeto y la respuesta de la evitación inhibitoria (Blandina et al., 1996b).

El análisis de la actividad de los receptores H<sub>3</sub>, en otros trabajos ha mostrado que éstos receptores pueden regular la actividad de ACh de manera indirecta a través de la

activación de GABA. Mediante la técnica de microdiálisis, se demostró que la administración de imepip (agonista del receptor  $H_3$ ), en la corteza parietal, incrementa la liberación de GABA, disminuyendo así, la liberación de ACh, por lo que la administración de bicuculina, un antagonista GABAérgico, revirtió la inhibición de ACh inducida por imepip (Giorgetti et al., 1997).

De acuerdo a los trabajos expuestos anteriormente, se ha propuesto un circuito que explica las interacciones entre el sistema colinérgico e histaminérgico, que pudieran suceder durante el aprendizaje. El tono colinérgico cortical podría ser regulado por dos acciones: una inhibitoria, relacionada con los receptores histaminérgicos  $H_3$  en corteza, posiblemente ubicados sobre interneuronas GABAérgicas y otra excitatoria, como resultado de la actividad de los receptores  $H_1$  sobre los cuerpos celulares colinérgicos del NBM, como se muestra en la Figura 13 (Bacciottini et al., 2001).

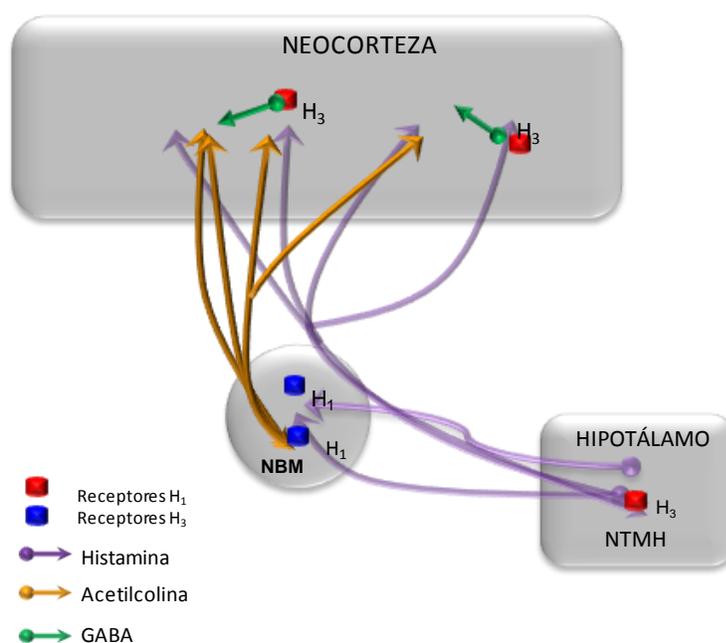


Figura 13. Interacciones entre el sistema histaminérgico y colinérgico. Los fármacos que actúan con los receptores  $H_1$  pueden afectar el tono colinérgico por la interacción de las aferencias del NBM con la periferia, no se sabe si es directa o indirectamente. El receptor  $H_2$  también puede afectar el tono colinérgico en la amígdala, pues puede modular el tono colinérgico hipocámpal por interacción con MSA-DB. Los receptores  $H_3$  al unirse a su ligando, pueden actuar como autoreceptor en el *septum* y en la amígdala, modulando indirectamente el tono colinérgico en amígdala e hipocampo. Estos receptores también pueden afectar la actividad cortical en la región postsináptica, posiblemente por su localización en neuronas GABAérgicas (modificado de Bacciottini et al., 2001).

En este esquema se sugiere que la activación colinérgica cortical proviene de la activación de los receptores  $H_1$  en el NBM, los cuales inducen la liberación de ACh. En cambio la activación de los receptores  $H_3$ , induce un incremento en la actividad de GABA, quien se encarga de disminuir la actividad de ACh en la corteza (Bacciottini et al., 2001).

Esta propuesta puede explicar los cambios de la actividad colinérgica presentados en la CI, durante el procesamiento de la novedad y la familiaridad de estímulos gustativos en el CAS. Con el fin de probar esta teoría, se realizaron estudios farmacológicos previos en el laboratorio que encontraron que la administración de pirilamina (antagonista del receptor  $H_1$ ) en el NBM o la administración de RAMH (agonista del receptor  $H_3$ ) en la CI, antes de la presentación del sabor novedoso durante el aprendizaje del CAS, impide en ambos casos la formación de la memoria gustativa del CAS. (Puron-Sierra et al., 2009) (Figura 14 A y Figura 14 B).

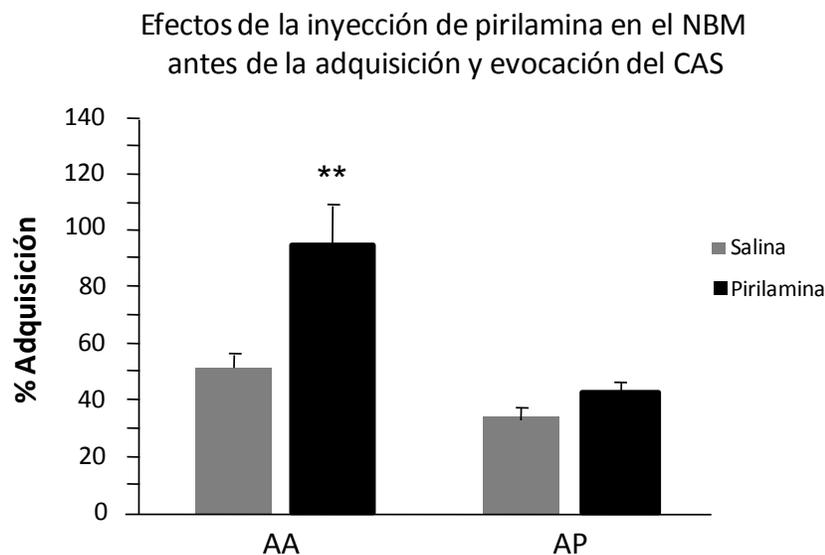


Figura 14 A. Efectos de las infusiones de pirilamina en el NBM antes de la adquisición y prueba del CAS. **AA**, muestra los resultados obtenidos en los grupos tratados antes de la adquisición del CAS. **AP**, muestra a los grupos que fueron infundidos antes de la prueba del CAS. Las barras grises muestran los grupos a los que se les infundió solución salina isotónica 0.9 % antes de la adquisición y prueba del CAS. Las barras negras muestran los grupos a los que se les infundió pirilamina (100mM/0.5 ul) en el NBM antes de la adquisición y prueba del CAS. El consumo de sacarina esta expresado en porcentaje de adquisición (consumo de sacarina durante la prueba x 100 % /consumo durante la adquisición) (Puron-Sierra et al., 2009).

### Efectos de la inyección de RAMH en la CI antes de la adquisición y evocación del CAS

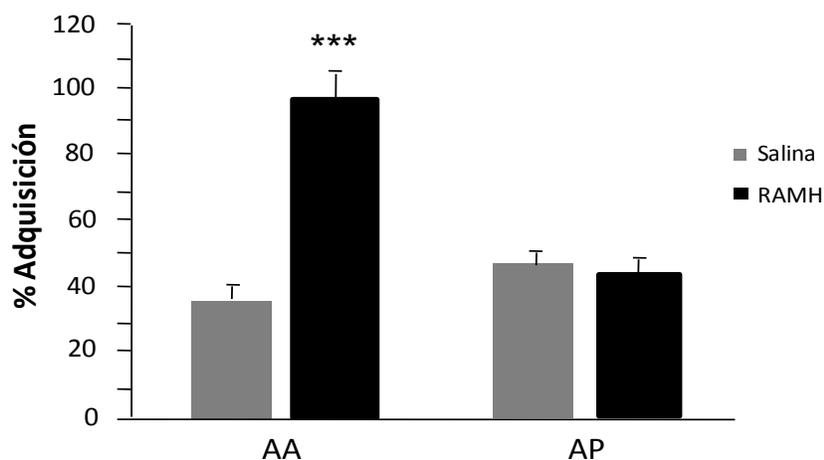


Figura 14 B. Efectos de las infusiones de RAMH en la CI antes de la adquisición y prueba del CAS. **AA**, muestra los resultados obtenidos en los grupos tratados antes de la adquisición del CAS. **AP**, muestra a los grupos que fueron infundidos antes de la prueba del CAS. Las barras grises muestran los grupos a los que se les infundió solución salina isotónica 0.9% antes de la adquisición y prueba del CAS. Las barras negras muestran los grupos a los que se les infundió RAMH (10mM/0.5ul) en la CI antes de la adquisición y prueba del CAS. El consumo de sacarina esta expresado en porcentaje de adquisición (consumo de sacarina durante la prueba x 100% /consumo durante la adquisición) (Puron-Sierra et al., 2009).

Posteriormente, se averiguó si los receptores a histamina, también estaban implicados durante la evocación del CAS. En estos experimentos con otros grupos de animales, se administró pirilamina en el NBM o RAMH en la CI, antes de la evocación de la memoria del CAS. Los resultados obtenidos no mostraron cambio alguno en la evocación de la memoria, sugiriendo que los receptores a histamina no participan durante la evocación de la memoria (Puron-Sierra et al., 2010) (Figura 14 A y Figura 14 B).

Las conclusiones de estos trabajos previos aportaron datos relevantes para continuar la investigación sobre la modulación del sistema colinérgico, a través de los receptores a histamina, tema principal del presente trabajo, por tanto, se investigó en primer lugar la ubicación de estos receptores en la CI y el NBM y de qué manera actúan los receptores para histamina H<sub>3</sub> sobre la actividad colinérgica de la CI y los receptores H<sub>1</sub> sobre la actividad del NBM, cuantificando la actividad colinérgica en la CI, durante el aprendizaje del CAS, utilizando la técnica de microdiálisis en libre movimiento.

PLANTEAMIENTO  
DEL  
PROBLEMA

---

---

---

## VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

---

Retomando las evidencias anteriores, sabemos que una de las principales áreas que integran el sistema colinérgico, se encuentra en el área Ch4 donde se localiza el NBM, núcleo que proyecta hacia toda la neocorteza, incluyendo a la CI e inervando en menor proporción a otras áreas como la amígdala (López-García et al., 1990; Mesulam et al., 1989).

Debido a que el NBM es uno de los principales núcleos colinérgicos, cuya actividad se encuentra relacionada al procesamiento de estímulos novedosos en la corteza, ha sido considerado como indispensable para el aprendizaje y la memoria, de varios modelos entre los que se encuentra el CAS (Miranda et al., 1999).

Varios modelos de aprendizaje asociativo reportan incrementos en la actividad de ACh cortical, durante el mantenimiento de atención, luego del procesamiento de un estímulo o contexto novedoso, así como durante la generación de respuestas condicionadas recién aprendidas (Orsetti et al., 1996; Giovannini et al., 1997; 2001; Fournier et al., 2004 Haselmo, 2000; 2005; 2012). Esto no sucede cuando se trata de estímulos o contextos familiares (Giovannini et al., 2001), mostrando la importancia de la actividad colinérgica cortical para favorecer la codificación de la información y el almacenamiento en las primeras etapas de la formación de la memoria (Beaulieu et al., 1991).

Durante el CAS, también se ha demostrado que la actividad colinérgica del NBM, medida en la CI, es necesaria para el procesamiento del estímulo gustativo novedoso (Miranda et al., 1999; Lopez-García et al., 1996). Pues se ha encontrado un incremento de ACh en la CI, relacionada al consumo del sabor novedoso, esta actividad colinérgica se ha relacionado estrechamente al procesamiento del estímulo y a la inducción de la consolidación de la memoria (Bermúdez-Rattoni, 2004; 2014). En estudios previos del laboratorio se encontró que cuando el NBM es bloqueado temporalmente con TTX, no se

observan cambios en la actividad colinérgica en la CI, los cuales correlacionan con el deterioro de la formación de la de aversión del sabor (Miranda et al., 1999).

Estos incrementos de la actividad de ACh en la CI, solo ocurren durante el procesamiento de un estímulo novedoso, ya que cuando los sujetos se encuentran frente a estímulos gustativos no novedosos o familiares, los niveles de ACh retornan a sus niveles basales (Miranda et al., 2000).

Sin embargo, aún no se conoce de qué manera se modula el incremento de la actividad colinérgica cortical durante el procesamiento de un estímulo novedoso durante el CAS y cómo es que esté incremento no se observa cuando los animales consumen un estímulo familiar o conocido.

De modo que se ha sugerido la participación de otros sistemas de neurotransmisión en la regulación de la actividad colinérgica, entre los que destaca el sistema histaminérgico, sistema que ha sido relacionado a la regulación del aprendizaje. El sistema histaminérgico se destaca por la regulación de los estados de vigilia, atención y motivación (Torrealba et al., 2012) necesarios para que se lleve a cabo el aprendizaje; asimismo se han descrito que las acciones de los receptores a histamina, principalmente los  $H_1$  y  $H_3$ , se encuentran involucrados en diversas tareas aprendizaje.

Bacciottini (2001), propone una relación de modulación entre los sistemas histaminérgicos y colinérgicos a través de los receptores  $H_1$  en el NBM, y los receptores  $H_3$  en la corteza. La activación de los receptores  $H_1$  ha sido asociada a la activación de neuronas colinérgicas las cuales proyectan hacia la CI; mientras que los receptores  $H_3$  al ser activados, se han asociado a neuronas GABAérgica corticales, que al ser activadas inhiben la actividad de la ACh en la corteza. Basados en esta teoría y en los resultados de los estudios previos de farmacología realizados en el laboratorio, donde se manipularon los receptores  $H_1$  para histamina en el NBM y  $H_3$  en la CI, se encontró que los receptores a histamina están relacionados en la formación de la memoria de aversión al sabor.

No obstante, aún no se conoce de qué manera, la activación de los receptores  $H_3$  o inhibición de los receptores  $H_1$ , puede influenciar la actividad colinérgica en la CI durante el CAS.

De modo que, uno de los propósitos de este trabajo doctoral fue conocer en primer lugar la ubicación de los receptores  $H_3$  sobre neuronas GABAérgicas de la CI y de los receptores  $H_1$  sobre neuronas colinérgicas del NBM, con el fin de comprobar y proponer un circuito de regulación de la actividad colinérgica en la CI durante el CAS.

Consecutivamente, se analizó y cuantificó la liberación de ACh en la CI, durante la inyección de pirlamina (antagonistas de  $H_1$ ) en el NBM o inyección de RAMH (agonista de  $H_3$ ) en la CI, luego del consumo del sabor novedoso, durante la adquisición del CAS y evocación del CAS.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

---

---

## VIII. HIPÓTESIS GENERAL

---

---

La activación de los receptores  $H_1$  en el NBM y de los receptores  $H_3$  en la corteza insular, modifica la actividad colinérgica cortical que permite el procesamiento del estímulo gustativo novedoso para la formación de la memoria gustativa.

---

---

## XIX. HIPÓTESIS PARTICULARES

---

---

1) Las células GABAérgicas de la corteza insular expresan receptores tipo  $H_3$ , mientras que las neuronas colinérgicas del NBM expresan receptores tipo  $H_1$ .

2) La activación de los receptores  $H_3$ , en la corteza insular, disminuirá los niveles de ACh cortical durante la presentación del sabor novedoso e impedirá la formación de la memoria de aversión del sabor.

3) La inactivación de los receptores  $H_1$  para histamina en el NBM, disminuirá los niveles de ACh cortical durante la presentación del sabor novedoso e impedirá la formación de la memoria de aversión del sabor.

---

---

## **X. OBJETIVOS:**

---

---

1) Determinar la ubicación de los receptores para histamina H<sub>3</sub> en células GABAérgicas de la corteza insular, mediante doble marcaje con anticuerpos anti-H<sub>3</sub> y GAD<sub>65</sub>, así como la ubicación de los receptores para histamina H<sub>1</sub> en neuronas colinérgicas del NBM, mediante doble marcaje con anticuerpo anti-H<sub>1</sub> y anti ChAT.

2) Estudiar a través de microdiálisis en ratas en libre movimiento, los efectos de la administración del agonista H<sub>3</sub> (RAMH) en la corteza insular, sobre los niveles de ACh en la CI, observados por la presentación del sabor durante la adquisición y la evocación del CAS.

3) Estudiar, a través de microdiálisis en libre movimiento, los efectos de la administración del antagonista H<sub>1</sub> (pirilamina) en el NBM, sobre los niveles de ACh en la CI, observados por la presentación del sabor durante la adquisición y la evocación del CAS.

---

---

## **XI. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES:**

---

---

Objetivo 1. Mediante la técnica de inmunofluorescencia se determinará la ubicación y la densidad de receptores H<sub>3</sub> en la CI y H<sub>1</sub> en el NBM a través de co-marcaje para H<sub>3</sub> en células GABAérgicas de la CI, utilizando anticuerpo antiGAD<sub>65</sub> y co-marcaje para H<sub>1</sub> en células colinérgicas del NBM usando anticuerpos para ChAT. Se evaluará el tipo celular donde se encuentran dichos receptores a través de microscopía de fluorescencia confocal.

Objetivo 2. Evaluar por medio de microdiálisis en animales en libre movimiento, durante la adquisición y la evocación del CAS, los cambios en la actividad/liberación de ACh en la CI, producidos por la inyección de antagonistas y agonistas de los receptores histaminérgicos en el NBM y en la CI.

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

---

---

## XII. MATERIALES Y METODOS

---

### 12.1 Animales

Se utilizaron cincuenta y cinco ratas macho de la cepa Sprague-Dawley 250–300g. Los animales fueron colocados individualmente en cajas de acrílico y mantenidos a 23°C en ciclo invertido 12 h/12 h luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum* durante una semana antes de la cirugía. Todos los protocolos y las maniobras fueron realizados durante la fase de oscuridad. Estos experimentos fueron realizados bajo las normas oficiales del comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y las normas internacionales establecidas para el manejo y uso de animales de experimentación (Comité de ética y cuidado animal del INB-UNAM).

### 12.2 Inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia se utilizaron 6 ratas macho Sprague-Dawley de 250-300 g de peso. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (60mg/Kg) y posteriormente perfundidos transcárdiacamente con solución salina isotónica (0.9%) y solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en 0.1 M buffer fosfato (PBS). Los cerebros fueron crioprotectados en solución de sacarosa a diferentes gradientes, 10 %, 20% y 30%. Posteriormente fueron cortados en secciones coronales de 40µm mediante un criostato marca Leica (CM1850). Los cortes del NBM y la CI fueron obtenidos del mismo cerebro y colocados en distintas laminillas especiales para inmunohistoquímica (Superfrost/Plus) las cuales fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

En la técnica de doble inmunofluorescencia, las laminillas fueron lavadas en PBS-Tween 20, durante 15 minutos y colocadas en solución de bloqueo que contenía suero de burro al 2%. Para las muestras de la CI se utilizaron dos anticuerpos primarios anti-GAD<sub>65</sub> monoclonal 1:100 (Santa Cruz Biotechnology) y anti-H<sub>3</sub> hecho en cabra 1:200 (Santa Cruz

Biotechnology). Para las muestras del NBM se utilizaron dos anticuerpos primarios: anti-ChAT, monoclonal 1:100 (Santa Cruz biotechnology) y anti-H<sub>1</sub> policlonal anti-conejo 1:200 (Sigma H613) incubados a 4°C por 24 h.

Transcurrido el tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo, durante 2h. Para la CI se utilizaron Alexa Fluor 488 conejo anti- cabra (Invitrogen, Life Technologies) y Rojo Texas hecho en bovino anti-cabra IgG 1:100 (Santa Cruz biotechnology). Para el NBM se utilizaron Cy2 policlonal anti-conejo 1:100 y Cy3 burro anti-ratón 1:100 ambos de Jackson immunoresearch. Luego de la incubación todas las muestras fueron lavadas nuevamente e incubadas con DAPI (Vector Laboratories) durante 25 minutos; transcurrido el tiempo los tejidos fueron lavados nuevamente y preservados con medio de montaje Vectashiel H-1000 (Vector Laboratories), al finalizar se colocó un cubre objetos y se selló la laminilla con barniz transparente.

Para el análisis confocal se utilizó un microscopio marca Zeiss LSM 780 Meta confocal microscope by Carl Zeiss, Germany con un objetivo de 40 X de inmersión de aceite. Se utilizaron distintos lasers: para la excitación de Alexa 488 se utilizó un laser de 488nm; para el Cy3 y el Rojo Texas se utilizó un laser de 561 nm y para DAPI se utilizó un laser de 750 nm. Para el análisis de cuantificación de la imagen se utilizó el z-stack usando de 4 a 5 secciones consecutivas en el plano más intenso obteniendo 512 cada 40nm las cuales fueron procesadas por el programa Aim Image Examiner.

La población de células marcadas por los distintos fluoroforos fue evaluado por el programa Image J (software de análisis: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), para ambas estructuras. Se analizaron de manera independiente los fluoroforos verdes y rojos para contrastarse con el total de núcleos marcadas por DAPI.

### 12.3 Implantación de cánulas

Los animales fueron divididos en dos grupos: 18 animales a los que se les implantó una sonda de acero inoxidable en la CI izquierda y una guía sonda para microdiálisis en la CI derecha; y otros 18 que fueron operados bilateralmente con cánulas de acero inoxidable en el NBM y una guía sonda para microdiálisis en la CI derecha (Figura 15).

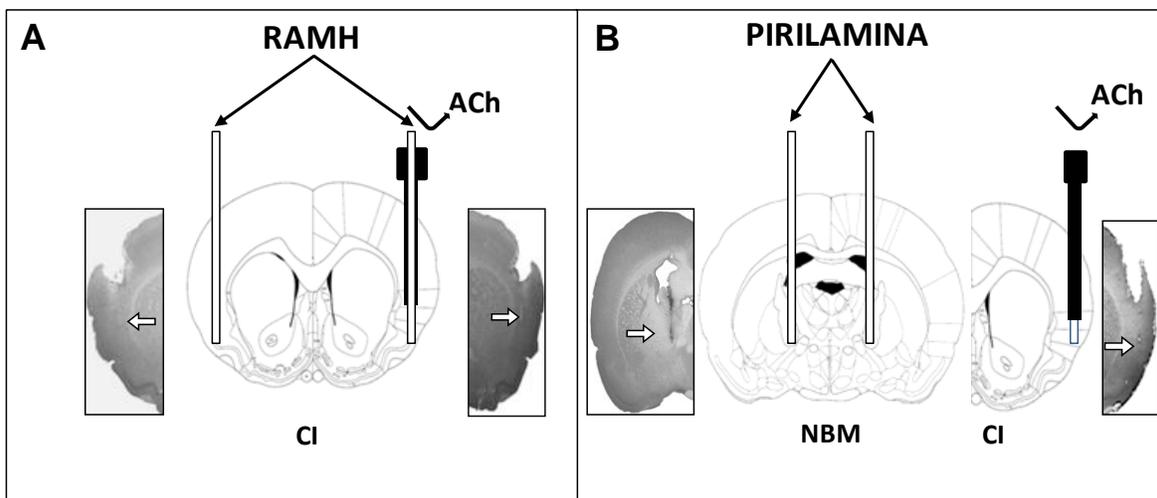


Figura 15. Diagrama representativo de la inserción de las cánulas y guías cánulas para sondas de microdiálisis en el NBM y en la CI. **A.** Localización bilateral de los inyectores mediante los cuales fue inyectado RAMH en la CI; del lado izquierdo se puede observar una fotomicrografía que muestra la trayectoria del inyector en la CI por medio del cual se inyectó RAMH; la fotomicrografía de la derecha muestra la localización de la guía sonda para microdiálisis en la CI, mediante la cual se colectaron las muestras para ser analizadas con el detector para ACh (N=18). **B.** Localización bilateral de los inyectores en el NBM y de la sonda para microdiálisis en la CI derecha. La imagen muestra la localización bilateral de las cánulas de acero inoxidable en el NBM y unilateral de la corteza insular. Se puede observar la fotomicrografía del lado izquierdo que muestra la trayectoria del inyector mediante el cual se administró pirilamina en el NBM. La fotomicrografía del lado derecho muestra la trayectoria de la sonda con doble función: inyección de fármacos y colección de muestras para analizar ACh.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (70 mg/kg)- xilacina (6 mg/kg), a los cuales se les aplicó 1ml/kg i.p. Una vez que los animales estuvieron bajo los efectos de la anestesia se rasuraron, limpiaron y desinfectaron la cabeza. Posteriormente fueron colocados en un estereotáxico para realizar una incisión con bisturí. Se removió el periostio, para exponer el cráneo y limpiar el área. Un grupo de 18 animales, fueron canulados en ambas cortezas insulares, utilizando una cánula de acero inoxidable a 2mm

sobre la CI izquierda (23 gauge) y una guía cánula para microdiálisis (BASi MD 2262) a 2mm de la CI derecha, siguiendo las mismas coordenadas (AP= +1.2 mm; L=+5.5 mm; V= -3.0 mm desde Bregma; Figura 15 A)(Paxinos, 2004b). Las cánulas y la guía de microdiálisis fueron fijadas al cráneo con dos tornillos y cemento de acrílico dental.

