



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA EN LA CONSOLIDACIÓN
INDUCIDA POR EVOCACIÓN A CORTO PLAZO DE LA MEMORIA OLFATIVA
RETRONASAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RÍOS CARRILLO JORGE EDUARDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., MARZO, 2016



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.



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de octubre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RÍOS CARRILLO JORGE EDUARDO** con número de cuenta **303147927**, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA EN LA CONSOLIDACIÓN INDUCIDA POR EVOCACIÓN A CORTO PLAZO DE LA MEMORIA OLFATIVA RETRONASAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN**:

Presidente: DR. FRANCISCO XAVIER SOTRES BAYÓN
Vocal: DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO
Secretario: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
Suplente: DRA. SYLVIA LETICIA VERDIGUO DÍAZ
Suplente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 04 de marzo de 2016

M. del Coro Arizandi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (CVU: 545458/No. Registro Becario: 294541/No. de Apoyo: 363118) y al PAPIIT por el apoyo a este proyecto de investigación (IN204014).

A mi tutor principal el Dr. Gabriel Roldán Roldán, y a los miembros de mi comité tutor la Dra. Robyn Elizabeth Hudson y el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por su orientación, sugerencias y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres.

Por ser un gran ejemplo a seguir, por apoyarme en todo lo que he necesitado, por su paciencia, confianza, por nunca dejar de creer en mí, por su amor, por la educación y valores que me han inculcado.

A mis hermanos.

Por todo lo que hemos vivido y seguiremos viviendo.

A mi hermosa Gina.

Por el apoyo y alegría que me transmites.

A mis amigos.

Por los momentos compartidos, por su apoyo y confianza, por las vivencias y paciencia que me han tenido. A Mireya Trejo y Dulce María Flores por tomarse el tiempo de leer este trabajo y darme sus sugerencias.

A todos los que me ayudaron para la realización y culminación de este trabajo.

Especialmente a mi tutor el Dr. Gabriel Roldán, a los miembros de mi comité tutor la Dra.

Robyn Hudson y el Dr. Gabriel Gutiérrez, a mis sinodales la Dra. Claudia Gómez, Dra.

Alicia Hernández, Dra. Leticia Verdugo y el Dr. Francisco Sotres por sus observaciones y sugerencias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por todas las oportunidades que me ha brindado.

Muchas Gracias.

☞ **A mi familia.....**

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE GRÁFICAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Temporalidad de la formación de memoria.....	3
3.2 Aprendizajes alimenticios.....	4
3.3 Gusto y tipos de presentación de los olores.....	6
3.4 El condicionamiento aversivo a los sabores.....	7
3.5 El condicionamiento aversivo a los olores.....	9
3.6 Potenciación de la aversión al olor por el sabor.....	9
3.7 Reconsideración del condicionamiento aversivo al olor.....	10
3.8 Diferencias anatómicas entre la olfacción ortonasal y retronasal.....	11
3.9 Reevaluación de los intervalos interestímulos y la olfacción ortonasal.....	12
3.10 La facilitación de la consolidación por la evocación a corto plazo.....	12
3.11 Vía olfativa.....	15
3.12 Vías de integración del condicionamiento aversivo al olor.....	16
3.13 Glutamato y memoria.....	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
7. HIPÓTESIS.....	23
8. METODOLOGÍA.....	24
8.1 Dispositivo de experimentación.....	24
8.2 Sujetos experimentales.....	24
8.3 Protocolo experimental.....	25
8.4 Obtención y análisis de los datos.....	27
9. RESULTADOS.....	28
9.1 Efecto del condicionamiento aversivo al olor sobre la preferencia al acetato de isoamilo por vía retronasal.....	28

9.2 Ensayos de extinción de la aversión al acetato de isoamilo retronasal mediante evocaciones con opción.....	29
9.3 Umbral olfativo para el acetato de isoamilo por vía retronasal.....	29
9.4 Variación de los parámetros de adquisición con olfacción retronasal para encontrar las mejores condiciones en que se presenta el fenómeno de facilitación de la consolidación....	30
9.4.1 Estímulos condicionado e incondicionado.....	30
9.4.2 Intervalo interestímulo.....	34
9.5 Efecto de la administración intraperitoneal de MK-801.....	36
9.6 MK-801 intraperitoneal como estímulo incondicionado.....	38
9.7 MK-801 como agente amnésico durante la consolidación.....	39
10. DISCUSIÓN.....	40
10.1 Modelo de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo.....	53
11. CONCLUSIONES.....	59
12. LITERATURA CITADA.....	60
ANEXOS.....	72
I. Modelos para explicar la resistencia a grandes intervalos interestímulos en el condicionamiento aversivo al sabor.....	72
II. Estudios neuroanatómicos del condicionamiento aversivo al olor.....	76
III. El MK-801.....	84

LISTA DE FIGURAS

1. Procesos de formación de la memoria.....	5
2. Formación de memorias alimenticias.....	5
3. Protocolo experimental habitual del CAS y CAO.....	6
4. Vías de presentación de los olores.....	7
5. Fenómeno de facilitación de la consolidación por la reactivación a corto plazo.....	13
6. La evocación de la MCP facilita la consolidación de la MLP bajo condiciones de aprendizaje débil producido por la administración en el bulbo olfatorio de escopolamina [60 µg] previo a la adquisición.....	14
7. La facilitación de la consolidación es dependiente del tiempo.....	14
8. Inervación de los glomérulos del bulbo olfatorio por las neuronas olfativas sensitivas del epitelio olfativo, y su sinapsis con las células mitrales.....	16
9. Vías de integración de la información olfativa y del malestar visceral producido por LiCl.....	17
10. Tipos de receptores glutamatérgicos.....	18
11. Dispositivo de experimentación.....	24
12. Protocolo experimental del CAO utilizado en este trabajo.....	26
13. Ejemplo del esquema de un protocolo experimental.....	27
14. Modelo gráfico del fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo en tres condiciones hipotéticas de adquisición.....	55

LISTA DE GRÁFICAS

1. Efecto del condicionamiento aversivo sobre la preferencia al olor retronasal de AI [5×10^{-3} %].....	28
2. Ensayos consecutivos de extinción/evocación con opción del CAO retronasal a AI [5×10^{-3} %].....	29
3. Preferencias obtenidas al evocar con concentraciones decrecientes de AI por vía retronasal.....	30
4. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 5×10^{-6} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h.....	31
5. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 1×10^{-5} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h.....	32
6. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 5×10^{-5} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h.....	33
7. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 1×10^{-4} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h.....	34
8. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 5×10^{-5} % y una concentración de LiCl de 2 % peso corporal variando el IIE, y evocando a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h.....	35
9. Efecto del MK-801 0.1 mg/kg ip. sobre la facilitación de la consolidación.....	36