Un segundo grupo de 18 animales fueron canulados con ayuda de las coordenadas para el NBM (AP = -1.5 mm, L =  $\pm$  2.5 mm, V = -4.9 mm desde Bregma), con dos cánulas de acero inoxidable (23 gauge) a 2.5mm sobre el NBM y fijadas con dos tornillos de acero inoxidable y cemento de acrílico dental. Una tercera guía cánula para sonda de microdiálisis (BASi MD 2200), fue implantada a 2mm sobre la CI, siguiendo las mismas coordenadas (AP= +1.2 mm; L=+5.5 mm; V= -3.0 mm desde Bregma; Figura 15B)(Paxinos, 2004b).

#### **12.4 Entrenamiento del condicionamiento de aversión al sabor**

Luego de cinco días posteriores a la cirugía, los animales fueron divididos en grupos CI: [4-RAMH; 4-control para adquisición y 5-RAMH; 5-Control para evocación] y NBM: [5-pirilamina; 5-control para adquisición y 4-pirilamina; 4-control para evocación] y privados de agua durante 24 h. Durante este tiempo los animales fueron manipulados todos los días aproximadamente 3 minutos y habituados a beber agua en probetas graduadas, a las cuales tenían acceso solo una vez al día durante 15 minutos, dentro de la cámara de microdiálisis por 4 días, para establecer la basal de consumo.

Al quinto día se comenzó el procedimiento de microdiálisis, así como el día de la adquisición del CAS. En este día se sustituyó el agua ofrecida en probeta por una solución de sacarina al 0.1% y 45 min después del consumo, se indujo el malestar gástrico administrando LiCl i.p. (0.3 M, 10 ml/kg). Los animales permanecieron en la cámara de microdiálisis las siguientes 24 h después de la adquisición del CAS, para llevar a cabo la prueba de evocación del CAS. En el día de evocación los animales fueron expuestos por segunda ocasión a la solución de sacarina al 0.1%, pero sin la administración i.p. de LiCl. Los consumos de los animales fueron registrados, para evaluar la memoria del CAS.

## 12.5 Procedimiento para microdiálisis en libre movimiento

El ensayo de microdiálisis fue llevado a cabo el día de la adquisición del CAS. Se removieron los estiletes de la guía sonda para microdiálisis y de la cánula de acero de ambas cortezas insulares. En la cánula de acero inoxidable se colocó un inyector conectado a una bomba de infusión (CMA, microdiálisis) para administrar el fármaco (RAMH) en la CI izquierda, para la CI derecha se introdujo una sonda con triple entrada mediante la cual se inyectó el fármaco, se perfundió continuamente Ringer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sup>2</sup>) que contenía 10 µM de neostigmina para evitar la degradación de ACh en el espacio extracelular a un flujo de 2µl/min.

Para el grupo de inyecciones en el NBM, se removieron los dos estiletes sobre el NBM para colocar dos inyectores conectados a una bomba de infusión (CMA Microdiálisis), de manera similar se removió la guía cánula para microdiálisis de la CI derecha y se colocó una sonda para microdiálisis BASi MD 2200, mediante la cual se administró continuamente solución de Ringer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sup>2</sup>) que contenía 10 µM de neostigmina para evitar la degradación de ACh en el espacio extracelular a un flujo de 2µl/min. Tanto las muestras del grupo de la CI y del NBM fueron extraídas por un muestreador automático (BASi MD3006)(Figura 17).

Los primeros 60 minutos de muestra colectada en todos los grupos se desecharon. Luego se colectaron 4 muestras más con el fin de analizar la actividad basal. Al comenzar la fracción 5 se infundió la droga bilateralmente en ambos grupos (CI y NBM). Se colectaron otras 3 fracciones, en la fracción 7 se presentó la sacarina 0.1% como estímulo gustativo novedoso, posteriormente se colectaron otras 3 fracciones. Al inicio de la fracción 11 se administró i.p. la solución de LiCl (0.3M, 10ml/kg), sólo el día de la adquisición; cinco fracciones más fueron colectadas para verificar la basal de liberación, colectando un total de 15 muestras de 30 µl cada una. Cada una de las fracciones fue sellada e inmediatamente almacenada a -70°C. El procedimiento general de microdiálisis se muestra en la Figura 16. Para las muestras de la prueba del CAS, los animales continuaron perfundiéndose con Ringer continuamente durante la noche. Al día siguiente se siguió el

mismo protocolo del CAS en microdiálisis y se ofreció la segunda muestra de sacarina a la misma hora, pero sin administración de LiCl i.p., también se colectaron 15 fracciones. Las muestras obtenidas el día de la adquisición y prueba de evocación del CAS fueron almacenadas para su posterior análisis mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

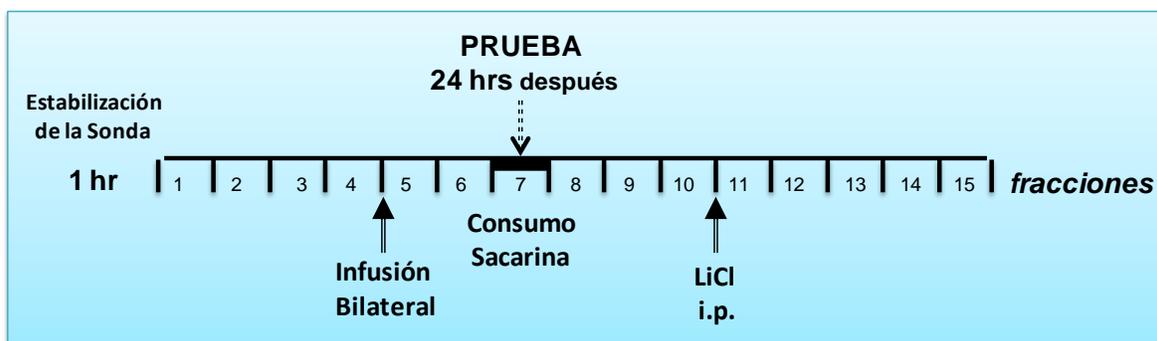


Figura 16. Esquema del protocolo de microdiálisis en libre movimiento, para la colecta de muestras en la CI en ambos grupos durante la adquisición y prueba del CAS. Luego de colectar 1 hr para la estabilización de la basal, se colectaron 15 fracciones cada una de 15 min a un flujo de  $2\mu\text{l}/\text{min}$ . La flecha negra al inicio de la fracción 5 indica el inicio de la infusión de los fármacos. La línea negra en la fracción 7 indica el tiempo del consumo de sacarina al 0.1%; la flecha al inicio de la fracción 11 muestra el momento de inyección i.p. de LiCl. Los animales continuaron perfundiéndose continuamente durante la noche. Para la prueba del CAS se siguió el mismo protocolo, sin infusión bilateral de fármacos e inyección i.p. de LiCl, solo se ofreció sacarina 0.1%.

## 12.6 Inyecciones locales

Luego de la cirugía los animales fueron separados aleatoriamente en los siguientes grupos farmacológicos: 9 **control**: animales infundidos bilateralmente en la CI o 9 en el NBM con solución salina (NaCl 0.9%). Grupos tratados con fármacos divididos en dos: 9 **RAMH** (100 mM/0.5 $\mu\text{l}$  salina) infundido bilateralmente en la CI y 9 **pirilamina** (100 mM/0.5 $\mu\text{l}$  salina) bilateralmente en el NBM.

Luego de establecer el consumo basal de agua, se llevó a cabo la adquisición del CAS. En este día a los animales se les removió los estiletes y se les insertó una aguja de inyección de 30 gauge, la cual protruyó 2 mm sobre la CI y 2.5 mm sobre el NBM respectivamente. Los inyectores estaban conectados a una manguera de polietileno unida a dos

microjeringas de 10  $\mu$ l cada una, reguladas por una bomba de infusión (Carnegie Medicine, Stockholm). Un total de 0.5  $\mu$ l/min de RAMH o pirilamina o solución salina para los controles, fue inyectada a los distintos grupos de animales. La aguja permaneció en el sitio 1 minuto más para permitir la difusión de los fármacos sobre el tejido, antes de retirar las agujas de inyección (Figura 17).

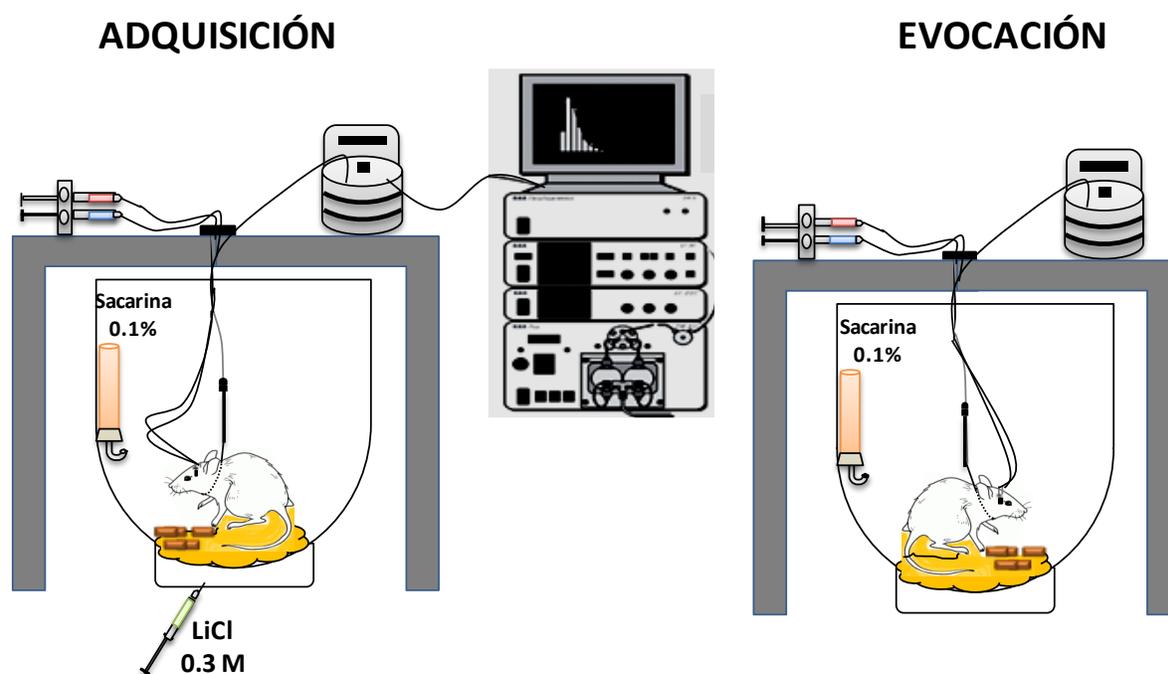


Figura 17. Protocolo de CAS con la técnica de microdiálisis en libre movimiento. Los animales fueron habituados a beber agua en una probeta graduada por 4 días para establecer la línea base de consumo de agua. Al quinto día, se llevó a cabo la adquisición del CAS. En este día los animales fueron inyectados con RAMH en la CI o pirilamina en el NBM, 30 minutos después se les ofreció sacarina al 0.1%, 45 minutos después se les inyectó i.p. LiCl a 0.3M (10ml/kg), posteriormente fueron colectadas cinco fracciones más para verificar las basales. Los animales permanecieron perfundiéndose con Ringer toda la noche hasta la prueba del CAS. Siguiendo el mismo protocolo de la adquisición, durante la prueba fueron colectadas seis muestras como línea base y luego se les ofreció nuevamente la sacarina 0.1%. En este día los animales no reciben inyección de fármaco, ni inyección i.p. de LiCl. El consumo de sacarina 0.1 %, fue registrado en ambos días y las muestras fueron analizadas mediante la técnica de HPLC.

### **12.7. Análisis de acetilcolina mediante HPLC**

Las muestras colectadas fueron analizadas mediante la técnica de HPLC con detección electroquímica (BASi inc, West Lafayette), para evaluar el contenido de ACh liberado en la CI. Las muestras fueron inyectadas en una columna polimérica de fase reversa (BASi), utilizando fase móvil de 50 mM de buffer fosfato (pH 8.5) con agente procleen antibacterial 0.05 % (BASi) a un flujo de 1 ml/min. La ACh contenida en las muestras fueron convertidas a acetato y colina en un reactor enzimático que contenía las enzimas AChE; las cuales fueron sustratos para la colina oxidasa (BASi), obteniendo peróxido de hidrogeno y betaína. El peróxido de hidrogeno fue detectado electroquímicamente por un electrodo de platino a +500 mV con un electrodo de referencia (Ag/AgCl). La sensibilidad del límite de detección fue aproximadamente a 0.1 pmol.

Para evaluar la cantidad de ACh contenida en las muestras, se realizó una curva de regresión lineal basada en estándares de ACh y colina, las áreas del pico obtenidas en cada una de las muestras fue comparada con la curva de los estándares de ACh. Los niveles de ACh de los dializados fueron calculados en pmol/15 min, siendo la recuperación de sonda alrededor del 60 %.

### **12.8 Histología**

Posterior a la obtención de muestras el día de la prueba del CAS, las sondas fueron desconectadas y los animales colocados en una caja de acrílico normal con agua y alimento *ad libitum*. Luego de ello los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital (113 mg/kg) y perfundidos transcardiacamente con paraformaldehído al 4% en solución salina isotónica 0.9 %. Los cerebros fueron extraídos y colocados toda la noche en formaldehído fresco y transferidos a solución de sacarosa al 30 % y almacenados a 4°C. Posteriormente se realizaron secciones coronales de 50 µm de grosor de la CI y del NBM. Las muestras de los tejidos fueron teñidas mediante la técnica de violeta de cresilo y se analizaron en un estereoscopio marca *Olympus*®. Los animales que mostraron la sonda y

el o los inyectores que difundieron el fármaco en el área de la CI y el NBM fueron incluidos en el análisis.

### **12.9. Análisis estadístico**

Para determinar el efecto de las drogas en los grupos durante la adquisición y prueba del CAS, se realizó un ANOVA simple, seguido de la prueba *post hoc* de Fisher a fin de comparar los consumos de los distintos grupos de animales. Los valores fueron considerados significativos a  $P < 0.05$ . Todos los resultados fueron expresados con el valor de la media +/- el error estándar. Para comparar los niveles de ACh extracelular de la CI entre los grupos, se realizó un análisis de ANOVA de medidas repetidas con la prueba *post hoc* de Fisher, considerando como significancia el valor de  $P < 0.05$ . Para evaluar la diferencia significativa de datos particulares, se realizó un ANOVA simple o prueba t entre fracciones particulares de grupos. El análisis estadístico fue realizado usando el Stat view (Abacus Concepts).

# RESULTADOS

---

---

## **XIII. RESULTADOS**

---

### **13.1 Verificación del sitio de las sondas**

Para verificar la colocación tanto de las canulas, inyectores así como de la sonda para microdiálisis, se analizaron minuciosamente las muestras de histología de los animales y se descartaron un 13 animales del total de 55 utilizados en los experimentos, debido a fallas en la colocación de los inyectores y de las sondas. Solo los tejidos de los animales canulados correctamente en las áreas del NBM y la CI fueron incluidos en los grupos de análisis.

### **13.2 Localización de los receptores a histamina H<sub>3</sub> en la corteza insular**

Con el fin de conocer la presencia de los receptores a histamina, se utilizó un cerebro de rata intacta, el cual fue procesado para su uso con la técnica de inmunofluorescencia. Se incubaron cortes de la corteza insular con el anticuerpo anti-H<sub>3</sub> y DAPI. El análisis de los resultados mediante el programa *Image J*, encontró que un 80% de las células fueron reactivas al anticuerpo para H<sub>3</sub> (Figura 18).

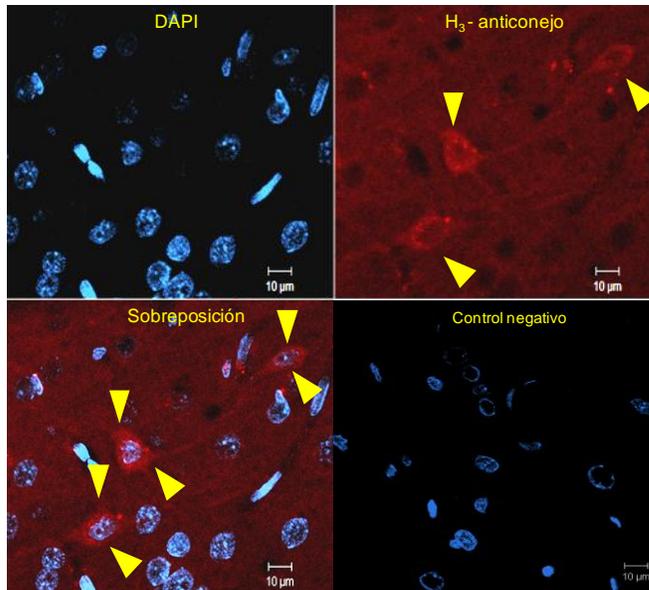


Figura 18. Imagen de la corteza insular que muestra las células positivas al anticuerpo anti-H<sub>3</sub>. En el cuadro superior izquierdo se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Del lado derecho superior se muestra la imagen correspondiente a las células reactivas para el anticuerpo anti-H<sub>3</sub>. En la parte inferior derecha se muestra la sobreposición de las imágenes. Del lado derecho inferior se muestra el control negativo del anticuerpo anti-H<sub>3</sub>. Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal LSM 780 60X.

### 13.3 Localización de los receptores a histamina H<sub>1</sub> en el NBM

Cortes del NBM, obtenidos del mismo cerebro, del cual se obtuvieron muestras para la CI, fueron incubados con anticuerpos anti-H<sub>1</sub> y DAPI. El análisis de los resultados encontró que un 65% del total de las células teñidas con DAPI, son reactivas al anticuerpo anti-H<sub>1</sub> (Figura 19).

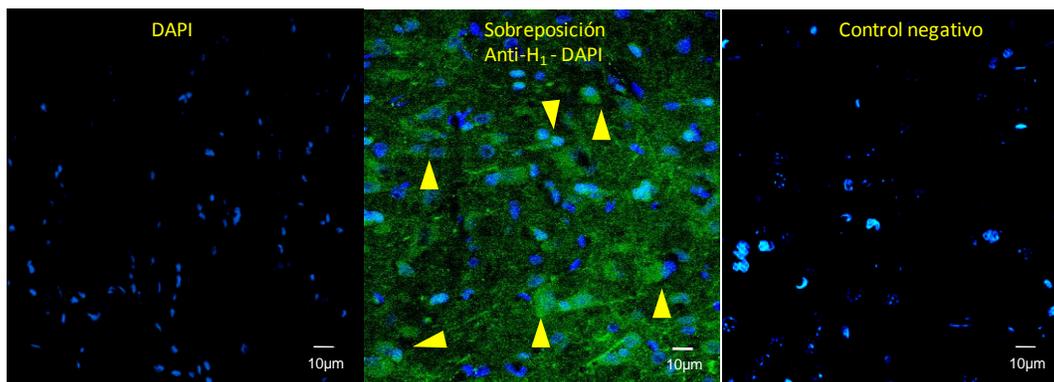


Figura 19. Imagen del NBM que muestra las células positivas al anticuerpo anti-H<sub>1</sub>. En el cuadro de la izquierda se muestran los núcleos teñidos con DAPI en un aumento de 20X. En el medio se muestra la imagen correspondiente a las células reactivas para el anticuerpo anti-H<sub>1</sub> en sobreposición con DAPI a 40X. El cuadro de la derecha se muestra el control negativo tomado con un 60X. Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal LSM 780.

### 13.4 Co-localización de los receptores a histamina H<sub>3</sub> en células GABAérgicas de la CI

Se usaron cinco cerebros más de ratas intactas, los cuales fueron preparados y cortados para la técnica de inmunofluorescencia de doble marcaje. Los resultados de estos análisis mostraron que un 85 % de las células son reactivas al anticuerpo anti-H<sub>3</sub>, de las cuales un 50% de estas células fueron marcadas con el anticuerpo anti-GAD<sub>65</sub>, mostrando que los receptores H<sub>3</sub> se encuentran presentes en células GABAérgicas de la corteza insular (Figura 20).

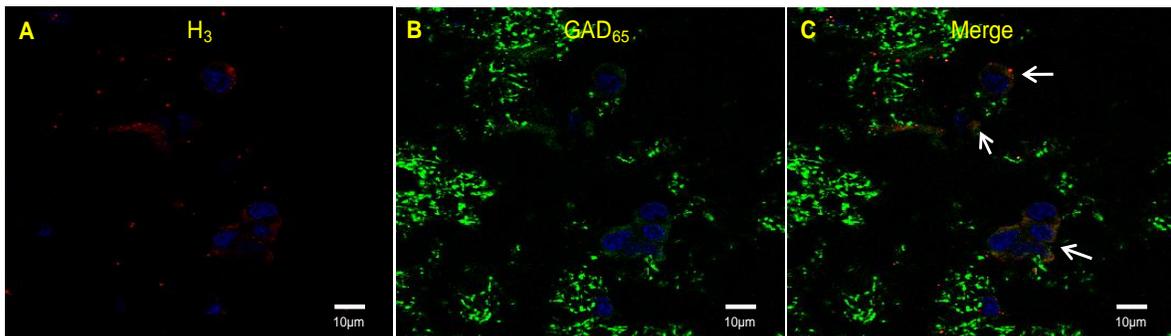


Figura 20. Análisis de inmunofluorescencia de doble marcaje para muestras de la CI. En el panel A, podemos observar las células reactivas al anticuerpo anti-H<sub>3</sub> (rojo Texas). En el panel C observamos a las células reactivas al anticuerpo anti-GAD<sub>65</sub> (Alexa 488). En el panel B observamos la sobreposición de ambas imágenes en el mismo plano focal. Todas las imágenes fueron tomadas por separado y contrastadas con DAPI. Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal LSM 780 60X

### 13.5 Co-localización de los receptores a histamina H<sub>1</sub> en células colinérgicas del núcleo basal magnocelular

Utilizando cortes del NBM de los mismos cinco cerebros utilizados para el análisis de la CI, se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje en la región del NBM. Se encontró que el 70% de la población celular del NBM reacciona al anticuerpo anti-H<sub>1</sub> y que el total de estas células también fueron positivas para el anti-ChAT (Figura 21). Estos resultados muestran que los receptores H<sub>1</sub> se encuentran expresados en las células colinérgicas del NBM.

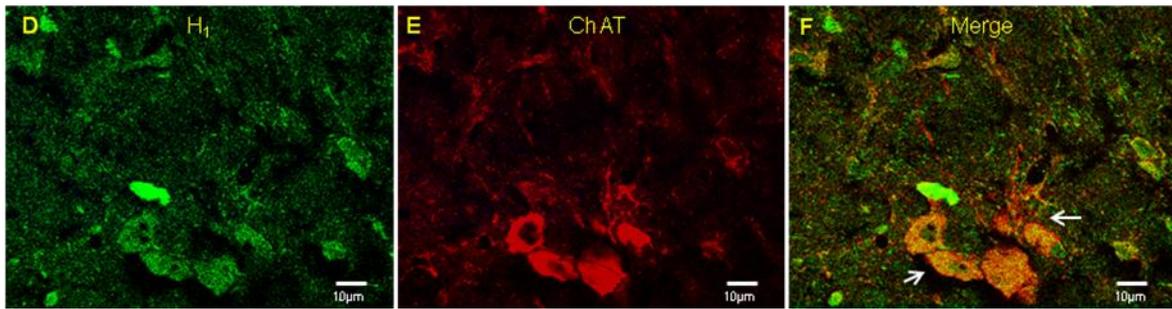


Figura 21. Análisis de inmunofluorescencia de doble marcaje para muestras del NBM. En el panel D, observamos las células reactivas al anticuerpo anti-H<sub>1</sub>. El panel E muestra las células reactivas al anticuerpo anti-ChAT y en el panel F se observa la sobre posición de ambas imágenes en el mismo plano focal. Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal LSM 780 60X.

### 13.6 La inyección de RAMH en la CI, minutos antes de la adquisición del CAS no afecta la ejecución del CAS

El análisis conductual de los experimentos llevados a cabo en animales inyectados con RAMH en ambas cortezas insulares, minutos antes de la adquisición del CAS, encontró que la activación de los receptores H<sub>3</sub>, antes del aprendizaje del CAS, no afecta la ejecución del CAS. Un ANOVA de medidas repetidas realizado sobre los consumos de los 8 animales tratados en la CI, minutos antes de la adquisición del CAS, no mostró diferencias significativas en los consumos de sacarina el día de la adquisición [ $F_{1,6} = 3.722, p > .05$ ], si se encontraron diferencias entre grupos el día de la evocación [ $F_{1,6} = 23.059, p < .01$ ], así como una diferencia entre consumos del grupo control, el día de la adquisición y evocación [ $F_{1,6} = 19.443, p < .05$ ]. La prueba *post hoc* de Fisher, no presentó diferencias entre los consumos de los grupos el día de la adquisición ( $p > .05$ ). Pero si se encontró una diferencia significativa entre grupos el día de la evocación ( $p < .01$ ) (Figura 22).

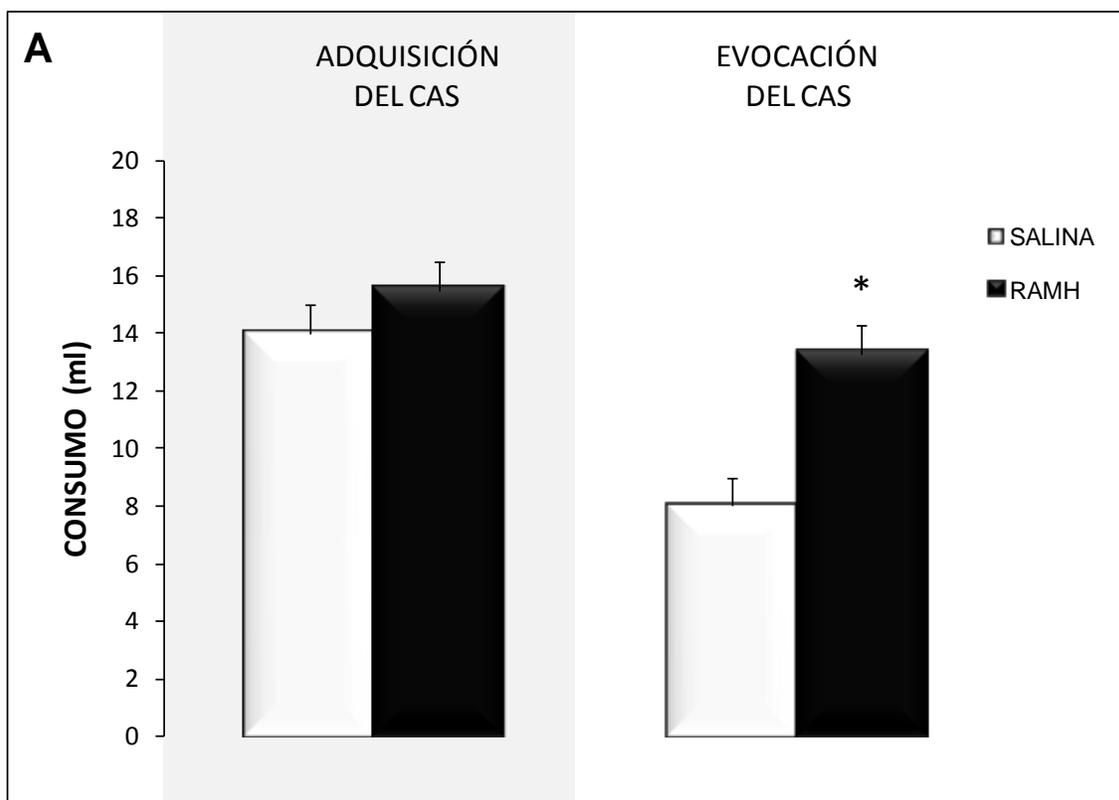


Figura 22. Consumo de los animales tratados bilateralmente con RAMH en la CI minutos antes de la adquisición del CAS. Las barras blancas muestran los consumos de los animales control que fueron inyectados con solución salina 0.9% (N=4). Las barras negras muestran los consumos de los animales tratados con RAMH (N=4). Ambos grupos fueron inyectados minutos antes de la presentación de sacarina el día de la adquisición. Se puede observar cómo los grupos tratados con RAMH antes de la adquisición muestran un consumo mayor que los animales control indicando un impedimento para evocar la memoria de aversión al sabor. \* $p < 0.05$ .

Estos datos muestran que la inyección de RAMH minutos antes de la adquisición del CAS, no afecta la motivación de los animales por beber sacarina. No obstante, se encontró que los 4 animales que recibieron las inyecciones de RAMH en la CI, antes de la adquisición del CAS, consumieron significativamente más sacarina durante la evocación del CAS a diferencia de los 4 animales control. Encontrando que la administración del agonista de  $H_3$ , impide la formación de la memoria del CAS (Figura 22).

### **13.7. La Inyección de RAMH en la CI modifica la liberación de ACh durante la adquisición del CAS**

De acuerdo a nuestro segundo objetivo experimental, se evaluaron las muestras obtenidas de la CI de los animales inyectados con RAMH en la CI, antes de la adquisición del CAS y se encontró que la inyección de RAMH disminuye la actividad de ACh durante el aprendizaje del CAS. La figura 23 muestra el análisis de los niveles de ACh en la CI, luego de la inyección de RAMH. El análisis de ANOVA de medidas repetidas no mostró diferencias significativas entre grupos [ $F_{1,6} = 2.703, p > .05$ ], ni interacción entre muestras de ambos grupos [ $F_{15,90} = 0.425, p > .05$ ], pero si encontró diferencias entre las muestras de un grupo [ $F_{15,90} = 3.465, p < .01$ ]. Al analizar este dato en particular, se realizó una prueba t para cada una de las fracciones del grupo control y se encontró diferencias significativas en los niveles obtenidos de ACh en la CI en las muestras 9 y 10 con respecto a la basal de las muestras 2 y 3 ( $p < .05$ ) (Figura 23).

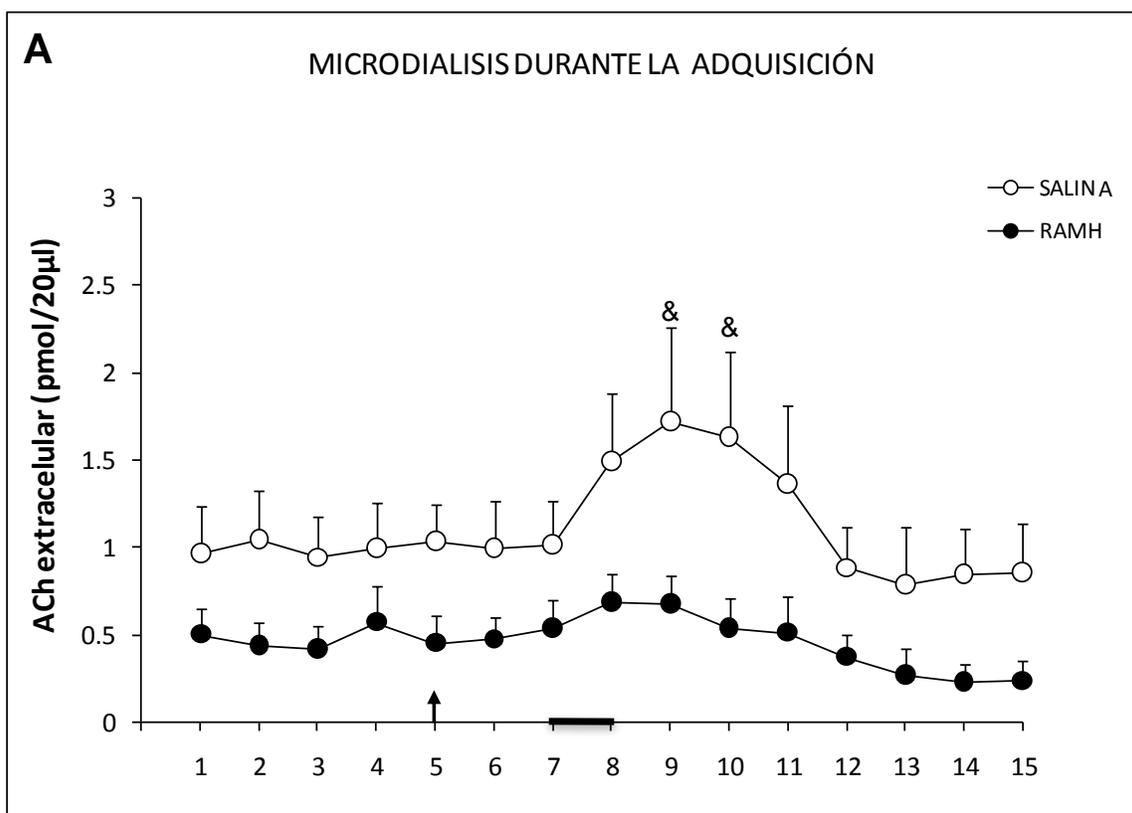


Figura 23. Actividad colinérgica de los grupos tratados con RAMH en la CI, durante la adquisición del CAS. Los círculos blancos muestran la actividad de ACh en CI, de los grupos control, los cuales fueron inyectados con solución de salina isotónica (N=4). Los círculos negros muestran la actividad de ACh en la CI de los grupos tratados con RAMH (N=4). La flecha indica el momento de la inyección de los fármacos. La barra negra indica el momento del consumo de sacarina. &  $p < 0.05$ .

### 13.8 La administración de RAMH en la CI, antes de la adquisición del CAS afecta la evocación de la memoria del CAS

Debido a la complejidad de los experimentos, se trabajaron grupos independientes para el análisis conductual y de la actividad de ACh durante el día de la evocación del CAS. Los resultados de estos experimentos encontraron que los animales inyectados con RAMH en ambas CI, antes de la adquisición del CAS, consumieron mayor cantidad de sacarina debido a que no fueron capaces de evocar la memoria del CAS. Un ANOVA de medidas repetidas en estos grupos, reveló diferencias significativas entre grupos [ $F_{1,8} = 8.010$   $p <$

.05], entre los consumos del grupo control [ $F_{1,8} = 43.350, p < .01$ ] y diferencias significativas entre los consumos de ambos grupos [ $F_{1,8} = 12.150, p < .01$ ]. La prueba de Fisher *post hoc*, no mostró diferencias significativas entre los consumos el día de la adquisición ( $p > .05$ ); pero sí el día de la evocación ( $p < .01$ ) (Figura 24).

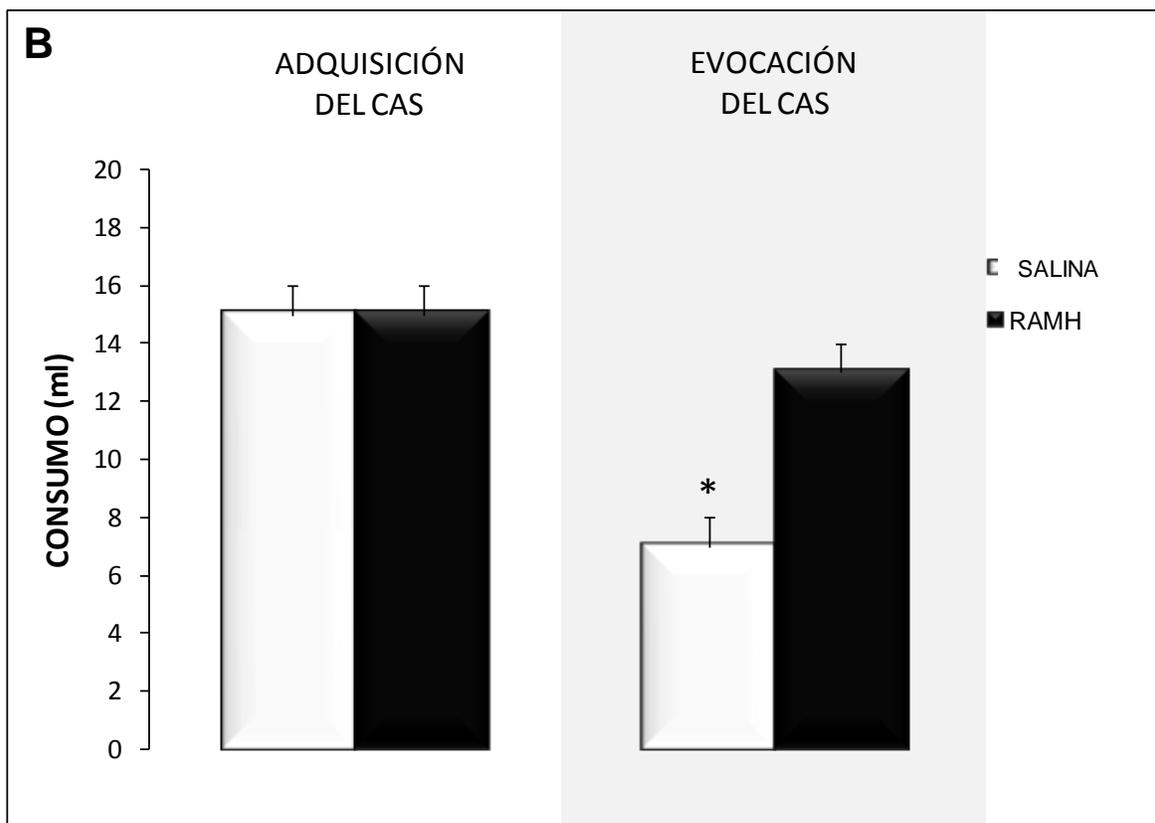


Figura 24. Consumo de los animales tratados bilateralmente con RAMH en la CI durante la adquisición del CAS y medido el día de la evocación. Las barras blancas muestran los consumos de los animales inyectados con solución salina 0.9% (N=5). Las barras negras muestran los consumos de los animales tratados con RAMH (N=5). Ambos grupos fueron inyectados el día de la adquisición. Se puede observar como los animales tratados con RAMH el día de la adquisición, presentan un consumo más alto de sacarina el día de la evocación que los animales control, mostrando el impedimento para evocar la memoria del CAS. \* $p < 0.05$ .

Los datos de estos grupos muestran, que la inyección de RAMH en la CI antes de la adquisición del CAS, evita la formación de la memoria del CAS.

### 13.9 La inyección de RAMH minutos antes de la adquisición del CAS afectan los niveles extracelulares de ACh en la CI durante la evocación de la memoria

El análisis de los niveles de la actividad de ACh en la CI, de los animales que fueron previamente inyectados con RAMH minutos antes de la adquisición del CAS, fueron analizados durante la evocación del CAS. Los resultados de estos experimentos mostraron que los niveles extracelulares de ACh en animales inyectados con RAMH, aumentan significativamente durante el consumo de sacarina en la evocación del CAS. Un ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias significativas entre grupos [ $F_{1,8} = 8.01, p < .05$ ], diferencias entre muestras de un grupo ( $F_{15,120} = 43.350, p < .01$ ), así como interacción entre muestras de ambos grupos ( $F_{15,120} = 12.150, p < .01$ ). Una prueba t para cada una de las muestras, del grupo tratado con RAMH, mostró diferencias significativas en los niveles de ACh en la CI en la fracción 8 ( $F_{15, 120} = 15.775, p < .01$ ), fracción 9 ( $F_{15,120} = 12.456, p < .01$ ) y fracción 10 ( $F_{15,120} = 7.031, p < .05$ ).

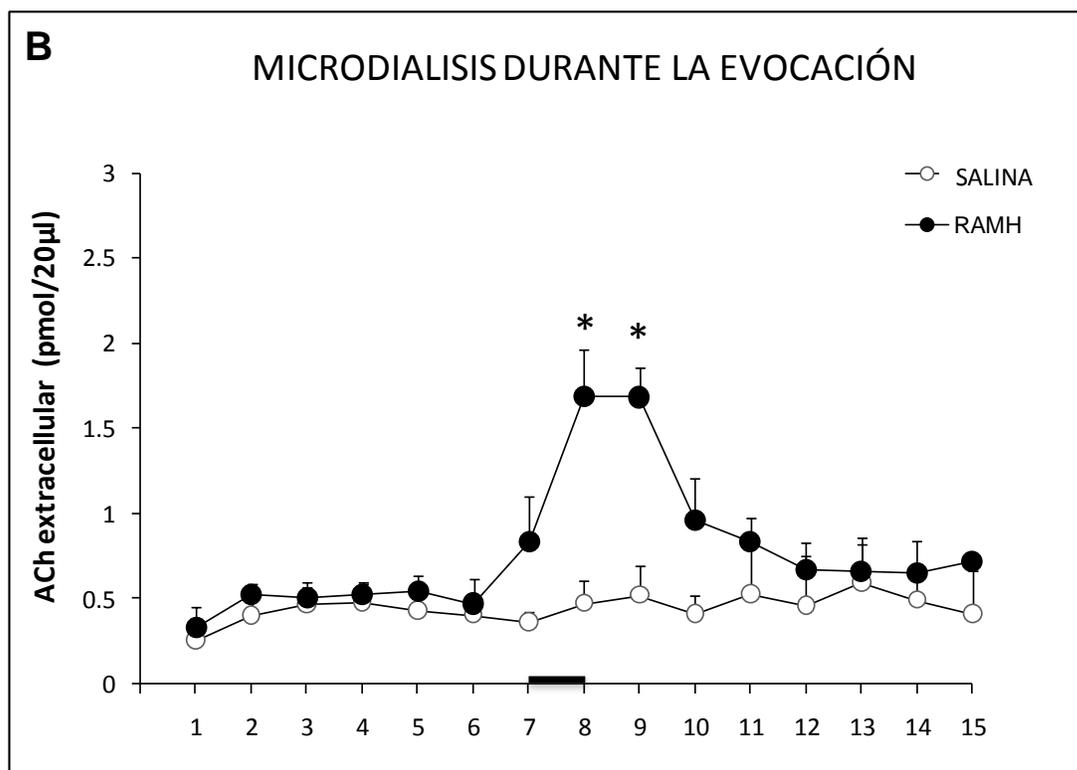


Figura 25. Actividad de ACh en la CI el día de la evocación del CAS, de los animales tratados con RAMH, antes de la adquisición del CAS. En círculos blancos se puede observar los animales control tratados con solución salina isotónica el día de la adquisición del CAS (N= 5). En círculos negros se observa la actividad colinérgica de los animales tratados con RAMH el día de adquisición (N=5). \* $p < 0.01$ .

Estos resultados sugieren que los incrementos en los niveles de ACh en la CI, podrían estar relacionados a la actividad de los receptores H<sub>3</sub> y al procesamiento del estímulo gustativo como novedoso en los grupos tratados con RAMH antes de la adquisición (Figura 25).

### **13.10 La inyección de pirilamina en el NBM, antes de la adquisición del CAS no afecta la ejecución del CAS**

Los resultados conductuales obtenidos de los animales tratados con pirilamina en el NBM antes de la adquisición del CAS, encontraron que la inyección de pirilamina no afecta la ejecución de la tarea del CAS. Los datos de los consumos fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas. No se encontró diferencias significativas en los consumos de sacarina del grupo control y tratado con pirilamina el día de la adquisición [ $F_{1,8} = 3.368$ ,  $p > .05$ ]; mostrando que el fármaco no afecta la conducta del animal para llevar a cabo el aprendizaje del CAS. Sin embargo se encontraron diferencias significativas entre los consumos de los grupos el día de la adquisición [ $F_{1,8} = 23.120$ ,  $p < .01$ ] e interacciones de los consumos por día [ $F_{1,8} = 6.480$ ,  $p < .05$ ]. La prueba *post hoc* de Fischer, confirmó los datos obtenidos pues no se encontró diferencias en el consumo de sacarina el día de la adquisición del CAS ( $p > .05$ ) (Figura 26).

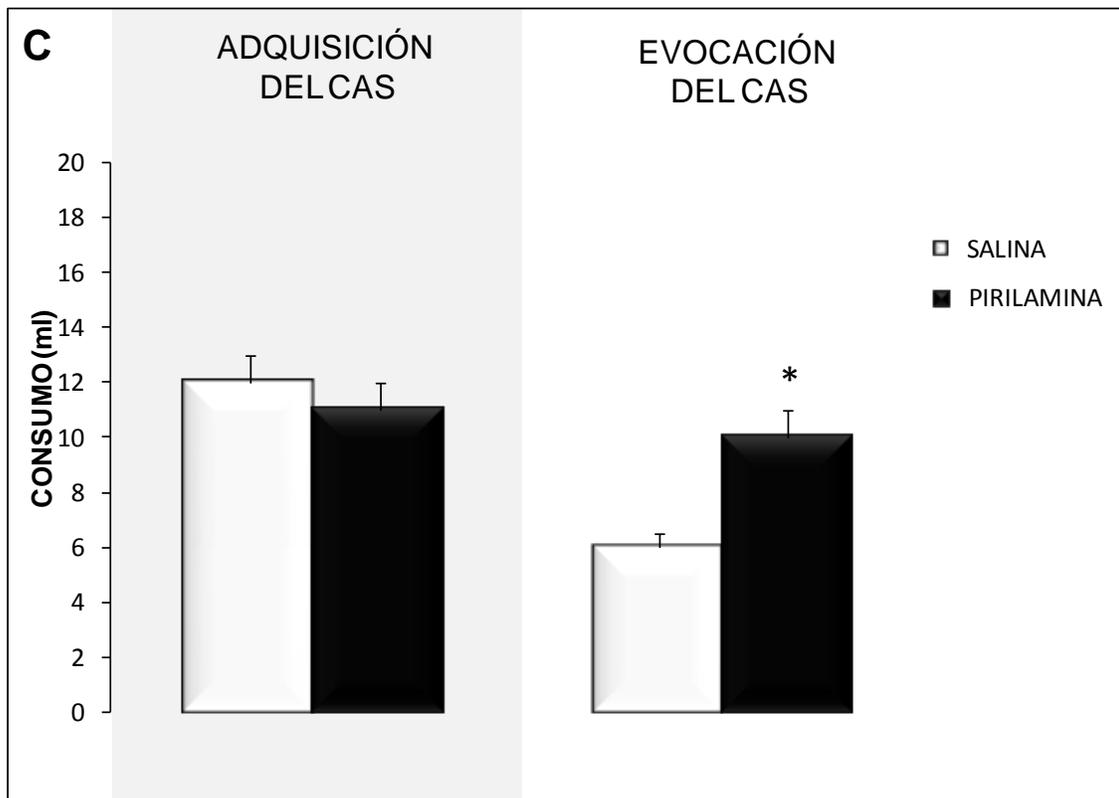


Figura 26. Consumo de los animales tratados con pirilamina durante la adquisición del CAS. Las barras blancas muestran los consumos de los animales control que fueron inyectados con solución salina 0.9% (N=5). Las barras negras muestran los consumos de los animales tratados con pirilamina en el NBM, minutos antes de la presentación de sacarina el día de la adquisición (N=5). La solución salina o Pirilamina fueron inyectados solo el día de la adquisición. En el día de la evocación del CAS se puede observar un incremento en el consumo de los animales que fueron tratados con pirilamina el día de la adquisición. \* $p < 0.05$ .

Estos resultados muestran que la inyección de pirilamina en el NBM, no afectan la ejecución de los animales durante el aprendizaje del CAS. Pero sí incrementa el consumo de los animales durante el día de la evocación, mostrando que los animales tratados con pirilamina no son capaces de formar una memoria gustativa de aversión a la sacarina.

### 13.11. Inyecciones de pirilamina en el NBM durante la adquisición del CAS modifican la liberación de ACh en la CI

El análisis neuroquímico de los animales inyectados en el NBM durante la adquisición del CAS, encontró que la actividad colinérgica en la CI disminuye significativamente. El ANOVA de medidas repetidas sobre la actividad colinérgica de las distintas muestras tomadas de

la CI, encontró diferencias significativas entre grupos [ $F_{1,8} = 6.159, p < .05$ ], diferencias significativas entre muestras de un mismo grupo [ $F_{15,120} = 6.343, p < .01$ ], así como diferencias e interacción entre las muestras de ambos grupos [ $F_{1,8} = 3.176, p < .01$ ]. Un análisis de ANOVA simple para cada una de las muestras del grupo control mostró diferencias en la fracción 9 [ $F_{1,8} = 21.809, p < .01$ ], con respecto al grupo inyectado con pirilamina (Figura 27).

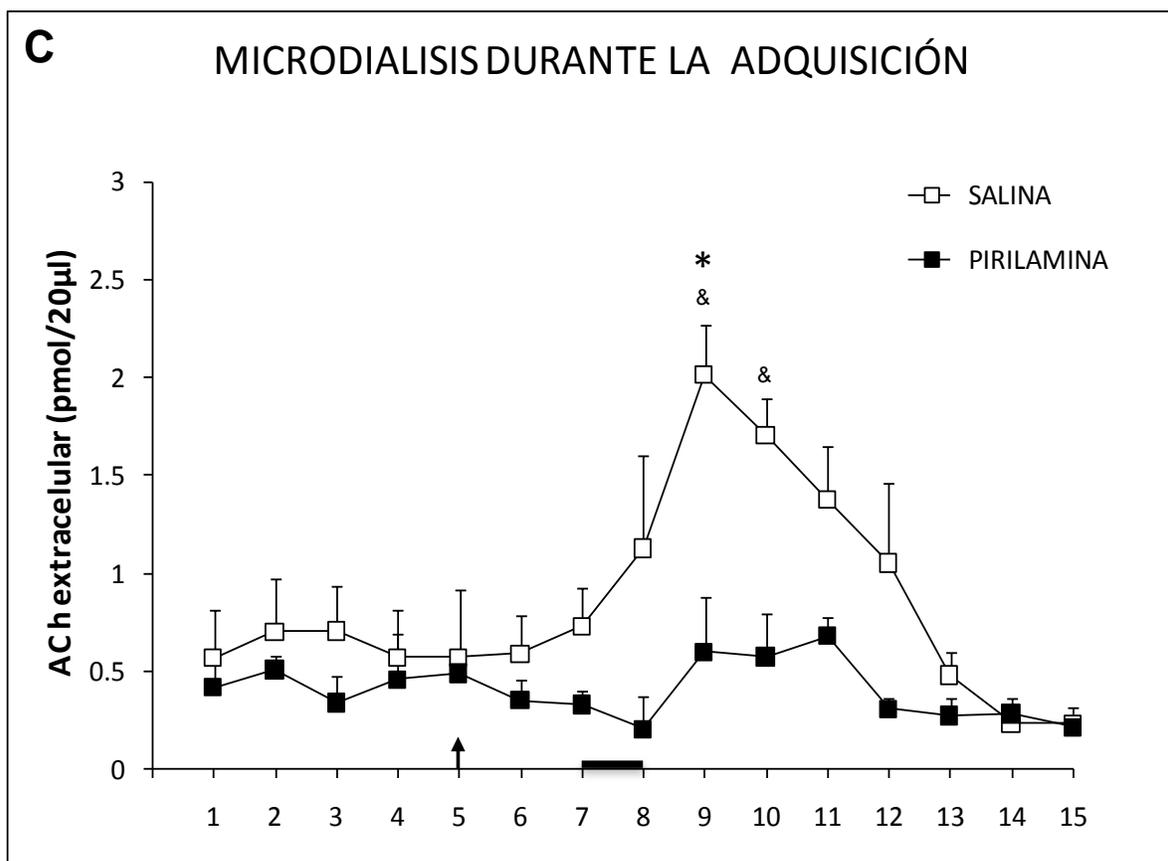


Figura 27. Actividad colinérgica en la CI de los grupos tratados con pirilamina en el NBM, antes del estímulo gustativo durante la adquisición del CAS. Los círculos blancos muestran la actividad de ACh de los grupos control, los cuales fueron inyectados con solución de salina isotónica (N=5). Los círculos negros muestran la actividad de ACh de los grupos tratados bilateralmente con pirilamina en el NBM (N=5). La flecha indica el momento de la inyección de los fármacos. La barra negra indica el momento del consumo de sacarina. \* $p < 0.01$  &  $p < 0.001$

Estos resultados mostraron que la pirilamina, antagonista de los receptores  $H_1$ , inyectada en el NBM, disminuye la actividad de ACh en la CI, durante el consumo de sacarina, la cual se encuentra relacionada al impedimento de la formación de la memoria.

### **13.12 La inyección de pirilamina durante la adquisición del CAS, impide la evocación de la memoria del CAS**

De manera similar a los grupos tratados con RAMH, se trabajaron grupos independientes para el análisis conductual y neuroquímico de los animales inyectados con pirilamina en el NBM durante la adquisición y evocación del CAS. Estos resultados encontraron que la inyección de pirilamina en el NBM impide la formación de la memoria del CAS. Un ANOVA de medidas repetidas para los días de consumos el día de la evocación encontró diferencias significativas el día de la evocación ( $F_{1,8} = 8.593$ ,  $p < 0.05$ ), sin encontrar diferencias en los consumos el día de la adquisición ( $F_{1,8} = 5.143$ ,  $p > .05$ ) o el diferencias entre el grupo tratado con pirilamina ( $F_{1,8} = 2.286$ ,  $p > .05$ ). La prueba post hoc de Fisher confirmó los datos pues mostró que los consumos de los animales control y los animales inyectados con pirilamina es significativamente diferente ( $p > .05$ ).

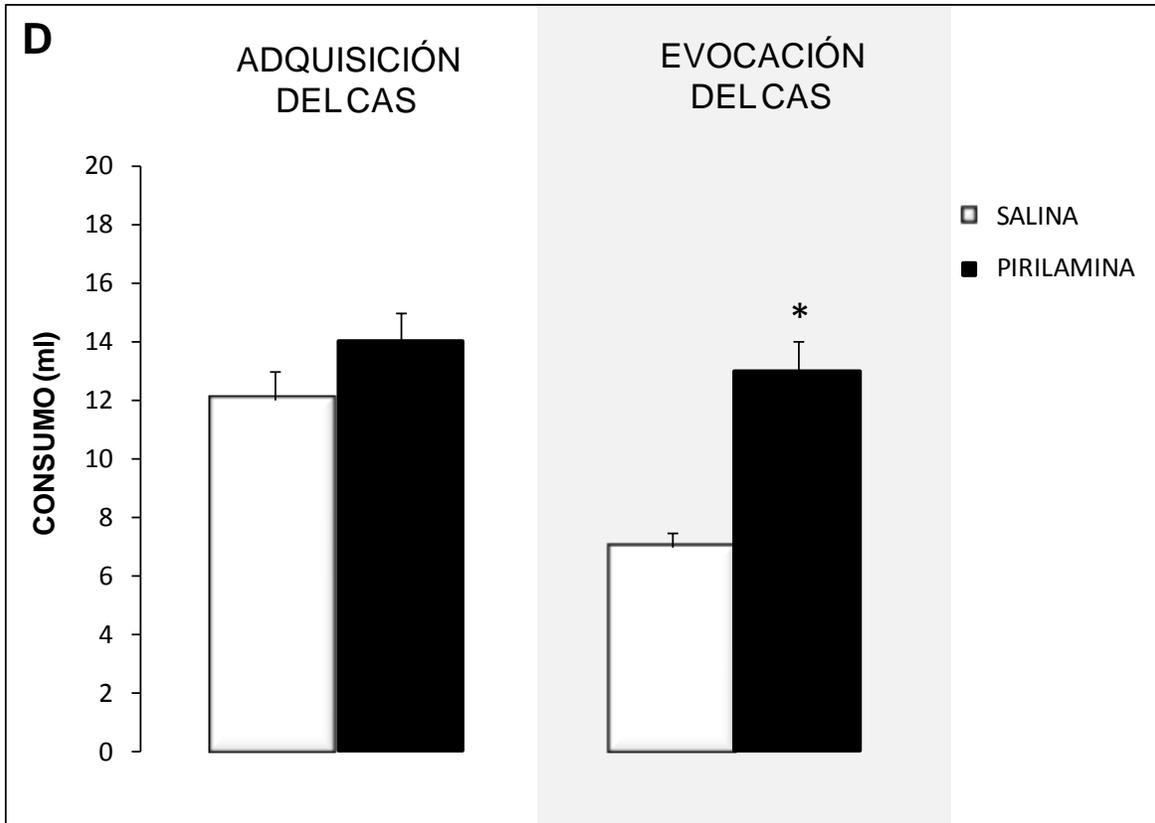


Figura 28. Consumo de los animales tratados bilateralmente con pirilamina en el NBM durante la adquisición del CAS y medido el día de la evocación. Las barras blancas muestran los consumos de los animales control (N=4). Las barras negras muestran los consumos de los animales tratados con pirilamina (N=4). Ambos grupos fueron inyectados el día de la adquisición. El área gris muestra los datos obtenidos el día de la evocación. Se puede observar que los animales tratados con pirilamina el día de la adquisición, muestra un consumo más alto de sacarina con respecto a los animales control. \* $p < 0.05$ .

Estos resultados muestran que la inyección de pirilamina en el NBM, incrementa el consumo de sacarina e impide la formación de la memoria aversiva a la sacarina.

### 13.13 La inyección de pirilamina en el NBM minutos antes de la adquisición del CAS afectan los niveles extracelulares de ACh en la CI durante la evocación de la memoria

Para el análisis de la actividad colinérgica en los grupos del día de la evocación, se encontró que la inyección de pirilamina en el NBM, antes de la adquisición del CAS tiende a incrementar la actividad colinérgica en la CI. Por medio de una ANOVA de medidas repetidas, se encontró diferencias significativas entre las muestras del grupo control [ $F_{15,90} = 2.793$ ,  $p < .01$ ], pero sin encontrar diferencias entre grupos [ $F_{15,90} = 1.199$ ,  $p > 0.5$ ], ni

interacción entre fracciones de ambos grupos [ $F_{15,90} = 1.329$ ,  $p > .05$ ]. Una prueba t realizada sobre las fracciones del grupo control encontró diferencias entre la fracción 9 y la fracción 1 ( $p < .05$ ). La prueba *post hoc* de Fischer, confirmó los datos obtenidos pues no se encontró diferencias en el consumo de sacarina el día de la adquisición del CAS ( $p > .05$ ) (Figura 29). Los resultados, indican que las inyecciones de pirilamina en el NBM antes de la adquisición del CAS, modifican la actividad colinérgica en la CI durante la evocación del CAS.

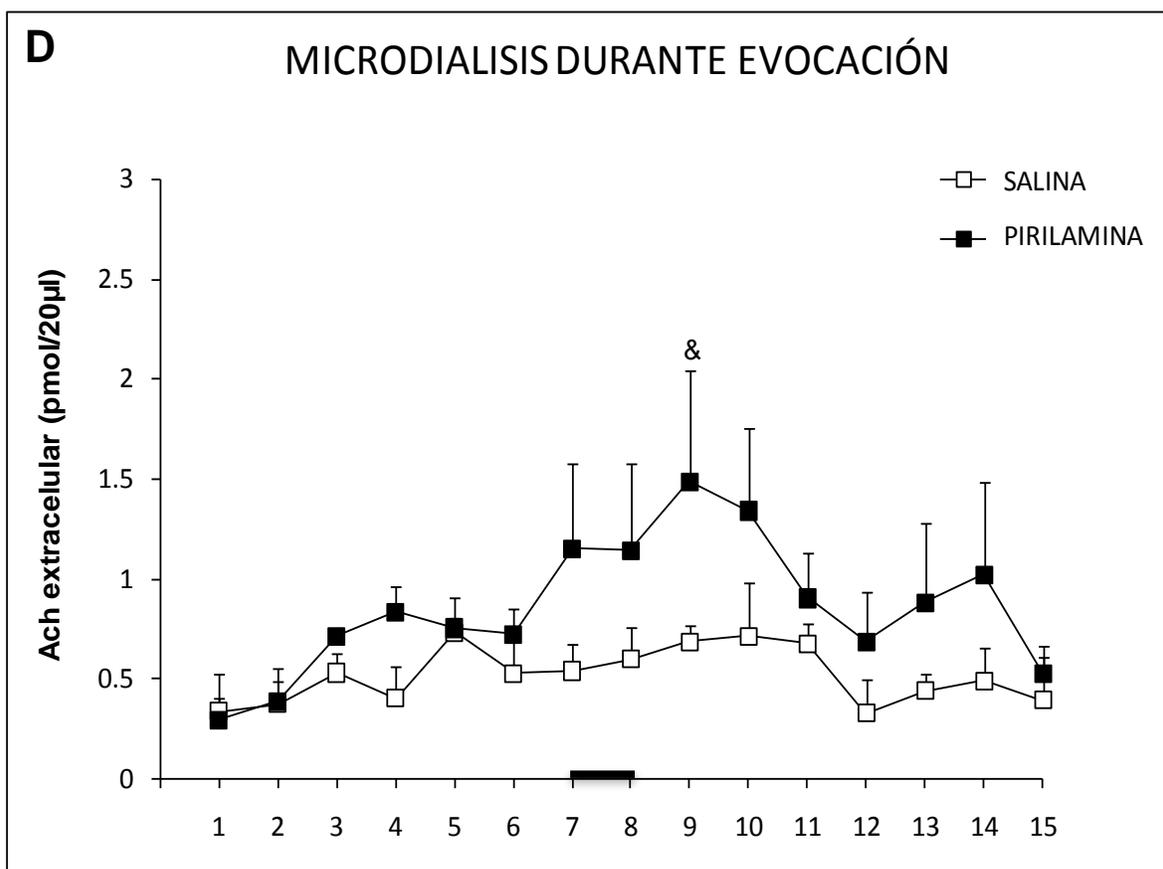


Figura 29. Actividad de ACh en la corteza insular el día del evocación del CAS, de los animales tratados bilateralmente con pirilamina en el NBM el día de la adquisición. En cuadrados blancos se muestran los grupos control (N=4). En cuadrados negros se observa la actividad colinérgica de los grupos tratados con pirilamina en el NBM el día de adquisición (N=4). El análisis de la prueba t mostró diferencias significativas entre la fracción 9 y las fracciones 1 y 2 del mismo grupo  $p < 0.05$ .

# DISCUSIÓN

---

---

---

## XIV. DISCUSIÓN

---

---

El objetivo principal del presente trabajo fue demostrar como el sistema histaminérgico a través de las acciones de sus receptores H<sub>1</sub> en NBM y H<sub>3</sub> en la CI, modula la actividad del sistema colinérgico, durante la formación y evocación de la memoria de aversión del sabor.

Teniendo como base estudios previos del laboratorio (Miranda et al., 1999; Miranda 2000), en donde se demostró que las proyecciones colinérgicas del NBM a la CI, son necesarias para el procesamiento del estímulo gustativo novedoso, se propuso conocer cuáles son los posibles sistemas de neurotransmisión implicados en el mecanismo de regulación de la liberación de ACh en la CI durante la adquisición del CAS.

En este sentido, varios trabajos han demostrado que el sistema histaminérgico se encuentra involucrado en la formación de la memoria (Bennetti et al., 2013; Blandina et al., 2004; De Almeida et al., 1986) y que este sistema es capaz de regular varios sistemas de neurotransmisión entre los que destaca el sistema colinérgico (Arrang et al., 1995; Giorgetti et al., 1997; Blandina et al., 1996; Bacciottini et al., 2001; Passani et al., 2000; Cecchi et al., 2001). Estos estudios sugieren que durante las diferentes fases del aprendizaje, los receptores a histamina tienen diversas funciones, relacionadas con la regulación colinérgica cortical.

En estudios previos de nuestro laboratorio (Puron-Sierra et al., 2009), que sirvieron de base para la presente tesis doctoral, se evaluaron los efectos de las inyecciones del antagonista del receptor H<sub>1</sub> (pirilamina) en el NBM y del agonista del receptor H<sub>3</sub> RAMH en la CI, antes de la adquisición del CAS. Los resultados de este trabajo, mostraron que el bloqueo de los receptores H<sub>1</sub> en el NBM y la activación de los receptores H<sub>3</sub> en la CI, impide la formación de la memoria aversiva del sabor, sugiriendo que las acciones de estos receptores podrían estar relacionadas con la modulación colinérgica cortical durante el aprendizaje del CAS.

Los resultados de inmunofluorescencia en cortes de la CI, del presente trabajo mostraron que un 85% del total de las células teñidas con DAPI (marcador de núcleos celulares), fueron marcadas con el anticuerpo anti- H<sub>3</sub> y se encontró que el 50% de éstas células marcadas con DAPI y anti H<sub>3</sub>, también fueron marcadas con anti GAD<sub>65</sub>, indicando que las neuronas GABAérgicas de la CI poseen receptores H<sub>3</sub>, los cuales se ha sugerido que pueden modular la actividad GABAérgica, necesaria

para la evocación de la memoria (Hasselmo et al., 2000). La modulación del tono colinérgico a través de la actividad GABAérgica cortical, se encuentra respaldada por los resultados obtenidos de estudios recientes del laboratorio (Rodríguez-García tesis de doctorado), que muestran se requiere de la supresión de la actividad GABAérgica en la CI, durante la adquisición de una memoria del sabor, para el procesamiento del sabor novedoso y de su activación durante el reconocimiento del sabor familiar.

Adicionalmente, en esta tesis se logró demostrar que un 70% de las células marcadas con anti-ChAT en el NBM, también fueron marcadas con el anticuerpo anti-  $H_1$  para histamina, sugiriendo que los receptores  $H_1$  a histamina pueden regular la actividad de las neuronas colinérgicas del NBM, que proyectan a la CI. Estas evidencias de la co-localización de los receptores  $H_1$  sobre neuronas colinérgicas dan explicación a los trabajos de otros autores que sugieren que la activación o bloqueo de los receptores  $H_1$  en el NBM, puede modificar la actividad colinérgica cortical (Cecchi et al., 2001; Gorelova et al., 2002).

Los resultados farmacológicos de la manipulación de los dos subtipos de receptores a histamina  $H_1$  en el NBM y  $H_3$  en la CI durante el CAS, concuerdan con otras evidencias de modelos conductuales distintos, que describen que el bloqueo de los receptores  $H_3$  o la manipulación de los receptores  $H_1$ , modifican el aprendizaje del laberinto elevado (Miyazaki et al., 1995) o interrumpen la formación de la memoria como el laberinto radial (Chen et al., 2000), evitación pasiva y reconocimiento al objeto (Giovannini et al., 1999) o afectan la memoria del condicionamiento al miedo (Passani et al., 2001; Benetti et al., 2013).

Los resultados de los experimentos de inmunofluorescencia, nos permiten integrar los datos derivados de la manipulación farmacológica y la cuantificación de ACh en la CI, para sugerir una correlación entre la actividad de los receptores a histamina  $H_3$  en neuronas GABAérgicas y  $H_1$  en neuronas colinérgicas con la regulación de la actividad colinérgica en la CI, durante el procesamiento de sabores novedosos, así como sugerir su posible función durante la evocación de la memoria de sabores familiares.

Particularmente, la técnica de microdiálisis en libre movimiento permitió describir, la acción de los antagonistas y agonistas histaminérgicos sobre la actividad colinérgica cortical, presente durante la adquisición del CAS y cuáles son sus consecuencias en la evocación de la memoria de aversión. Los resultados derivados de la inyección RAMH en la CI, permiten sugerir que la

activación de los receptores H<sub>3</sub>, generan una disminución significativa de la actividad colinérgica cortical, relacionada con la incapacidad de formar la memoria aversiva del condicionamiento. De modo que al activar los receptores H<sub>3</sub> en la CI, los cuales se encuentran acoplados a una proteína G<sub>i</sub> (Leurs et al., 1995), inducen una hiperpolarización de neuronas GABAérgicas de la CI, las cuales podrían encontrarse en un circuito inhibitorio con otra neurona GABAérgica, que podría regular a su vez el tono colinérgico cortical, durante el aprendizaje y evocación de la memoria del CAS. Este circuito de inhibición se encuentra apoyado por otros trabajos in vitro que describen que la activación de los receptores H<sub>3</sub> son capaces de modular neuronas GABAérgicas, quienes podrían modular a su vez la actividad de otros sistemas de neurotransmisión (Saras et al., 2008).

La importancia de la actividad GABAérgica para la modulación del tono colinérgico cortical, radica en que se ha encontrado que la disminución del tono GABAérgico en la CI es necesario para el procesamiento de estímulos novedosos gustativos, requiriéndose entonces un incremento de la actividad GABAérgica cortical para el reconocimiento de un sabor familiar (Tesis Gabriela Rodríguez)

Estos resultados derivados del presente trabajo doctoral y apoyados en otros trabajos del laboratorio (Gabriela Rodríguez), permiten sugerir que los receptores H<sub>3</sub> para histamina, localizados en neuronas GABAérgicas corticales facilitan la modulación del tono colinérgico cortical, ya que como se ha explicado anteriormente con los trabajos de Hasselmo et al., 1996, 2000, se requiere de un incremento de ACh durante el aprendizaje de una tarea para el procesamiento del estímulo novedoso y una disminución del tono colinérgico cortical durante la evocación de una memoria. De modo que al procesar un estímulo novedoso durante la adquisición del CAS, los receptores H<sub>3</sub> para histamina pudieran estar inhibidos de manera tal, que permitan un adecuado flujo colinérgico en la CI, para llevar a cabo los procesos intrínsecos celulares derivados del procesamiento del estímulo novedoso. A fin de que, cuando se requiera evocar una memoria ya existente, estos receptores puedan activarse para disminuir el tono colinérgico cortical, al momento de que el sujeto se encuentra expuesto a un estímulo familiar y se permita entonces la activación de circuitos internos corticales relacionados a la evocación de una información existente.

Con respecto a los receptores H<sub>1</sub> localizados en neuronas colinérgicas del NBM, la relación de la actividad de estos receptores y el tono colinérgico puede darse de manera directa, ya que se sabe

que los receptores  $H_1$  se encuentran acoplados a proteínas  $G_s$ , las cuales favorecen la excitación neuronal (Brady et al., 2012).

Por lo que, al bloquear la actividad de los receptores  $H_1$ , mediante la inyección de pirlamina, se inhibe la actividad colinérgica de las células del NBM, que proyectan hacia la CI -actividad necesaria para el procesamiento del estímulo novedoso- y al no haber el adecuado flujo colinérgico cortical, los sujetos experimentales no fueron capaces de aprender la memoria aversiva del CAS. Estos resultados son apoyados por otros estudios farmacológicos en rebanadas que encontraron que la inyección de pirlamina (antagonista  $H_1$ ) en neuronas del septum, puede disminuir la actividad colinérgica inducida por alto potasio (Gorelova et al., 1996), además de que se encontró que antagonistas de los receptores  $H_1$ , poseen propiedades antimuscarínicas (Hill et al., 1997). En conjunto, los resultados derivados de la presente tesis, apoyados en otros estudios in vitro de la actividad de los receptores  $H_1$ , muestran la importancia de la actividad de estos receptores como moduladores de la actividad colinérgica, en las primeras fases del aprendizaje.

En términos generales los resultados obtenidos en esta tesis, son coherentes con la información derivada de la actividad histaminérgica en la corteza, pues se sabe que la actividad de histamina incrementa durante los procesos de atención durante la presentación de estímulo nuevo (Torrealba et al., 2012), lo que sugiere que la activación de los receptores  $H_1$  en el NBM, son necesarios para regular la liberación de ACh cortical durante las primeras fases del aprendizaje, cuando se requiere un incremento de la actividad colinérgica para el procesamiento del estímulo novedoso, como lo ha propuesto el modelo computacional de (Hasselmo et al., 2004).

Analizando todos los resultados obtenidos del presente trabajo, se ha logrado sugerir un circuito de las posibles interacciones entre el sistema histaminérgico y colinérgico durante el aprendizaje del CAS. Proponiendo que la actividad de histamina tiene una función dual durante el aprendizaje y la evocación: una a nivel excitatorio, a través de la actividad de los receptores  $H_1$  localizados en los cuerpos celulares del NBM y otra inhibitoria a nivel cortical, a través de las acciones de los receptores  $H_3$  ubicados sobre neuronas GABAérgicas (Figura 30).

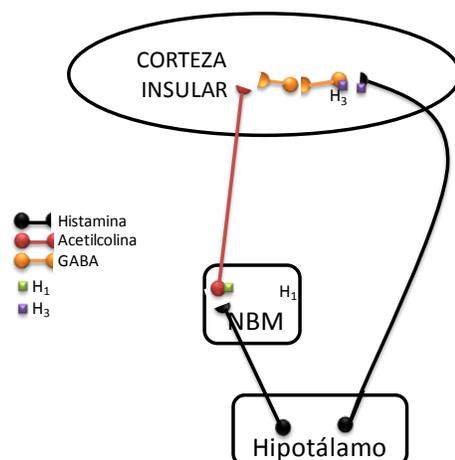


Figura 30. Propuesta del circuito de regulación sistema histaminérgico-colinérgico durante el aprendizaje del CAS. Las flechas negras muestran la actividad del sistema histaminérgico. La flecha roja indica la actividad colinérgica proveniente del NBM, que proyecta a la CI. Las neuronas amarillas representan la actividad GABAérgica en la CI (Modificado de Bacciottini et al., 2001).

Esta propuesta también genera más preguntas, sobre la función de estos receptores en las estructuras opuestas  $H_1$ -CI y  $H_3$ -NBM, de modo que se requieren más estudios para confirmar que las manipulaciones de los receptores a histamina en estructuras opuestas, pueden modificar la actividad colinérgica necesaria para el aprendizaje y formación de una memoria.

Además, se pueden realizar estudios con la técnica de electrofisiología o registro celular adicionales, para esclarecer los mecanismos intracelulares desencadenados tras la activación de la relación de los receptores  $H_3$  en la CI y  $H_1$  en el NBM, sobre todo durante la activación de los receptores  $H_3$  y la respuesta de las neuronas GABAérgicas, donde el circuito parece ser más elaborado. También se propone cuantificar la actividad de GABA en la CI, luego de la inyección del RAMH en la CI o pirilamina en el NBM, durante la adquisición y evocación del CAS, para esclarecer la relación que existe entre histamina-GABA-ACh.

Es claro que este trabajo representa una pequeña parte para comprender el engrama de una memoria del tipo aversiva, pues existen varios sistemas implicados en el procesamiento de estímulos aversivos, entre los que se encuentra el sistema noradrenérgico, adrenérgico, glutamatérgico y GABAérgico, los cuales podrían tener una relación estrecha con la actividad del sistema histaminérgico y colinérgico durante la cognición.

En conclusión los datos obtenidos del presente trabajo, permitieron por primera vez correlacionar los resultados de técnicas como la inmunofluorescencia con la actividad neuroquímica de ACh, presente durante la ejecución de la conducta simultáneamente. Aportado evidencia relevante que puede ayudar establecer un circuito que integra la participación de dos sistemas de neurotransmisión relacionados con atención, aprendizaje y memoria los cuales pueden interactuar coordinadamente para favorecer la formación de una tipo de memoria. Estos datos podrían apoyar otros estudios relacionados con la modulación de ACh durante la formación de una memoria.

# CONCLUSIONES

---

---

---

## XV. CONCLUSIONES

---

---

1.- Las neuronas GABAérgicas de la CI poseen receptores a histamina H<sub>3</sub>, y las neuronas colinérgicas del NBM poseen receptores H<sub>1</sub>.

2.- La administración de RAMH, agonista del receptor H<sub>3</sub> en la CI, antes de la presentación del sabor novedoso durante la adquisición del CAS, disminuyó la liberación de ACh y la aumentó durante la evocación, impidiendo la formación de la memoria de aversión al sabor.

3.- El bloqueo de los receptores H<sub>1</sub>, en el NBM antes de la presentación del sabor novedoso durante la adquisición del CAS, disminuyó la liberación de ACh y la aumentó durante la evocación, impidiendo la formación de la memoria de aversión al sabor.

En conclusión, los datos obtenidos en esta tesis nos permiten demostrar que la actividad colinérgica en la CI, puede estar finamente regulada por dos tipos de receptores histaminérgicos localizados en el NBM y la CI, los cuales coordinan el procesamiento del estímulo novedoso y familiar durante la formación de la memoria gustativa.

# REFERENCIAS

---

---

---

## XVI. REFERENCIAS

---

---

- Acquas E, Wilson C, Fibiger HC (1996) Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation and fear. *J Neurosci* 16 3089-3096.
- Adams C, Cepeda C, Boylan MK, Fisher RS, Hull CD, Buchwald NA, Wainer BH, Levine MS. (1986) Basal forebrain neurons have axon collaterals that project to widely divergent cortical areas in the cat. *Brain Res* 12; 397(2):365-71.
- Alvarez EO, Banzan AM (1996) Hippocampal histamine receptors: possible role on the mechanisms of memory in the rat, II. *J Neural Transm* 1996; 103: 147-156.
- Alvarez EO, Ruarte MB, Banzan AM (2001) Histaminergic systems of the limbic complex on learning and motivation. *Behav Brain Res* 2001; 124: 195-202.
- Allen G, Saper C, Hurley K, Cechetto D (1991) Organization of visceral and limbic Connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol* 311, 1–16.
- Arrang JM, Drutel G, Schwartz JC (1995a) Characterization of histamine H3 receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. *Br J Pharmacol* 114:1518-1522.
- Arrang JM, Drutel G, Garbarg M, Ruat M, Traiffort E, Schwartz JC (1995b) Molecular and functional diversity of histamine receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 757:314-323.
- Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, Lecomte JM, Pollard H, Robba M, Schunack W, Schwartz JC (1987b) Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. *Nature* 327:117-123.
- Bacciottini L, Passani MB, Mannaioni PF, Blandina P (2001) Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. *Behav Brain Res* 124:183-194.
- Bartko SJ, Romberg C, White B, Jürgen Wess, Bussey T J, Saksida L M (2011) Intact attentional processing but abnormal responding in M1 muscarinic receptor-deficient mice using an automated touchscreen method. *Neuropharmacology* 61(8): 1366-1378.
- Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414.
- Beaulieu C, Somogyi P (1991) Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol* 304:666-680.
- Benetti F, Baldi E, Bucherelli C, Blandina P, Passani MB (2013) Histaminergic ligands injected into the nucleus basalis magnocellularis differentially affect fear conditioning consolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:575-582.
- 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, Prado Alcalá R A, López García JC (2001) Memoria: dónde reside y cómo se forma. Mexico, D.F.

- Bemúrdez-Rattoni F (2004) Molecular mechanisms of taste- recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5 (3): 209-17.
- Bermudez-Rattoni F (2014) The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 109C:207-216.
- Berridge CW, Bolen SJ, Manley MS, Foote SL (1996) Modulation of forebrain electroencephalographic activity in halothane-anesthetized rat via actions of noradrenergic beta-receptors within the medial septal region. *J Neurosci* 16:7010-7020.
- Bigl V, Woolf NJ, Butcher LL (1982) Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull* 8:727-749.
- Botly LC, De Rosa E (2009) Cholinergic deafferentation of the neocortex using 192 IgG-saporin impairs feature binding in rats. *J Neurosci* 1;29(13):4120-30.
- Bina K, Rusak B, Semba K (1993) Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurology* 335(2):295-307.
- Bouthenet ML, Ruat M, Sales N, Garbarg M, Schwartz JC (1988) A detailed mapping of histamine H1-receptors in guinea-pig central nervous system established by autoradiography with [125I]iodobolpyramine. *Neuroscience* 26: 553–600.
- Bures JB-R, F. Yamamoto, T. (1998) *Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind*: Oxford University Press.
- Bures J, Buresova O, Ivanova SF (1991) Brain stem mechanism of conditioned taste aversion learning in rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 99(5): A 131-4.
- Burkey A, Carstens E, Wenniger J, Tang J, Jasmin L(1996) An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *J Neurosci* 16, 6612–6623.
- Burkey A, Carstens E, Jasmin L(1999) Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. *J Neurosci* 19, 4169–4179
- Byrne JH (2009) *Concise Learning and Memory*. San Diego CA: Elsevier Academic Press.
- Blandina P, Efoudebe M, Cenni G, Mannaioni P, Passani MB (2004) Acetylcholine, histamine, and cognition: two sides of the same coin. *Learn Mem* 11:1-8.
- Blandina P, Giorgetti M, Cecchi M, Leurs R, Timmerman H, Giovannini MG (1996a) Histamine H3 receptor inhibition of K(+)-evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm Res* 45 Suppl 1:S54-55.
- Blandina P, Giorgetti M, Bartolini L, Cecchi M, Timmerman H, Leurs R, Pepeu G, Giovannini MG (1996b) Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. *Br J Pharmacol* 119:1656-1664.
- Blaker SN, Amstrong DM, Gage FH (1988) Cholinergic neurons within the rat hippocampus: response to fimbria-fornix transection. *Journal of Comparative Neurology*, 272, 127.
- Brady ST, George J. Siegel, M.D., R. Wayne Albers, Ph.D., Donald L. Price, M.D. (2012) *Basic Neurochemistry, principles of molecular, cellular and medical neurobiology*, Fifth edition Edition. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press.

- Bran MR, Buckley NJ, Bonner TI (1988) The striatum and cerebral cortex express different muscarinic receptors RNAs, FEBS Lett, 230-90.
- Braun J, Kiefer S, Ouellet J(1981)Research note psychic ageusia in rats lacking gustatory neocortex. Exp Neurol 72, 711-716.
- Brejč K, Van Dijk W J, Klassen R V (2001) Crystal structure of an Ach binding protein domain of nicotinic receptors. Nature 411, 269-276.
- Cangioli I, Baldi E, Mannaioni PF, Bucherelli C, Blandina P, Passani MB (2002) Activation of histaminergic H<sub>3</sub> receptors in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. Eur J Neurosci 16:521-528.
- Cape EG, Jones BE (1998) Differential modulation of high-frequency gamma-electroencephalogram activity and sleep-wake state by noradrenaline and serotonin microinjections into the region of cholinergic basal ganglia neurons. J Neurosci 18:2653-2666.
- Carnes KM, Fuller TA, Price JL (1990) Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. J Comp Neurol 302:824-852.
- Cecchi M, Giorgetti M, Bacciottini L, Giovannini MG, Blandina P (1998) Increase of acetylcholine release from cortex of freely moving rats by administration of histamine into the nucleus basalis magnocellularis. Inflamm Res 47 Suppl 1:S32-33.
- Cecchi M, Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P (2001) Cortical acetylcholine release elicited by stimulation of histamine H<sub>1</sub> receptors in the nucleus basalis magnocellularis: a dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. Eur J Neurosci 13:68-78.
- Cechetto DF (1987) Central representation of visceral function. Fed Proc 46:17-23.
- Cenni G, Blandina P, Mackie K, Nosi D, Formigli L, Giannoni P, Ballini C, Della CL, Francesco MP, Beatrice PM (2006). Differential effect of cannabinoid agonists and endocannabinoids on histamine release from distinct regions of the rat brain Eur J Neurosci 24: 1633–1644.
- Clampham J, Kilpatrick GJ (1992) Histamine H<sub>3</sub> receptors modulate the release of acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex; evidence for the possible existence of H<sub>3</sub> receptor subtypes. Br J Pharmacol 107, 919-923.
- Craig AD, Chen K, Bandy D, Reiman EM (2000) Thermosensory activation of insular cortex. Nat Neurosci. 3, 184-190.
- Craig AD(2002) How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. Nat Rev Neurosci. 3, 655-666.
- Craig AD (2003). Interoception: the sense of the physiological condition of the body. Curr Opin Neurobiol. 13: 500-505
- Criado Herrero M (2011) El receptor Nicotínico de Acetilcolina. Instituto de Neurociencias Sant Joan d'Alcant, Alicante España. Abril 1-6.
- Changeux JP, Deviller-Thiéry A, Chemouilli P (1984) Acetylcholine receptor: an allosteric protein. Science 225:1335-1345.
- Da Silveira FC, Benetti F, Monteiro Sda C, Izquierdo I (2013) The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. Neurobiol Learn Mem 103:64-71.

- Dade LA, Zatorre RJ, Jones Gotman M (2002) Olfactory learning: Convergent findings from lesion and brain imaging studies in humans. *Brain* 125, 86-10.
- De Almeida e Izquierdo (1986 ) Memory facilitation by histamine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 283:193-198.
- De Almeida and Izquierdo (1988) Intracerebroventricular histamine, but not 48/80, cause postraining memory facilitation in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 291: 202-207.
- Dere E, Zlomuzica A, De Souza Silva MA, Ruocco LA, Sadile AG, Huston JP (2010) Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behav Brain Res* 31;215(2):209-20.
- Descarries L, Krnjevic, Steriade M (2004) *Acetylcholine in the cerebral cortex*. Elsevier B.V
- Detari L, Rasmusson DD, Semba K (1997) Phasic relationship between the activity of basal forebrain neurons and cortical EEG in urethane-anesthetized rat. *Brain Res* 759:112-121.
- Detari L, Rasmusson DD, Semba K (1999) The role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex. *Prog Neurobiol* 58:249-277.
- Dringenberg HC, Vanderwolf CH (1997) Neocortical activation: modulation by multiple pathways acting on central cholinergic and serotonergic systems. *Exp Brain Res* 116:160-174.
- Dudchenko P, Sarter M (1991) GABAergic control of basal forebrain cholinergic neurons and memory. *Behav Brain Res* 42:33-41.
- 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.
- Dunnet SB, Everitt BJ, Robbins TW (1991) The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequence of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci* 14(11):494-501.
- Eckenstein F, Thoenen H (1983) Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience Letters* 36, 211.
- Ericson H, Blomqvist A, Kohler C (1991) Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *J Comp Neurol* 311: 45–64.
- Evenden JL, Marston HM, Jones GH, Giarnini V, Lenard L, Everitt BJ, Robbins TW (1989) Effects of excitotoxic lesion of the substantia innominata, ventral and dorsal globus pallidus on visual discrimination acquisition, performance and reversal in the rat. *Behav Brain Res* 1;32(2):129-49.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649-684.
- Formaggio E, Dalfini AC, Fazzini F, Fumagalli G, Chiamulera C (2011) GABAergic neurons expressing p75 in rat substantia innominata and nucleus basalis. *Mol Cell Neurosci* 46:625-632.
- Forunier GN, Semba K, Rasmusson DD (2004) Modality and region specific acetylcholine release in the rat neocortex. *Neuroscience* 126(2): 257-62.

- Frotscher M, Schlander M, Leranth C (1986) Cholinergic neurons in the hippocampus: a combined light and electron-microscopic immunocytochemistry study in the rat. *Cell and Tissue Research*, 246, 293.
- Giannoni P, Medhurst AD, Passani MB, Giovannini MG, Ballini C, Corte LD, Blandina P (2010) Regional differential effects of the novel histamine H3 receptor antagonist 6-[(3-cyclobutyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin-7-yl)oxy]-N-methyl-3-pyridine carboxamide hydrochloride (GSK189254) on histamine release in the central nervous system of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 332:164-172.
- Giannoni P, Passani MB, Nosi D, Chazot PL, Shenton FC, Medhurst AD, Munari L, Blandina P (2009) Heterogeneity of histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* 29:2363-2374.
- Giorgetti M, Bacciottini L, Bianchi L, Giovannini MG, Cecchi M, Blandina P (1997) GABAergic mechanism in histamine H3 receptor inhibition of K(+)-evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm Res* 46 Suppl 1:S33-34.
- Giovannini MG, Giovannelli L, Bianchi L, Kalfin R, Pepeu G (1997) Glutamatergic modulation of cortical acetylcholine release in the rat: a combined in vivo microdialysis, retrograde tracing and immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 9:1678-1689.
- Giovannini MG, Rakovska A, Benton RS, Pazzagli M, Bianchi L, Pepeu G (2001) Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience* 106:43-53.
- Godbout R, Mantz J, Pirot S, Glowinski J y Thierry AM (1991) Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic neurons on their target cells: Electrophysiological and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 258, 728–738.
- Golmayo L, Nuñez A, Zaborsky L (2003) Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical prefrontal-basal circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas. *Neuroscience* 119(2):597-609.
- Goldman-Rakic PS(1998) The cortical dopamine system: Role in memory and cognition. *Adv Pharmacol*42, 707–711.
- Gonzalez CL, Miranda MI, Gutierrez H, Ormsby C, Bermudez-Rattoni F (2000) Differential participation of the NBM in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion and Morris water maze. *Behav Brain Res* 15; 116(1).
- Gorelova N, Peter BR (1996) Histamine depolarizes cholinergic septal neurons. *Journal of neurophysiology* 75(2) 707-714.
- Gorelova N, Seamans JK, Yang CR (2002) Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 88, 3150–3166.
- Gutierrez R, Rodriguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Núñez-Jaramillo L, Bermudez-Rattoni F (2003b) Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 80:323-331.
- Hanamori T (2003) Chemical stimulation of the thalamic reticular nucleus inhibits the neuronal activity of the posterior insular cortex in rats. *Chem Senses* 28:717-728.
- Hanamori T (2009) Effects of electrical and chemical stimulation of the amygdala on the spontaneous discharge in the insular cortex in rats. *Brain Res* 1276:91-102.

- Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen ASV, Hulme E (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature (London)* 283:90.
- Hasselmo ME (1995) Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav Brain Res* 67:1-27.
- Hasselmo ME (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 3:351-359.
- Hasselmo ME, Schnell E (1994) Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology. *J Neurosci* 14:3898-3914.
- Hasselmo ME, Eichenbaum H (2005) Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. *Neural Netw* 18:1172-1190.
- Hasselmo ME, Brandon MP (2012) A model combining oscillations and attractor dynamics for generation of grid cell firing. *Front Neural Circuits* 28, 6:30.
- Hasselmo ME, Fransen E, Dickson C, Alonso AA (2000) Computational modeling of entorhinal cortex. *Ann N Y Acad Sci* 911:418-446.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Hass HL (1997) International Union of Pharmacology XIII Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49(3):253-78.
- Himmelheber AM, Sarter M, Bruno JP (2000) Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. *Brain Res Cogn Brain Res* 9 (3): 313-25.
- Hohmann CF (2003) A morphogenetic role for acetylcholine in mouse cerebral neocortex. *Neurosci Biobehav Rev* 27:351-363.
- Houser CR, Crawford G D, Barber R P, Salvaterra P M, Vaughn J E (1983) Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Research* 266-97.
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308, 249-276.
- Inglis FM, Day J, Fibiger HC (1994) Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal, *Neuroscience* 62 1049-1056.
- Inglis FM, Fibiger HC (1995) Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 66 81-86.
- Jones BE, Cuello AC (1989) Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons. *Neuroscience* 31:37-61.
- Kandel S, Jessell, Siegelbaum and Hudspeth. (2012) *Principles of Neural Science* Fifth Edition Edition: Mc Graw Hill Professional.
- Khateb A, Fort P, Pegna A, Jones BE, Muhlethaler M (1995) Cholinergic nucleus basalis neurons are excited by histamine in vitro. *Neuroscience* 69:495-506.
- Khateb A, Serafin M, Muhlethaler M (1990). Histamine excites pedunclopontine neurones in guinea pig brainstem slices. *Neurosci Lett* 112: 257-262.

- Kamei C, Chung YH, Tasaka K (1990) Influence of certain H1-blockers on the stepthrough active avoidance response in rats. *Psychopharmacology* 102: 312-318.
- Kamei C, Okumura Y, Tasaka K (1993) Influence of histamine depletion on learning and memory recollection in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 111: 376-382.
- Kozak R, Bruno JP, Sarter M (2006) Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. *Cereb Cortex* 16 9-17.
- Kosar E, Grill H J, Norgren R (1986a) Gustatory cortex in the rat I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain Res* 6;379(2): 329-41.
- Kosar E, Grill H J, Norgren R (1986 b) Gustatory cortex in the rat II. Thalamocortical projections. *Brain Res* 6 379(2):342-52.
- Kruk M, Miszkiel J, McCreary AC, Przegalinski E, Filip M, Biala G (2012) Effects of the histamine H(3) receptor antagonist ABT-239 on cognition and nicotine-induced memory enhancement in mice. *Pharmacol Rep* 64:1316-1325.
- Lashley K S (1950) In Search of the Engram Reading in Physiological Psychology. *Physiological Mechanism in Animal Behavior*. Cambridge University Press.
- Leonard CM(1969) The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections *Brain Res* 12, 321–343.
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H (1995) Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 66:413-463.
- Ljbojevic V, Luu P, De Rosa E (2014) Cholinergic contributions to supramodal attentional processes in rats. *J Neurosci* 5 34(6):2264-75.
- Lopez-Garcia JC, Bermudez-Rattoni F, Tapia R (1990a) Release of acetylcholine, gamma-aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. *Brain Res* 523:100-104.
- Lopez-Garcia JC, Fernandez-Ruiz J, Bermudez-Rattoni F, Tapia R (1990b) Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Res* 523:105-110.
- Lopez-Garcia JC, Fernandez-Ruiz J, Escobar ML, Bermudez-Rattoni F, Tapia R (1993) Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45:147-152.
- Manrique T, Moron I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Gallo M (2007) Hippocampus, ageing, and taste memories. *Chem Senses* 32:111-117.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI(1999) Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405, 299–321.
- McGaugh JL (1973) Drug facilitation of learning and memory. *Annual Review of Pharmacology* 13 229-241.
- McGaugh JL (2000) Memory a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27:1-28.
- McGaughy J, Dalley JW, Morrison CH, Everitt BJ, Robbins TW (2002) Selective behavioral and neurochemical effects of cholinergic lesion produced by intrabasal infusions

- of 192 IgG-saporin on attentional performance in a five-choice serial reaction time task. *J Neurosci* 1;22 (5):1905-13.
- Metherate R, Ashe JH (1993) Nucleus basalis stimulation facilitates thalamocortical synaptic transmission in the rat auditory cortex. *Synapse* 14(2): 132-43.
- Mesulam MM (1995) Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain. *Ann N Y Acad Sci* 757:169-179.
- Mesulam MM, Rosen AD, Mufson EJ (1984) Regional variations in cortical cholinergic innervation: chemoarchitectonics of acetylcholinesterase-containing fibers in the macaque brain. *Brain Res* 311:245-258.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983a) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-1201.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983b) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214:170-197.
- Mesulam MM, Volicer L, Marquis JK, Mufson EJ, Green RC (1986) Systematic regional differences in the cholinergic innervation of the primate cerebral cortex: distribution of enzyme activities and some behavioral implications. *Ann Neurol* 19:144-151.
- 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, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 882:230-235.
- Miyazaki S, Imaizumi M, Onodera K (1995) Effects of thioperamide on the cholinergic system and the step-through passive avoidance test in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17(10):653-8.
- Mochizuki T, Okakura-Mochizuki K, Horii A, Yamamoto Y, Yamatodani A (1994) Histaminergic modulation of hippocampal acetylcholine release in vivo. *J Neurochem* 62: 2275–2282.
- Montero-Pastor A, Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M (2004) Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention, and retrieval. *Behav Brain Res* 154:41-54.
- Mufson EJ, Ma SY, Cochran EJ, Bennett DA, Beckett LA, Jaffar S, Saragovi HU, Kordower JH (2000) Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 427:19-30.
- Newman EI, Gillet S N, Climer J R, Hasselmo ME (2013) Cholinergic blockade reduce theta-gamma phase amplitude coupling and speed modulation of theta frequency consistent with behavioral effects on encoding. *J Neurosci* 11;33 (50).
- Nieuwenhuys R (2012) The insular cortex: a review. *Prog Brain Res* 195:123-163.
- Norgren R, Wolf G (1975) Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat. *Brain Res* 4 92(1): 123-9.

- Nuñez-Jaramillo L, Ramirez-Lugo L, Herrera-Morales W, Miranda MI (2010) Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav Brain Res* 207:232-248.
- Orsetti M, Casamenti F, Pepeu G (1996) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res* 724:89-96.
- Panula P, Yang HY, Costa E (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2572-2576.
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989a) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28:585-610.
- Panula P, Flugge G, Fuchs E, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989b) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the mammalian spinal cord. *Brain Res* 484:234-239.
- Parikh V, Kozak R, Martinez V, Sarter M (2007) Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. *Neuron* 56 141-154.
- Passani MB, Blandina P (2011) Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* 32:242-249.
- Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P (2000) Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 24:107-113.
- Paxinos G (2004a) *The Nervous System Third Edition* Edition: Elsevier Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (2004b) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California, USA: Academic Press.
- Pepeu G, Giovannini MG (2009) Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem Biol Interact* 6 187(1-3).
- Petrovich GD, Risold PY, Swanson LW (1996) Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: APHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 374, 387-420.
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM (2002) A detailed mapping of the histamine H<sub>3</sub> receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114:173-193.
- Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM (1992) Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: Evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 49, 857-865.
- Pollard A, Moreau J, Arrang JM and Schwartz JC (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H<sub>3</sub> receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52 (1) 169-189.
- Power AE (2004) Muscarinic cholinergic contribution to memory consolidation: with attention to involvement of the basolateral amygdala. *Curr Med Chem* 11:987-996.
- Puron-Sierra L, Sabath E, Nuñez-Jaramillo L, Miranda MI (2010) Blockade of nucleus basalis magnocellularis or activation of insular cortex histamine receptors disrupts formation but not retrieval of aversive taste memory. *Neurobiol Learn Mem* 93;(2):216-20.
- Purves AJG, FitzPatrick David, Hall William, LaMantia Anthony, MacNamara James, Williams Mark (2007) *Neurociencia*, Editorial Medica Panamericana Edition.

- Prast H, Argyriou A, Philippu A (1996) Histaminergic neurons facilitate social memory rats. *Brain Res* 734:316-8
- Privou C, Knoche A, Hasenohrl RU, Huston JP (1998) The H1- and H2-histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. *Neuropharmacology* 37:1019-1032.
- Privou C, Li JS, Hasenohrl RU, Huston JP (1999) Enhanced learning by posttrial injection of H1-but not H2-histaminergic antagonists into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neurobiol Learn Mem* 71:308-324.
- Ragozzino M E, Mohler E G, Prior M, Palencia C A, Rozman S (2009) Acetylcholine activity in selective striatal regions supports behavioral flexibility. *Neurobiol Learn Mem* 91 13-22.
- Rasmusson AM, Hauger RL, Morgan CA, Bremner JD, Charney DS, Southwick SM (2000) Low baseline and yohimbine-stimulated plasma neuropeptide Y (NPY) levels in combat-related PTSD. *Biol Psychiatry* 47:526-539.
- Rasmusson DD (1993) Cholinergic modulation of sensory information. *Prog Brain Res* 98:357-364.
- Rasmusson DD, Clow K, Szerb JC (1992) Frequency-dependent increase in cortical acetylcholine release evoked by stimulation of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Brain Res* 594:150-154.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59:49-56.
- Rodríguez-García G., Miranda M.I. Cholinergic and GABAergic interactions between the nucleus basalis magnocellularis and the insular cortex during formation and retrieval of appetitive taste memory. En preparación.
- Saper C B (1982) Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol* 10 210(2): 163-73.
- Saras A, Gisselman G, Vogt-Eisele AK, Erkkamp KS, Kletke O, Pusch H, Hatt H (2008) Histamine action on vertebrate GABA<sub>A</sub> receptors direct channel gating and potentiation of GABA responses. *The Journal of biological Chemistry* 283 16 10470-10475.
- Sarter M, Bruno JP (2000) Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience* 95:933-952.
- Sarter M, Bruno JP (2002) The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections. *Eur J Neurosci* 15:1867-1873.
- Sarter M, Bruno JP, Turchi J (1999) Basal forebrain afferent projections modulating cortical acetylcholine, attention, and implications for neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 877:368-382.
- Sarter M, Bruno JP, Givens B (2003) Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory? *Neurobiol Learn Mem* 80:245-256.
- Sarter MF, Bruno JP (1994) Cognitive functions of cortical ACh: lessons from studies on trans-synaptic modulation of activated efflux. *Trends Neurosci* 17:217-221.

- Schwab C, Brückner G, Rothe T, Castellano C y Oliverio A (1992) Autoradiography of muscarinic cholinergic receptors in cortical and subcortical brain regions of C57B1/6 y DBA/2 mice. *Neurochem Res* 17, 1057.
- Semba K, Fibiger HC (1988) Time of origin of cholinergic neurons in the rat basal forebrain. *J Comp Neurol* 269:87-95.
- Semba K, Reiner PB, McGeer EG, Fibiger HC (1988a) Brainstem afferents to the magnocellular basal forebrain studied by axonal transport, immunohistochemistry, and electrophysiology in the rat. *J Comp Neurol* 267:433-453.
- Semba K, Reiner PB, McGeer EG, Fibiger HC (1988b) Non-cholinergic basal forebrain neurons project to the contralateral basal forebrain in the rat. *Neurosci Lett* 84:23-28.
- Shaw G L MJRS (1990) *Neurobiology of learning and memory*, World Scientific Publishing Co. Edition.
- Shi CJ, Cassell MD (1998b) Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol.* 399, 440–468.
- Siegel G J, Bernad W, Wayne A, Fisher S, Uhler M (1999) *Basic Neurochemistry 6<sup>th</sup> edition* Molecular, cellular and medical aspects. Edited by George J Siegel. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Skinner B F (1974) *About Behaviorism*. New York, USA. Traducción Fernando Barrera cedida por ediciones Martinez Roca, S.A.
- Suhara T, Nakayama K, Inoue O, Fukuda H, Shimizu M, Mori A, Tateno Y (1992) D1 dopamine receptor binding in mood disorders measured by positron emission tomography. *Psychopharmacol.* 106, 14–18.
- Sripanidkulchai K, Sripanidkulchai B, Wyss JM (1984) The cortical projection of the basolateral amygdaloid nucleus in the rat: a retrograde fluorescent dye study. *J Comp Neurol.* 229, 419–431.
- Sweatt JD (2010) *Mechanism of Memory, Second Edition* Edition. San Diego CA, USA: Elsevier Academic Press.
- Tasaka K (1994) The role of histamine on learning and memory. In: Tasaka K, editor. *New Advances in Histamine Research* Tokyo: Springer, 27-68.
- Thorndike E (1903) *Educational Psychology*. Reprinted by Routledge 1923. Edit The international library of Psychology. 2 Park Square, Milton Park, Abingdon, Oxon.
- Torrealba F, Riveros ME, Contreras M, Valdes JL (2012) Histamine and motivation. *Front Syst Neurosci* 6:51.
- Trevor W S (1995) *CNS Neurotransmitter and Neuromodulators Acetylcholine*. Edited by Trevor W Stone, PhD, D.Sc. Profesor of pharmacology. Departament of pharmacology University of glasgow, glasgow, Scotland. CRC Press
- Valdes JL, Sanchez C, Riveros ME, Blandina P, Contreras M, Farias P, Torrealba F (2010) The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *Eur J Neurosci* 31:2073-2085.
- Vilaró MT, Palacios J M, Mengod G (1990) Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by *in situ* hybridization histochemistry, *Neurosci Lett* 114, 154.

- Voytko ML, Olton DS, Richardson RT, Gorman LK, Tobin JR, Price DL (1994) Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J Neurosci* 14(1):167-86.
- Waelbroek M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J, (1990) Binding of selective antagonist to four muscarinic receptors (M1 to M4) in rat forebrain. *Mol Pharmacol* 38, 267.
- Wager TD, Smith EE (2003). Neuroimaging studies of working memory: a meta analysis. *Cognitive Affect. Behav Neurosci.* 3, 255-274.
- Wang J K, Roeske W R, Hawkins K N, Gehlert DR, Yamamura H I (1989) Quantitative autoradiography of M<sub>2</sub> muscarinic receptors in the rat brain identified by using a selective radioligand [<sup>3</sup>H] AF-DX 116. *Brain Res* 411, 322.
- Watanabe M, Kodama T, Hikosaka K (1997) Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J Neurophysiol* 78, 2795–2798.
- Wenk GL (1997) The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem* 67:85-95.
- Woolf NJ (1996) The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis. *Neurobiol Learn Mem* 66:258-266.
- Woolf NJ (1998) A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol* 55:59-77.
- Wouterlood FG, Gaykema RP (1988) Innervation of histaminergic neurons in the posterior hypothalamic region by medial preoptic neurons. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase in the rat. *Brain res* 455: 170–176.
- Wouterlood FG, Gaykema RP, Steinbusch HW, Watanabe T, Wada H (1988) The connections between the septum-diagonal band complex and histaminergic neurons in the posterior hypothalamus of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. *Neuroscience* 26: 827–845.
- Wouterlood FG, Steinbusch HW, Luiten PG, Bol JG (1987) Projection from the prefrontal cortex to histaminergic cell groups in the posterior hypothalamic region of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. *Brain Res* 406: 330–336.
- Yamamoto T, Matsuo R, Kiyomitsu Y, Kitamura R (1988) Sensory inputs from the oral region to the cerebral cortex in behaving rats: an analysis of unit responses in cortical somatosensory and taste areas during ingestive behavior. *J Neurophysiol* 60:1303-1321.
- Yamamoto T, Yasoshima Y (2007) Electrophysiological Representation of Taste Memory.
- Young MB, Thomas SA (2014) M1-muscarinic receptors promote fear memory consolidation via phospholipase C and the M-current. *J Neurosci* 29;34(5):1570-8.
- Zaborszky L, Duque A (2003) Sleep-wake mechanisms and basal forebrain circuitry. *Front Biosci* 8:d1146-1169.
- Zaborszky L, Heimer L, Eckenstein F, Leranth C (1986) GABAergic input to cholinergic forebrain neurons: an ultrastructural study using retrograde tracing of HRP and double immunolabeling. *J Comp Neurol* 250:282-295.

---

---

## XVII. ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

Figura 1	Clasificación del aprendizaje.....	3
Figura 2	Principales grupos colinérgicos y sus proyecciones en un plano sagital de cerebro de rata.....	14
Figura 3	Esquema del protocolo del CAS.....	21
Figura 4	Activación de las rutas gustativa y visceral en la rata durante el aprendizaje del CAS.....	23
Figura 5	Fotomicrografía de la corteza insular, con referencia al atlas paxinos.....	26
Figura 6	Localización anatómica del NBM en cerebro de rata.....	29
Figura 7	Liberación de ACh registrada en la corteza insular durante el bloqueo del NBM con TTX en la adquisición del CAS.....	32
Figura 8	Liberación de ACh en la corteza insular durante la presentación de un sabor novedoso y cuando el sabor se torna familiar.....	33
Figura 9	Síntesis y metabolismo de histamina.....	35
Figura 10	El sistema histaminérgico en el cerebro de rata.....	36
Figura 11	Dinámica del ciclo de vida de histamina.....	39
Figura 12	Activación de los distintos grupos de receptores a histamina en el cerebro.....	39
Figura 13	Interacciones entre los sistemas histaminérgicos y colinérgicos.....	44

Figura 14 A	Efectos de las infusiones de pirilamina en el NBM antes de la adquisición y prueba del CAS.....	45
Figura 14 B	Efectos de las infusiones de RAMH en la CI antes de la adquisición y prueba del CAS.....	46
Figura 15	Diagrama representativo de la inserción de las cánulas y guías cánulas para sondas de microdiálisis en el NBM y en la CI.....	59
Figura 16	Esquema del protocolo de microdiálisis en libre movimiento, para la colecta de muestras en la CI en ambos grupos durante la adquisición y prueba del CAS.....	62
Figura 17	Protocolo de CAS con la técnica de microdiálisis en libre movimiento.....	63
Figura 18	Imagen de la Corteza insular que muestra las células positivas al anticuerpo anti-H <sub>3</sub> .....	67
Figura 19	Imagen del NBM que muestra las células positivas al anticuerpo anti-H <sub>1</sub> .....	68
Figura 20	Análisis de inmunofluorescencia de doble marcaje para muestras de la CI.....	69
Figura 21	Análisis de inmunofluorescencia de doble marcaje para muestras del NBM.....	69
Figura 22	Consumo de los animales tratados bilateralmente con RAMH en la CI minutos antes de la adquisición del CAS.....	70
Figura 23	Actividad colinérgica de los grupos tratados con RAMH en la CI, durante la adquisición del CAS.....	72

Figura 24	Consumo de los animales tratados bilateralmente con RAMH en la CI durante la adquisición y medido el día de la evocación.....	73
Figura 25	Actividad de ACh en la CI el día de la evocación del CAS, de los animales tratados con RAMH, antes de la adquisición del CAS.....	74
Figura 26	Consumo de los animales tratados con pirilamina durante la adquisición del CAS.....	75
Figura 27	Actividad colinérgica en la CI de los grupos tratados con pirilamina en el NBM, antes del estímulo gustativo durante la adquisición del CAS.....	77
Figura 28	Consumo de los animales tratados bilateralmente con pirilamina en el NBM durante la adquisición del CAS y medido el día de la evocación.....	78
Figura 29	Actividad de ACh en la corteza insular el día de la evocación del CAS, de los animales tratados bilateralmente con pirilamina en el NBM el día de la adquisición.....	80
Figura 30	Propuesta del circuito de regulación sistema histaminérgico-colinérgico durante el aprendizaje del CAS.....	87

**ANEXO:**  
**ARTÍCULO**

---

# Histaminergic Modulation of Cholinergic Release from the Nucleus Basalis Magnocellularis into Insular Cortex during Taste Aversive Memory Formation

Liliana Purón-Sierra, María Isabel Miranda\*

Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., México

## Abstract

The ability of acetylcholine (ACh) to alter specific functional properties of the cortex endows the cholinergic system with an important modulatory role in memory formation. For example, an increase in ACh release occurs during novel stimulus processing, indicating that ACh activity is critical during early stages of memory processing. During novel taste presentation, there is an increase in ACh release in the insular cortex (IC), a major structure for taste memory recognition. There is extensive evidence implicating the cholinergic efferents of the nucleus basalis magnocellularis (NBM) in cortical activity changes during learning processes, and new evidence suggests that the histaminergic system may interact with the cholinergic system in important ways. However, there is little information as to whether changes in cholinergic activity in the IC are modulated during taste memory formation. Therefore, in the present study, we evaluated the influence of two histamine receptor subtypes, H<sub>1</sub> in the NBM and H<sub>3</sub> in the IC, on ACh release in the IC during conditioned taste aversion (CTA). Injection of the H<sub>3</sub> receptor agonist R- $\alpha$ -methylhistamine (RAMH) into the IC or of the H<sub>1</sub> receptor antagonist pyrilamine into the NBM during CTA training impaired subsequent CTA memory, and simultaneously resulted in a reduction of ACh release in the IC. This study demonstrated that basal and cortical cholinergic pathways are finely tuned by histaminergic activity during CTA, since dual actions of histamine receptor subtypes on ACh modulation release each have a significant impact during taste memory formation.

**Citation:** Purón-Sierra L, Miranda MI (2014) Histaminergic Modulation of Cholinergic Release from the Nucleus Basalis Magnocellularis into Insular Cortex during Taste Aversive Memory Formation. PLoS ONE 9(3): e91120. doi:10.1371/journal.pone.0091120

**Editor:** Patrizia Campolongo, Sapienza University of Rome, Italy

**Received:** November 23, 2013; **Accepted:** February 7, 2014; **Published:** March 13, 2014

**Copyright:** © 2014 Purón-Sierra, Miranda. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding provided by grants: CONACYT 152208, PAPPIT IN220991. This work was carried out in partial fulfillment of requirements to obtain the Doctoral Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) at the Instituto de Neurobiología, UNAM, by Liliana Purón Sierra, who received a Graduate Scholarship 208245 from CONACYT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mirandami@unam.mx

## Introduction

The central cholinergic system has long been associated with many aspects of cognitive functioning and there is clear evidence implicating cholinergic neurons in the mediation of learning and memory processes [1–3]. Acetylcholine (ACh) is released in the neocortex in response to a variety of behavioral and environmental conditions [4–10].

The processing of a gustatory stimulus is very complex in and of itself because taste encoding encompasses both the immediate hedonic value of a tastant and one's overall experience with the perceived flavor. Accordingly, a gustatory memory is a representation not only of the explicit characteristics of a taste, but also of its degree of familiarity. There is extensive evidence pointing to the importance of cholinergic activation as a marker of novelty. The role of ACh in the recognition of novel taste is well documented [11–15] and consistent with ACh's established involvement in the encoding of other types of novel-experience memories [4,16–19].

Conditioned taste aversion (CTA) is a gustatory conditioning paradigm in which subjects learn to avoid a particular taste when it is followed by gastric malaise [20]. During CTA acquisition, presentation of a novel taste, but not a familiar taste, increases ACh release in the insular cortex (IC), a central structure in taste recognition memory. Cholinergic cortical activity during taste

memory acquisition differs from that during taste memory retrieval, supporting the notion that ACh may facilitate cortical plasticity during memory formation [5,13]. Moreover, there is a requirement for modulation of cholinergic cortical release and an intact nucleus basalis magnocellularis (NBM) in the cholinergic basal forebrain during the early stages of learning, but no such requirement during memory recall [4–7]. Notably, we demonstrated previously in the CTA paradigm that novel taste consumption elicits a significant increase in ACh release in the IC and that tetrodotoxin infusions into the NBM, which disrupt NBM-mediated release of ACh into the cortex and basolateral amygdala, impair acquisition, but not retrieval, of CTA [5].

This inverse correlation observed between familiarity and cholinergic activity [5,13] is congruent with the view that cortical ACh enhances responsiveness to afferent sensory input while decreasing internal processing related to previously formed cortical representations [21]. At the behavioral level, the actions of ACh could be interpreted as an enhancement of attention or memory encoding [10,22–24]. In other words, cortical ACh could be supporting new stimuli encoding processes, at least in part, by reducing interference from previous memories, as has been suggested to occur in hippocampal circuits involved in long-term memory formation [23,25–28]. Hence, NBM-cortical cholinergic

interactions could be playing a similar role in taste recognition memory.

Although ACh has been shown to modulate many other neurotransmitter systems, new studies suggest that the cholinergic system itself may receive modulation from the histaminergic system [6,29–32]. The NBM receives histaminergic afferents directly from the tuberomammillary nucleus in the posterior hypothalamus, the main source of histaminergic projections and histamine is distributed throughout the entire cortex by histaminergic forebrain projections [33,34]. Histamine's broad presence in the forebrain is consistent with suggestions that it may act as a neuromodulator during memory formation [35–44]. Furthermore, in a recent study, we demonstrated opposite roles for subtype 1 ( $H_1$ ) and subtype 3 ( $H_3$ ) histamine receptors in the NBM and the IC, respectively, two areas important for taste memory. That is, blockade of  $H_1$  receptors in the NBM or activation of  $H_3$  receptors in the IC impaired CTA. These results demonstrated complementary roles for  $H_1$  and  $H_3$  receptors in CTA that could be the result of cortical cholinergic activity modulation [45].

In the present study, we evaluated whether activation of the NBM via  $H_1$  receptors or inhibition of the IC via  $H_3$  receptors affects cortical ACh release and influences taste memory formation. The presence and co-localization of  $H_1$  and  $H_3$  receptors in the NBM and IC, respectively, were determined. The effects of intra-IC injections of the  $H_3$  receptor agonist R- $\alpha$ -methylhistamine (RAMH) and of intra-NBM injections of the  $H_1$  receptor antagonist pyrilamine, during acquisition, on long-term CTA memory were evaluated. Changes in ACh release in the IC were assessed by microdialysis in free-moving animals during both the acquisition and retrieval trials.

## Materials and Methods

### Animals

Fifty-five male Sprague-Dawley rats, weighing 250–300 g at the time of surgery before CTA or sacrifice for immunofluorescence assays, were obtained from the Instituto de Neurobiología breeding colony. Rats were placed in individual acrylic cages and maintained at 23°C under an inverted 12-h/12-h dark/light cycle; all behavioral protocols were implemented during the dark phase. Food and water were available *ad libitum* until the behavioral procedures began. The experiments were performed in accordance with the Mexican Laws for Animal Care (Norma Oficial Mexicana SAGARPA) and the relevant rules set forth by the Mexican Ministry of Health. The experimental protocol was approved by our local Animal Care Committee (Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM) and confirmed to be in compliance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 80-23, revised 1996).

### Immunofluorescence assays

For the immunofluorescence analysis, 6 rats were overdosed with pentobarbital (60 mg/kg) and perfused transcardially with saline (0.9%) and fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer [PBS]). The brains were cryoprotected in 30% sucrose solution, and 40  $\mu$ m coronal sections of each whole brain were obtained in a cryostat (Leica CM1850, Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL). Sections containing the IC or NBM of the same brain were placed on separate slides (Superfrost/Plus by Thermo Fisher Scientific Inc., USA) and stored at 4°C until processing. For double immunofluorescence, the slices were washed in PBS-Tween 20 and blocked with a solution containing 2% donkey serum.

After blocking, the IC slices were incubated at 4°C for 24 h with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-GAD65 [1:100] (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and goat anti- $H_3R$  [1:200] (Santa Cruz Biotechnology). The sections were washed in PBS and incubated for 2 h at room temperature with Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (Invitrogen, Life Technologies, USA) and Texas Red bovine anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) secondary antibodies, both at [1:100]. The slices were washed in PBS again and incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear counterstain (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 25 min.

Meanwhile, the blocked NBM slices were incubated with the following primary antibodies for 24 h at 4°C: monoclonal mouse anti-choline acetyl transferase (ChAT) [1:100] (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX) and rabbit anti- $H_1$  receptor [1:200] (Sigma, H6913, by Sigma Co., USA). Secondary antibody incubation was as described above except that Cy2-conjugated goat anti-rabbit [1:100] and Cy3-conjugated donkey anti-mouse [1:100] antibodies (Jackson immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) were applied. All slices were washed and mounted with Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

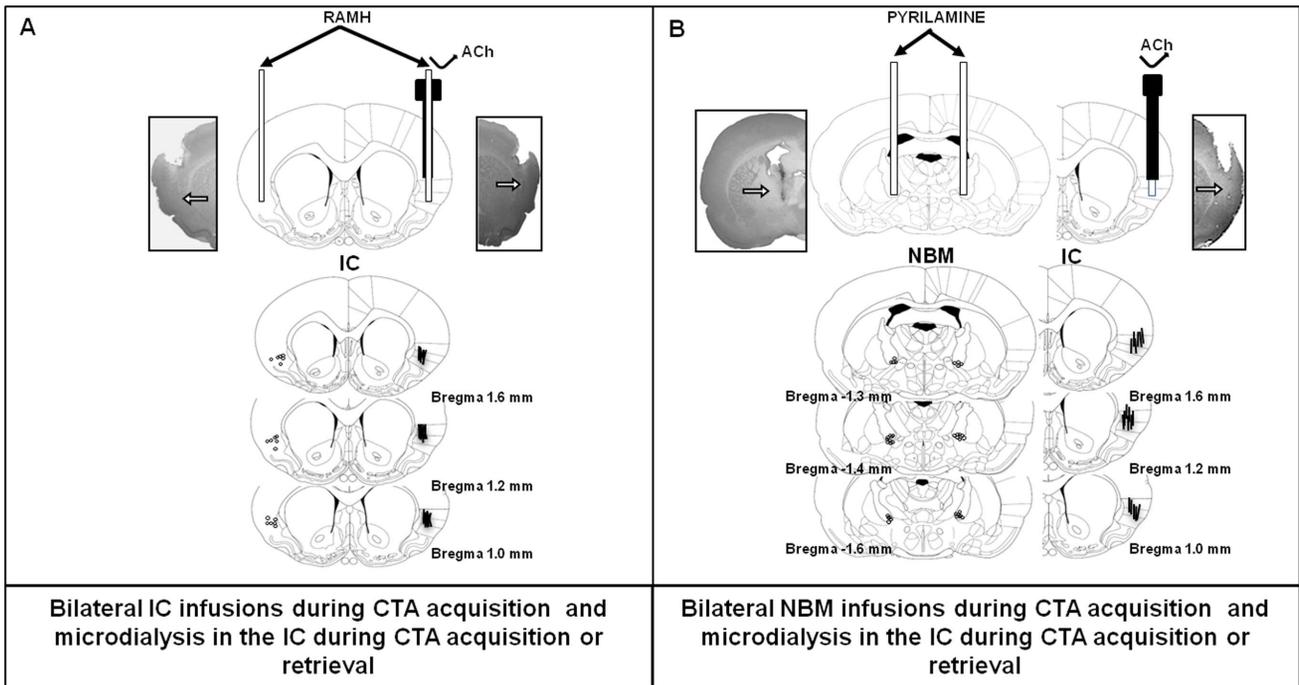
For imaging, a Zeiss LSM 780 Meta confocal microscope (Carl Zeiss, Germany) with a 40 $\times$  oil-immersion objective was used. We applied 488 nm stimulation to excite Alexa 488 and Cy2, 561 nm stimulation to excite Cy3 and Texas Red, and 750 nm stimulation to visualize DAPI. For quantitative image analysis, z-stack images (4 or 5 consecutive 512 $\times$ 512 confocal sections) were obtained every 5  $\mu$ m (stack size of 450  $\mu$ m in the X and Y dimensions) and processed in Aim Image Examiner software. ImageJ analysis software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) was used for quantitation of double immunolabeling. The population of cells labeled by each fluorescent probe was measured independently and contrasted with the number of DAPI labeled nuclei in the IC or the number of ChAT-positive cells in the NBM.

### Cannulation

Animals were anaesthetized with intra-parenchymal (i.p.) injections of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg) and submitted to standard stereotaxic procedures. One set of rats was implanted with a single 23 gauge stainless steel cannula aimed at 2 mm above the left insular cortex (1.2 mm anterior, 5.5 mm lateral and 3 mm ventral to Bregma; injector protruded 3 mm from the cannula) and a microdialysis guide cannula with an infusion tube (BASi MD 2262) in the right IC (corresponding coordinates for opposite side, and 4.9 mm ventral to Bregma; probe protruded 2 mm from the cannula) [46] (Fig. 1A). Another set of rats was implanted with two (bilateral) stainless steel cannulae aimed at 2.5 mm above the NBM (1.5 mm posterior, 2.5 mm lateral and 4.9 mm ventral to Bregma; injectors protruded 2.5 mm from the cannulae) and one microdialysis guide cannula (BASi MD 2200) in the right IC (coordinates above) (Paxinos and Watson, 2004) (Fig. 1B). The infusion cannulae and microdialysis guide cannula were fixed to the skull with two surgical screws and dental acrylic cement. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent clogging.

### CTA

Five days after surgery, after they had recovered completely, the rats were water deprived for 18 h, and then handled (~3 min/d) and habituated over 4 d to drinking water for 15 min from a graduated bottle to get stable baseline water consumption data. The next day, CTA acquisition training was applied as reported elsewhere [5,13,47,48]. Briefly, a novel sweet taste (0.1% saccharin



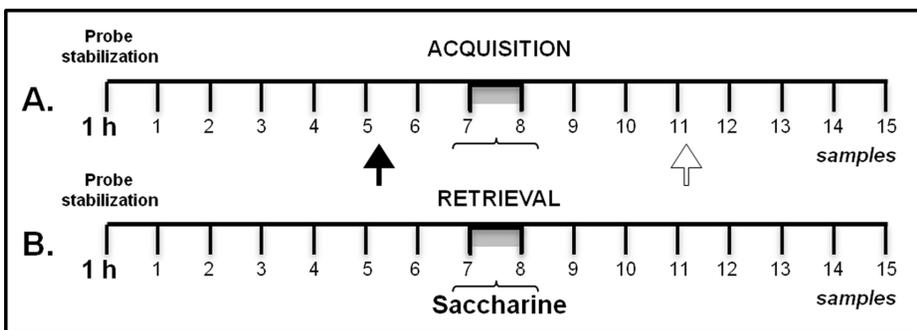
**Figure 1. Coronal section diagrams and representative photomicrographs of the IC and NBM.** Arrows in photomicrographs and dots in atlas diagrams show locations of stainless-steel cannulae; lines shows microdialysis probe trails. **A)** One stainless-steel cannula implanted in the left IC and one dual probe (with injector and cannula) implanted in the right IC. **B)** Stainless-steel cannulae placed bilaterally in the NBM and one cannula/microdialysis probe in the right IC. doi:10.1371/journal.pone.0091120.g001

solution) was presented for 15 min and, 45 min after the end of the drinking period, each rat was injected with LiCl (0.3 M, 10 ml/kg, i.p.) for induction of gastric malaise. CTA memory was tested 24 h later by re-presenting 0.1% saccharin solution. All CTA procedures (i.e. water baseline, acquisition, and retrieval) were done in the microdialysis chamber. Water and saccharin consumption volumes were recorded. An aversive taste memory was considered to be present if animals significantly decreased their consumption relative to acquisition.

**Microdialysis**

As summarized in Figure 2, microdialysis performed during CTA acquisition or during CTA retrieval was conducted in eight

independent groups. First, bilateral injectors were inserted into the stainless steel guide cannulae aimed at the NBM or a single injector was inserted into the unilateral guide cannula directed to the right IC (Fig. 1A–B). Second, dialysis was started by connecting the probe inlet (BASi MD 2200 or MD 2262 dialysis probes with 2 mm membrane) to a microinfusion pump system (CMA Microdialysis, West Lafayette, IN) that circulated the probe continuously with Ringer’s solution (118 mM NaCl 4.7 mM KCl 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 μM neostigmine) at a rate of 2 μl/min to avoid ACh degradation, as described previously [5,49]. The circulating microdialysis probe was inserted into the guide cannula directed at the right IC, and then the rat was placed in the



**Figure 2. Summary of microdialysis ACh sampling protocol in CTA behavioral paradigm.** Microdialysis samples were collected every 15 min from free-moving rats. **A)** During CTA acquisition, RAMH, pyrilamine, or saline was injected at the beginning of sample 5 (dark arrow), 30 min before saccharin consumption (gray bar), and LiCl was injected i.p. at the beginning of sample 11 (white arrow), 45 min after the saccharin consumption period had ended. **B)** During the CTA memory trial, ACh levels were measured in the absence of any injections. doi:10.1371/journal.pone.0091120.g002

microdialysis chamber. The initial 60-min sampling solution was discarded, and then samples were collected every 15 min.

Fifteen microanalysis samples were collected from right IC during CTA acquisition (see Fig. 2 for procedure summary). Each consecutive sampling period was 15 min. The NBM or IC microinfusions were started right before collecting sample 5. Thirty minutes (2 samples) later, 0.1% saccharin was presented along with sample 7. An i.p. LiCl injection was given after a 45-min saccharin consumption period, right before collection of sample 11. An additional four samples were collected before the microdialysis procedure was concluded. The same sampling procedure was repeated during CTA retrieval, except that no infusions or i.p. injections were administered (Fig. 2B). Immediately upon being collected, all microdialysis samples were frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  or submitted to high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

### Drug infusions

Independent microdialysis groups were used during the CTA acquisition versus retrieval days (Fig. 1, bottom). In preparation for the microinfusions, patency stylets were removed and 30-gauge injection needles were inserted into the cannulae. The injection needles protruded 2.5 mm and 2.0 mm beyond the cannulae for the NBM and IC injections, respectively. The injectors were connected via polyethylene tubing to two 10  $\mu\text{l}$  microsyringes driven by an infusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). During CTA acquisition, the SALINE (vehicle control) groups were given 0.5  $\mu\text{l}$  microinfusions of saline (NaCl 0.9%) into the NBM or IC, the PYRILAMINE groups were given bilateral 0.5  $\mu\text{l}$  microinfusions of pyrilamine (100 mM, Sigma-Aldrich) into the NBM, and the RAMH groups were given unilateral microinfusions of RAMH (10  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) into the right IC via the stainless steel cannula and into the left cortex via a microdialysis probe attached to the infusion tube (see Fig. 1A). The total volume of solution (0.5  $\mu\text{l}$  per side of pyrilamine, RAMH, or saline) was delivered over 1 min. Dose of pyrilamine and RAMH were based on previous behavioral studies which demonstrated the modulating role of histaminergic receptors on different learning tasks [42,50,53,54]. Injection needles were left inside the cannulae for one additional minute to allow diffusion of the injected solution into the tissue and to minimize dragging of the liquid back along the injection track.

### Determination of ACh levels

The microdialysis samples were injected into a polymeric reversed-phase column (BASi). ACh was assayed in the dialysate by HPLC with electrochemical detection using an ACh/choline chromatographic assay kit (BASi, West Lafayette, IN) consisting of an ACh analytical column (BASi MF-6150) and an ACh/choline immobilized enzyme reactor (IMER, BASi MF-6151). The mobile phase had a 1 ml/min flow rate and consisted of a 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.5) supplemented with 0.05% Kathon reagent (BASi, West Lafayette, IN), a broad spectrum antimicrobial suitable for enzyme preservation. ACh, separated in the analytical column, was hydrolyzed by acetylcholinesterase in the IMER into acetate and choline, which was then oxidized by choline oxidase into betaine and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide was detected electrochemically by a platinum-working electrode at +500 mV with an Ag/AgCl reference electrode. The sensitivity limit was approximately 0.1 pmol, and the signal/noise ratio was greater than 2. To evaluate the amount of ACh in each sample, a linear regression curve was made with ACh standards, and the peak areas of the compound in the samples were compared with those of the standards. ACh levels in the dialysate

samples were calculated as pmol/15 min, and were not corrected for probe recovery ( $\sim 60\%$ ).

### Histology

One day after completing the microdialysis procedures, the animals were anaesthetized deeply with pentobarbital and perfused transcardially with 4% formaldehyde in 0.9% saline. The brains were placed in fresh formaldehyde overnight and then transferred to a 30% buffered sucrose solution and stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . Coronal sections (50  $\mu\text{m}$  thick) taken through the areas where the microdialysis probe and injectors had been were stained with cresyl violet and inspected under stereoscopic light (Fig. 1). Only data from animals with injector/probe tips located within the NBM and IC were included in the analysis.

### Statistical analysis

The inter-group differences in consumption during CTA acquisition and retrieval were determined by repeated measures analyses of variance (ANOVAs) followed by Fisher's *post hoc* tests. *P* values  $< 0.05$  were considered significant, and all datum values are expressed as means  $\pm$  standard errors of the mean (SEMs). To compare ACh levels, repeated measures ANOVA was carried out with the extracellular ACh level data (pmol/20  $\mu\text{l}$ ) from samples 1–15. To analyze the source of detected differences, a simple, one-way ANOVA between groups for each sample or paired *t*-test for each group samples, was performed when appropriate.

## Results

### Verification of probe placement

Only animals confirmed to have their guide cannulae and microdialysis probe in the NBM (bilaterally) and IC were included in the data analyses (Fig. 1). Thirteen cannulated animals were excluded due to misplacement of cannulae/injectors or the probe.

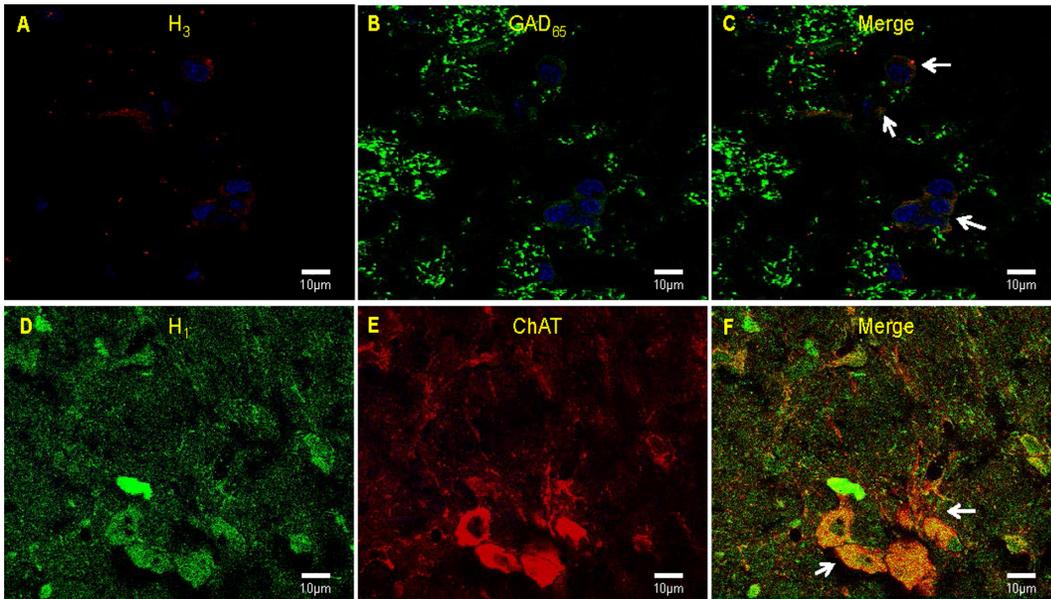
### H<sub>3</sub> receptors co-localize with IC GABAergic cells and H<sub>1</sub> receptors co-localize with NBM cholinergic cells

Immunofluorescence conducted in six brains revealed that 85% of IC cells were positive for H<sub>3</sub> receptors and that 50% of those cells were also reactive to anti-GAD<sub>65</sub>, indicating that H<sub>3</sub> receptors are expressed in GABAergic cells in the IC (Fig. 3A–C). The H<sub>1</sub> receptor was detected in 70% of ChAT-positive NBM cells, indicating that H<sub>1</sub> receptors are expressed ubiquitously throughout the NBM cholinergic cell population (Fig. 3, D–F).

### CTA-impairing RAMH injections into the IC alter ACh release during CTA acquisition and retrieval

As shown in Figure 4A, a repeated measures ANOVA indicated that ACh levels during CTA acquisition differed between samples ( $F_{1,6} = 3.465$ ,  $p < .01$ ), but did not differ between groups ( $F_{1,6} = 2.703$ ,  $p > .05$ ) and there was not a significant group  $\times$  sample interaction ( $F_{1,6} = 0.425$ ,  $p > .05$ ). Paired *t*-test for each sample revealed that the sample effect was due to significant differences between the amount of ACh released in control group, in samples 9 and 10 relative to the basal ACh levels in samples 2 and 3 ( $p < .05$ ).

H<sub>3</sub> receptor activation by RAMH during CTA acquisition affected saccharin consumption in the retrieval trial only (Fig. 4B). A one-way ANOVA showed no significant differences in baseline water consumption between the groups (data not shown). A repeated measures ANOVA for saccharin solution consumption during acquisition and retrieval days revealed significant effects of group ( $F_{1,6} = 23.059$ ,  $p < .01$ ) and of experiment day ( $F_{1,6} = 19.443$ ,



**Figure 3. Confocal fluorescence microscopy images in the IC and NBM.** Representative pictures of (A) H<sub>3</sub> immunopositivity, (B) GAD<sub>65</sub> immunopositivity, and (C) a merged image showing the co-localized expression of H<sub>3</sub> receptors and GAD<sub>65</sub> in the IC. Arrows point to H<sub>3</sub>/GAD double-labeled cells that were quantified with respect to DAPI-labeled nuclei (blue). Representative pictures of (D) H<sub>1</sub> immunopositivity, (E) ChAT immunopositivity and (F) a merged image showing the co-localized expression of H<sub>1</sub> receptors and ChAT. Arrows point to H<sub>1</sub>/ChAT double-labeled cells.

doi:10.1371/journal.pone.0091120.g003

$p < .05$ ), but not a significant interaction between these two factors ( $F_{1,6} = 3.722$ ,  $p > .05$ ). Fisher's *post hoc* tests indicated that saccharin consumption on the CTA acquisition day did not differ significantly among the groups ( $p > .05$ ), indicating that motivation to drink and liquid consumption were unaffected by the intra-IC RAMH microinfusions. Conversely, *post hoc* analysis showed that consumption during CTA retrieval did differ significantly between the groups ( $p < .01$ ). Animals that received intra-IC RAMH injections during CTA acquisition consumed significantly more saccharin solution during retrieval than did saline controls, indicating that the RAMH treatment impaired CTA memory formation.

The levels of ACh detected in the IC during memory retrieval in the control and RAMH groups (injections during CTA acquisition and microdialysis only during retrieval) are reported in Figure 4C. A repeated measures ANOVA for ACh levels during the retrieval trial revealed significant group ( $F_{1,8} = 8.01$ ,  $p < .05$ ) and sample ( $F_{1,8} = 43.350$ ,  $p < .01$ ) effects, as well as a significant group  $\times$  sample interaction ( $F_{1,8} = 12.150$ ,  $p < .01$ ). A One-way ANOVA for each sample revealed higher ACh levels in the RAMH group than in the saline control group in sample 8 ( $F_{1,8} = 15.775$ ,  $p < .01$ ), sample 9 ( $F_{1,8} = 12.456$ ,  $p < .01$ ), and sample 10 ( $F_{1,8} = 7.031$ ,  $p < .05$ ); these three samples were subsequent to presentation of the taste stimulus at the beginning of the seventh sampling period. Hence, the intra-IC RAMH treatment during CTA acquisition resulted in animals exhibiting a surge in ACh release during retrieval, as would be expected for a novel taste.

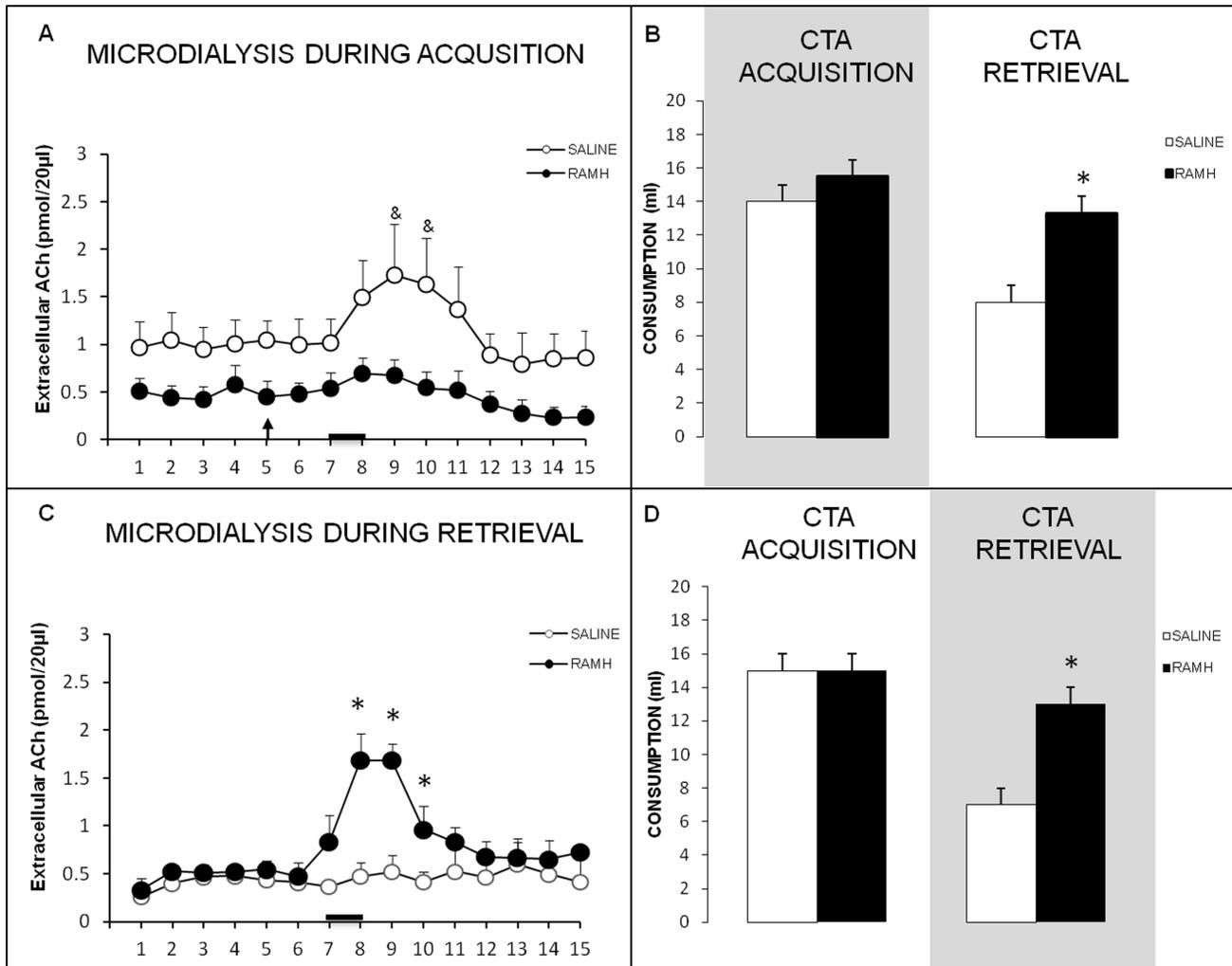
H<sub>3</sub> receptor activation in the IC by RAMH during acquisition disrupted long-term CTA memory (Fig. 4D). Baseline water consumption did not differ among the groups (ANOVA  $p > .05$ ; data not shown). A repeated measures ANOVA for the amount of saccharin solution consumed during acquisition and retrieval days revealed significant effects of group ( $F_{1,8} = 8.010$ ,  $p < .05$ ) and experiment day ( $F_{1,8} = 43.350$ ,  $p < .01$ ), and significant interaction between these two factors [ $F_{1,8} = 12.150$ ,  $p < .01$ ]. Fisher's *post hoc*

tests indicated that saccharin consumption on the CTA acquisition day was similar between the groups ( $p > .05$ ), indicating that the intra-IC RAMH injections during CTA acquisition had no effect on motivation or liquid consumption during conditioning. Nevertheless, *post hoc* analysis showed a significant difference in consumption between the groups during CTA retrieval ( $p < .01$ ). Hence, intra-IC RAMH injections during CTA acquisition resulted in greater saccharin consumption during retrieval, indicating that the RAMH treatment impaired CTA memory formation.

#### CTA-impairing pyrillamine injections into the NBM alter cortical ACh levels during CTA acquisition and retrieval

Cortical ACh levels during CTA acquisition for the control and intra-NBM pyrillamine injected groups are presented in Figure 5A and 5C. A repeated measures ANOVA for ACh levels during the acquisition trial revealed significant effects of group ( $F_{1,8} = 6.159$ ,  $p < .05$ ) and sample ( $F_{1,8} = 6.343$ ,  $p < .01$ ), and a significant group  $\times$  sample interaction ( $F_{1,8} = 3.176$ ,  $p < .01$ ). One way ANOVAs for each sample revealed that ACh levels differed significantly between the groups in sample 9 ( $F_{1,8} = 21.809$ ,  $p < .01$ ), which was collected during the last 15 min of the 45-min taste stimulus presentation.

The CTA behavioral data for the intra-NBM pyrillamine-infused animals and saline controls are presented in Fig. 5B. A simple ANOVA showed no significant differences between the groups in baseline water consumption (data not shown). A repeated measures ANOVA for saccharin solution consumption during acquisition and retrieval days, revealed experiment day significant effects ( $F_{1,8} = 23.120$ ,  $p < .01$ ), and significant interaction group  $\times$  day ( $F_{1,8} = 6.480$ ,  $p < .05$ ), but not a significant effects of group ( $F_{1,8} = 3.368$ ,  $p > .05$ ). Fisher's *post hoc* tests indicated that saccharin consumption on CTA acquisition day did not differ between the groups ( $p > .05$ ), demonstrating that pyrillamine injections into the NBM during CTA acquisition had no



**Figure 4. RAHM effects in ACh release during CTA acquisition and retrieval.** **A)** Extracellular ACh in the IC of free-moving rats during CTA acquisition. The arrow shows time of saline or RAMH infusion, and the black bar indicates the saccharin consumption period ( $p < .05$  vs. samples 2 and 3). **B)** Saccharin consumption during CTA acquisition (shading = microdialysis day) and memory retrieval ( $N = 4$  for each group;  $mean \pm SEM$ ,  $*p < .05$ ). **C)** Extracellular ACh in the IC of free-moving rats during CTA retrieval. The black bar indicates the saccharin consumption period ( $*p < .05$ ). **D)** Saccharin consumption during CTA acquisition and memory retrieval (shading = microdialysis day). ( $N = 5$  for each group;  $mean \pm SEM$ ,  $*p < .05$ ).

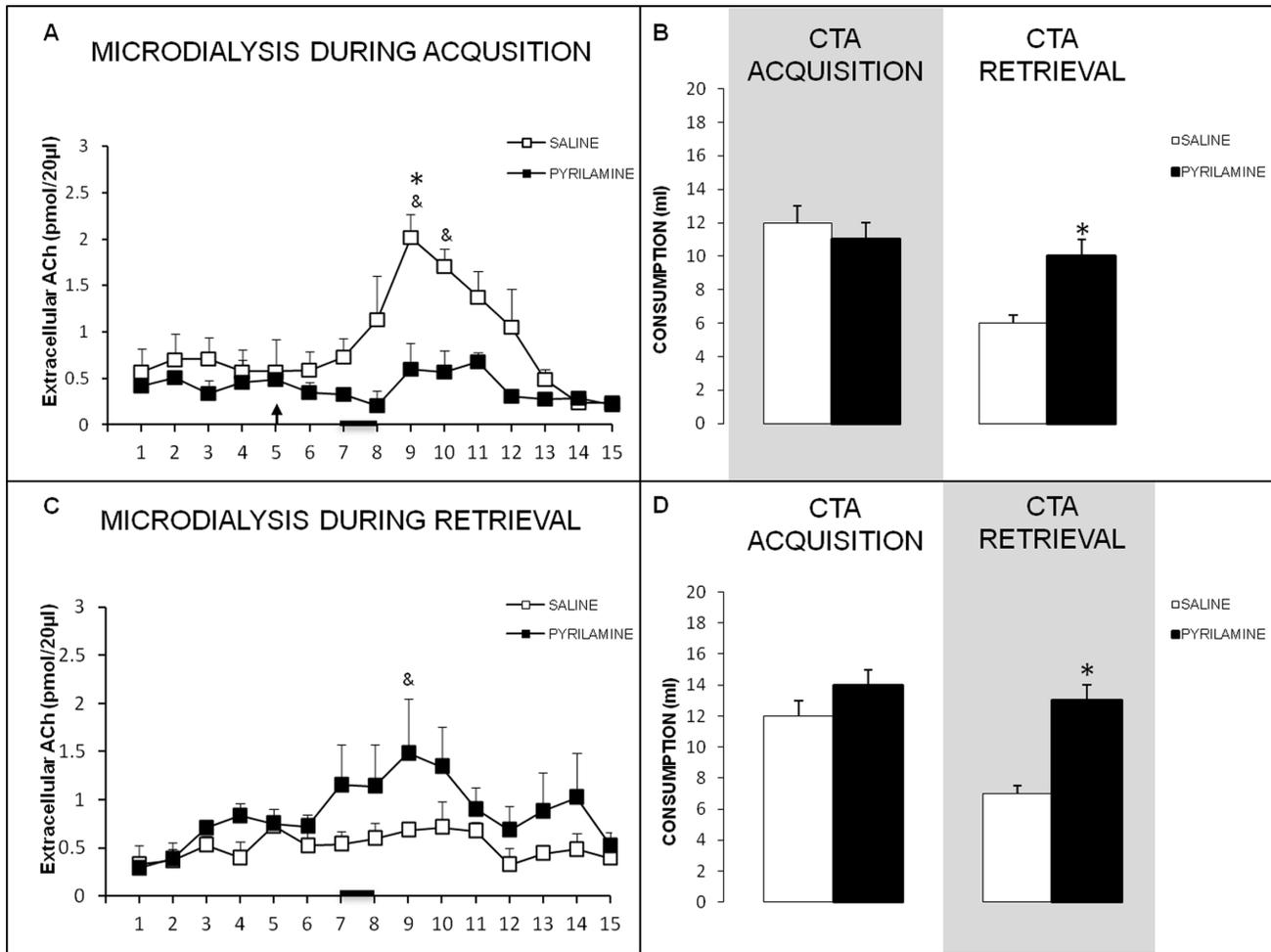
doi:10.1371/journal.pone.0091120.g004

significant effect on motivation or liquid consumption during conditioning. However, during CTA retrieval, the pyrilamine injected group consumed more saccharin solution than did the saline control group ( $p < .05$ ), indicating that the intra-NBM pyrilamine injections in the acquisition trial impaired subsequent CTA memory formation.

The ACh levels observed during memory retrieval in the control and pyrilamine-injected groups (injections during CTA acquisition and microdialysis only during retrieval) are shown in Figure 5C. A repeated measures ANOVA revealed a significant effect of sample on ACh levels during the retrieval trial ( $F_{1,6} = 2.793$ ,  $p < .01$ ), but no effect of group ( $F_{1,6} = 1.198$ ,  $p > .05$ ) and no significant group  $\times$  sample interaction ( $F_{1,6} = 1.329$ ,  $p > .05$ ). Paired t-test for each sample revealed a significant increase of ACh in sample 9 compared with the basal ACh levels observed in samples 1 and 2 in pyrilamine group ( $p < .05$ ).

$H_1$  receptor blockade in the NBM by pyrilamine during acquisition disrupted CTA memory in the retrieval trial (Fig. 5D).

Baseline water consumption did not differ between the groups (ANOVA, data not shown). Repeated measures ANOVA for saccharin solution consumption during acquisition and retrieval days revealed significant effects of group ( $F_{1,6} = 8.593$ ,  $p < 0.05$ ) but not between experiment day ( $F_{1,6} = 5.143$ ,  $p > .05$ ), neither group  $\times$  sample interaction ( $F_{1,6} = 2.286$ ,  $p > .05$ ). Fisher's *post hoc* tests showed that saccharin consumption on the CTA acquisition day did not differ between the groups ( $p > .05$ ), indicating that the intra-NBM pyrilamine injections did not affect motivation or liquid consumption during conditioning. Nevertheless, *post hoc* analysis showed that the pyrilamine-injected group consumed more saccharin solution during the CTA retrieval trial than did the saline controls ( $p < .05$ ), indicating that pyrilamine injections into the NBM during acquisition impaired CTA memory formation.



**Figure 5. Pyrilamine effects in ACh release during CTA acquisition and retrieval.** **A**) Extracellular ACh levels in the IC of free-moving rats during CTA acquisition. The arrow shows time of saline or pyrilamine infusion and black bar indicates saccharin consumption period ( $^{\&}p < .05$  vs. samples 5 and 6;  $^*p < .05$ , between groups). **B**) Saccharin consumption during CTA acquisition (shading = microdialysis day) and memory retrieval ( $N = 5$  for each group;  $mean \pm SEM$ ,  $^*p < .05$ ). **C**) Extracellular ACh in the IC of free-moving rats during CTA retrieval. The black bar indicates the saccharin consumption period ( $^{\&}p < .05$  vs. samples 1 and 2). **D**) Saccharin consumption during CTA acquisition (when infusions were administered) and memory retrieval (shading = microdialysis day). ( $N = 4$  for each group;  $mean \pm SEM$ ,  $^*p < .05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0091120.g005

## Conclusions

The main finding of the present research was the demonstration, in free-moving animals, of neurochemical modulation of ACh release into the IC being induced by local  $H_3$  receptor activation, or  $H_1$  receptor inhibition in the NBM, during CTA acquisition. This study demonstrates that the  $H_1$  and  $H_3$  receptor subtypes modulate ACh release in distinct ways, and that blocking ACh release into the IC by either manipulation during acquisition impairs subsequent CTA. Similar to observations in other cortical areas [30,34,35,50–52], our immunofluorescence results showed that  $H_3$  receptors are expressed in approximately half of the GABAergic cells in the IC and that  $H_1$  receptors are expressed in most, if not all, cholinergic cells in the NBM. These results are in line with the knowledge that histaminergic axons, which originate solely from the tuberomammillary nucleus, innervate almost all brain regions [34,51,53,54].

The present HPLC data are consistent with several previous studies demonstrating that novel stimuli induce cortical ACh release [5,6,28,50,55–58], and corroborate, in particular, prior work demonstrating that a novel taste (e.g. saccharin) increases

ACh release within the IC of awake, freely moving rats, and that this release is dependent on the NBM [5]. Our findings also extend prior research demonstrating that ACh levels correlate with taste memory formation and that taste learning can be disrupted by NBM lesions [59] or cortical cholinergic antagonism [60], and can be enhanced by cholinergic agonism in the IC [15]. This convergence of evidence indicates that cholinergic activity in the insular gustatory neocortex, particularly cholinergic activation coming from the NBM, plays a critical role in the mnemonic representation of taste [61–64].

The present findings support the hypothesis that ACh modulates the general efficacy of sensory cortical processing during information association [21]. However, important questions arise from this hypothesis. For example, if cholinergic neuromodulation participates in memory formation, either by encoding novelty at the cellular level, or by instructing the neural circuits to store the novel taste representation, it is not clear how cholinergic feedback activity is mediated in the NBM during novelty or familiarity recognition. Additionally, it is not known how the selective pathways that originate in the NBM and are

involved in taste memory formation are controlled. In this regard, an increasing number of studies are providing new evidence suggesting that the histaminergic system could have an important function during the interactions mediated by NBM cholinergic activity. It has been demonstrated that the histaminergic system is largely responsible for cortical activation and cognitive activities during wakefulness [65]; it also constitutes an important wake-promoting system [66] and participates in the complex regulation of sleep stages, feeding, and cognition [35,45,67,68]. Given that the NBM receives substantial histaminergic afferents from the tuberomammillary nucleus [33,34,69–71], the functional specificity of histamine release during cognitive processes may depend on the brain regions involved and the histaminergic receptor subtypes being bound, as well as on the nature of the cognitive task [72,73].

A second important set of findings from this study was that injections of the H<sub>3</sub> agonist RAMH into the IC or of the H<sub>1</sub> antagonist pirlamine into the NBM impaired taste aversive memory formation while decreasing ACh levels in the IC, which are normally elevated during novel taste consumption. These results indicate that increased cortical ACh release during novel taste consumption requires the integrity of (at least) two subtypes of histaminergic receptors localized in the NBM and IC. Furthermore, our results show that opposing actions by cortical H<sub>3</sub> receptors and basal H<sub>1</sub> receptors are crucial for novelty processing during CTA acquisition. These findings agree with previous reports in which blockade of NBM histamine receptors impaired memory formation of different tasks that require an intact cholinergic system [52,74,75]. Moreover, H<sub>3</sub> receptor activation facilitates object recognition memory and aversive context learning [30,76,77], suggesting that monoaminergic-cholinergic system interactions [78] are modulated by H<sub>3</sub> receptors that regulate ACh release in the entorhinal cortex [51,79], NBM, and medial septum [50,80]. Additionally, NBM cholinergic neurons have been shown to be activated mainly through H<sub>1</sub> histamine receptors, and histamine injections into the basal forebrain have been shown to increase ACh release in the cortex [6,31,34,37,43,74].

Recent evidence showing opposite effects of different histamine receptor subtypes highlights the complexity of the histaminergic system [32,40,63]. Bacciottini et al. (2001) have posited that the histaminergic system may be comprised of two components: one inhibitory, related to local nerve terminal actions, and the other excitatory, interacting with cholinergic cells in the cholinergic basal forebrain. H<sub>3</sub> receptors, located post-synaptically in the cortex, facilitate GABA release, which appears to inhibit increases in ACh release in the cortex [52]. Inhibition of ACh release by H<sub>3</sub> agonism in the cortex can be reversed by local GABA<sub>A</sub> receptor antagonism [81]. Conversely, histamine in the NBM acts in the opposite fashion, facilitating the release of cortical ACh through

H<sub>1</sub> receptors [32,74]. For example, intra-NBM administration of histamine through a microdialysis probe increases ACh release in the parietal cortex, probably through H<sub>1</sub> receptors [6,50]. In light of the aforementioned evidence of dual, opposing effects of histamine—excitatory on NBM cell bodies and inhibitory on cholinergic terminals [30,81]—our demonstration here that GABAergic cells in the IC express H<sub>3</sub> receptors suggests that there may be an important GABA/ACh interaction during taste memory formation that is regulated by histaminergic activity. Further studies are needed to test this hypothesis.

The present evidence indicates that H<sub>1</sub> receptors in the NBM and H<sub>3</sub> receptors in the IC must be activated and inhibited, respectively, during novel taste learning, since the pharmacological manipulation of these receptors can alter release of ACh into the IC, and this release is a requirement for novel processing during taste learning. Our hypothesis also includes the possibility that GABA activity could be modulated by histamine receptors in the IC during acquisition as well as during retrieval of taste aversive memory [11,82].

Finally, accumulating evidence shows that histamine plays a major role in the maintenance of arousal and contributes to the modulation of appetite, energy homeostasis, motor behavior, and cognition [40,68,83,84]. All of these diverse physiological roles are involved in the complex task of feeding, a major guiding influence of which is taste memory. The evidence presented in this article indicates that pathways modulated by NBM cholinergic activity are coordinated by different subpopulations of histamine receptors located on the cell body or terminals, providing further support for the view that “the histaminergic system is organized into distinct functional pathways modulated by selective mechanisms” [32]. In particular, during taste memory formation and retrieval, ACh release into the cortex may be finely tuned by histaminergic activity to coordinate novel versus familiar stimulus processing in taste memory recognition.

## Acknowledgments

We thank Angela Gabriela Vera-Rivera, José Alejandro Rangel-Hernández and Elsa Nydia Hernández-Ríos for technical support, and Shaun Harris and Dr. Dorothy Pless for English review. We also thank Dr. Ann Power Smith at Write Science Right for scientific language editing.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MIM LPS. Performed the experiments: LPS. Analyzed the data: LPS MIM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MIM. Wrote the paper: LPS MIM. Development of Immunofluorescence assays: LPS. Final approval of the version: LPS MIM.

## References

- McGaugh JL, Cahill L (1997) Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behav Brain Res* 83: 31–38.
- Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16: 710–715.
- Robinson L, Platt B, Riedel G (2011) Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res* 221: 443–465.
- Weinberger NM, Bakin JS (1998) Learning-induced physiological memory in adult primary auditory cortex: receptive fields plasticity, model, and mechanisms. *Audiol Neurootol* 3: 145–167.
- 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.
- Cecchi M, Passani MB, Bacciottini L, Manmaioni PF, Blandina P (2001) Cortical acetylcholine release elicited by stimulation of histamine H1 receptors in the nucleus basalis magnocellularis: a dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. *Eur J Neurosci* 13: 68–78.
- Montero-Pastor A, Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Nadal-Aleman R, Marti-Nicolovius M, et al. (2001) Nucleus basalis magnocellularis electrical stimulation facilitates two-way active avoidance retention, in rats. *Brain Res* 900: 337–341.
- Rokem A, Silver MA (2013) The benefits of cholinergic enhancement during perceptual learning are long-lasting. *Front Comput Neurosci* 7: 66.
- de Souza Silva MA, Lenz B, Rotter A, Biermann T, Peters O, et al. (2013) Neurokinin3 receptor as a target to predict and improve learning and memory in the aged organism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15097–15102.
- Hasselmo ME, McGaughy J (2004) High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res* 145: 207–231.
- 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.
12. Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2003) Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiol Learn Mem* 80: 211–222.
  13. Miranda MI, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 882: 230–235.
  14. Gutierrez R, Rodriguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Núñez-Jaramillo L, Bermudez-Rattoni F (2003) Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 80: 323–331.
  15. Clark EW, Bernstein IL (2009) Boosting cholinergic activity in gustatory cortex enhances the salience of a familiar conditioned stimulus in taste aversion learning. *Behav Neurosci* 123: 764–771.
  16. Hagan JJ, Salamone JD, Simpson J, Iversen SD, Morris RG (1988) Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* 27: 9–20.
  17. Rasmusson AM, Hauger RL, Morgan CA, Bremner JD, Charney DS, et al. (2000) Low baseline and yohimbine-stimulated plasma neuropeptide Y (NPY) levels in combat-related PTSD. *Biol Psychiatry* 47: 526–539.
  18. Savage LM (2012) Sustaining high acetylcholine levels in the frontal cortex, but not retrosplenial cortex, recovers spatial memory performance in a rodent model of diencephalic amnesia. *Behav Neurosci* 126: 226–236.
  19. Douchamps V, Jeevajee A, Blundell P, Burgess N, Lever C (2013) Evidence for encoding versus retrieval scheduling in the hippocampus by theta phase and acetylcholine. *J Neurosci* 33: 8689–8704.
  20. Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T (1998) *Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind*; Publications OS, editor: Oxford University Press. 178 p.
  21. Hasselmo ME, Sarter M (2011) Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* 36: 52–73.
  22. Hasselmo ME, Barkai E (1995) Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. *J Neurosci* 15: 6592–6604.
  23. Hasselmo ME (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 3: 351–359.
  24. Heys JG, Schultheiss NW, Shay CF, Tsuno Y, Hasselmo ME (2012) Effects of acetylcholine on neuronal properties in entorhinal cortex. *Front Behav Neurosci* 6: 32.
  25. Hasselmo ME (1995) Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav Brain Res* 67: 1–27.
  26. Hasselmo ME (1999) Neuromodulation and the hippocampus: memory function and dysfunction in a network simulation. *Prog Brain Res* 121: 3–18.
  27. Hasselmo ME, Hay J, Ilyn M, Gorchetnikov A (2002) Neuromodulation, theta rhythm and rat spatial navigation. *Neural Netw* 15: 689–707.
  28. Hasselmo ME, Schnell E (1994) Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology. *J Neurosci* 14: 3898–3914.
  29. Bacciottini L, Passani MB, Giovannelli L, Cangioni I, Mannaioni PF, et al. (2002) Endogenous histamine in the medial septum-diagonal band complex increases the release of acetylcholine from the hippocampus: a dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. *Eur J Neurosci* 15: 1669–1680.
  30. Blandina P, Giorgetti M, Bartolini L, Cecchi M, Timmerman H, et al. (1996) Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. *Br J Pharmacol* 119: 1656–1664.
  31. Giannoni P, Medhurst AD, Passani MB, Giovannini MG, Ballini C, et al. (2012) Regional differential effects of the novel histamine H3 receptor antagonist 6-[(3-cyclobutyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin-7-yl)oxy]-N-methyl-3-pyridine carboxamide hydrochloride (GSK189254) on histamine release in the central nervous system of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 332: 164–172.
  32. Munari L, Provensi G, Passani MB, Blandina P (2013) Selective brain region activation by histamine H receptor antagonist/inverse agonist ABT-239 enhances acetylcholine and histamine release and increases c-Fos expression. *Neuropharmacology* 70C: 131–140.
  33. Panula P, Yang HY, Costa E (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2572–2576.
  34. Giannoni P, Passani MB, Nosi D, Chazot PL, Shenton FC, et al. (2009) Heterogeneity of histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* 29: 2363–2374.
  35. de Almeida MA, Izquierdo I (1986) Memory facilitation by histamine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 283: 193–198.
  36. de Almeida MA, Izquierdo I (1988) Intracerebroventricular histamine, but not 48/80, causes posttraining memory facilitation in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 291: 202–207.
  37. Benetti F, Baldi E, Bucherelli C, Blandina P, Passani MB (2012) Histaminergic ligands injected into the nucleus basalis magnocellularis differentially affect fear conditioning consolidation. *Int J Neuropsychopharmacol*: 1–8.
  38. Benetti F, da Silveira CK, da Silva WC, Cammarota M, Izquierdo I (2012) Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem* 97: 54–58.
  39. Ebsenshade TA, Browman KE, Miller TR, Krueger KM, Komater-Roderwald V, et al. (2012) Pharmacological properties and procognitive effects of ABT-288, a potent and selective histamine H3 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 343: 233–245.
  40. Kohler CA, da Silva WC, Benetti F, Bonini JS (2012) Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. *Neural Plast* 2011: 328602.
  41. Kruk M, Miszkiej J, McCreary AC, Przegalinski E, Filip M, et al. (2012) Effects of the histamine H(3) receptor antagonist ABT-239 on cognition and nicotine-induced memory enhancement in mice. *Pharmacol Rep* 64: 1316–1325.
  42. Benetti F, Baldi E, Bucherelli C, Blandina P, Passani MB (2013) Histaminergic ligands injected into the nucleus basalis magnocellularis differentially affect fear conditioning consolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 16: 575–582.
  43. Benetti F, Izquierdo I (2013) Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. *Int J Neuropsychopharmacol*: 1–7.
  44. Brabant C, Charlier Y, Tirelli E (2013) The histamine H(3)-receptor inverse agonist Pitolisant improves fear memory in mice. *Behav Brain Res* 243C: 199–204.
  45. Puro-Sierra L, Sabath E, Nunez-Jaramillo L, Miranda MI (2010) Blockade of nucleus basalis magnocellularis or activation of insular cortex histamine receptors disrupts formation but not retrieval of aversive taste memory. *Neurobiol Learn Mem* 93: 216–220.
  46. Paxinos G, Watson C (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Academic Press.
  47. 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.
  48. Miranda MI, Quirarte GL, Rodriguez-Garcia G, McGaugh JL, Roozendaal B (2008) Glucocorticoids enhance taste aversion memory via actions in the insular cortex and basolateral amygdala. *Learning & memory* 15: 468–476.
  49. Miranda MI, Bermudez-Rattoni F (1998) Acetylcholine determination of microdialysates of fetal neocortex grafts that induce recovery of learning. *Brain Res Brain Res Protoc* 2: 215–222.
  50. Cecchi M, Giorgetti M, Bacciottini L, Giovannini MG, Blandina P (1998) Increase of acetylcholine release from cortex of freely moving rats by administration of histamine into the nucleus basalis magnocellularis. *Inflamm Res* 47 Suppl 1: S32–33.
  51. Arrang JM, Drutel G, Schwartz JC (1995) Characterization of histamine H3 receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. *Br J Pharmacol* 114: 1518–1522.
  52. Bacciottini L, Passani MB, Mannaioni PF, Blandina P (2001) Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. *Behav Brain Res* 124: 183–194.
  53. Blandina P, Munari L, Provensi G, Passani MB (2012) Histamine neurons in the tuberomammillary nucleus: a whole center or distinct subpopulations? *Front Syst Neurosci* 6: 33.
  54. Cangioni I, Baldi E, Mannaioni PF, Bucherelli C, Blandina P, et al. (2002) Activation of histaminergic H3 receptors in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. *Eur J Neurosci* 16: 521–528.
  55. Orsetti M, Casamenti F, Pepeu G (1996) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res* 724: 89–96.
  56. Fibiger HC, Damsma G, Day JC (1991) Behavioral pharmacology and biochemistry of central cholinergic neurotransmission. *Adv Exp Med Biol* 295: 399–414.
  57. Weinberger NM, Bakin JS (1998) Research on auditory cortex plasticity. *Science* 280: 1174.
  58. Giovannini MG, Rakovska A, Benton RS, Pazzagli M, Bianchi L, et al. (2001) Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience* 106: 43–53.
  59. Lopez-Garcia JC, Fernandez-Ruiz J, Escobar ML, Bermudez-Rattoni F, Tapia R (1993) Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 147–152.
  60. Naor C, Dudai Y (1996) Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 79: 61–67.
  61. Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C (1985) The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann N Y Acad Sci* 444: 332–358.
  62. Flicker C, Dean RL, Watkins DL, Fisher SK, Bartus RT (1983) Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 18: 973–981.
  63. Baldi E, Mariottini C, Bucherelli C (2008) Differential roles of the basolateral amygdala and nucleus basalis magnocellularis during post-reactivation contextual fear conditioning reconsolidation in rats. *Neurobiol Learn Mem*.
  64. Power AE (2004) Muscarinic cholinergic contribution to memory consolidation: with attention to involvement of the basolateral amygdala. *Curr Med Chem* 11: 987–996.
  65. Anacleot C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, et al. (2009) Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. *J Neurosci* 29: 14423–14438.
  66. Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL (2011) Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 17–23.
  67. Raddatz R, Tao M, Hudkins RL (2010) Histamine H3 antagonists for treatment of cognitive deficits in CNS diseases. *Curr Top Med Chem* 10: 153–169.

68. Kruk M, Miszkiel J, McCreary AC, Przegalinski E, Filip M, et al. (2012) Effects of the histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist ABT-239 on cognition and nicotine-induced memory enhancement in mice. *Pharmacol Rep* 64: 1316–1325.
69. Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28: 585–610.
70. Privou C, Knoche A, Hasenohrl RU, Huston JP (1998) The H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. *Neuropharmacology* 37: 1019–1032.
71. Privou C, Li JS, Hasenohrl RU, Huston JP (1999) Enhanced learning by posttrial injection of H<sub>1</sub>-but not H<sub>2</sub>-histaminergic antagonists into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neurobiol Learn Mem* 71: 308–324.
72. Passani MB, Blandina P, Torrealba F (2011) The histamine H<sub>3</sub> receptor and eating behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 24–29.
73. Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P (2007) Histamine in the brain: beyond sleep and memory. *Biochem Pharmacol* 73: 1113–1122.
74. Khateb A, Fort P, Pegna A, Jones BE, Muhlethaler M (1995) Cholinergic nucleus basalis neurons are excited by histamine in vitro. *Neuroscience* 69: 495–506.
75. Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H (1994) Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol* 42: 685–702.
76. Gianlorenco AC, Canto-de-Souza A, Mattioli R (2012) Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. *Brain Res Bull* 86: 134–138.
77. Blandina P, Giorgetti M, Cecchi M, Leurs R, Timmerman H, et al. (1996) Histamine H<sub>3</sub> receptor inhibition of K<sup>(+)</sup>-evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm Res* 45 Suppl 1: S54–55.
78. Giovannini MG, Ceccarelli I, Molinari B, Cecchi M, Goldfarb J, et al. (1998) Serotonergic modulation of acetylcholine release from cortex of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1219–1225.
79. Arrang JM, Drutel G, Garbarg M, Ruat M, Traffort E, et al. (1995) Molecular and functional diversity of histamine receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 757: 314–323.
80. Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P (2000) Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 107–113.
81. Giorgetti M, Bacciottini L, Bianchi L, Giovannini MG, Cecchi M, et al. (1997) GABAergic mechanism in histamine H<sub>3</sub> receptor inhibition of K<sup>(+)</sup>-evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm Res* 46 Suppl 1: S33–34.
82. Moron I, Ramirez-Lugo L, Ballesteros MA, Gutierrez R, Miranda MI, et al. (2002) Differential effects of bicuculline and muscimol microinjections into the nucleus basalis magnocellularis in taste and place aversive memory formation. *Behav Brain Res* 134: 425–431.
83. Dere E, Zlomuzica A, De Souza Silva MA, Ruocco LA, Sadile AG, et al. (2010) Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behav Brain Res* 215: 209–220.
84. Zlomuzica A, Ruocco LA, Sadile AG, Huston JP, Dere E (2009) Histamine H<sub>1</sub> receptor knockout mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze. *Br J Pharmacol* 157: 86–91.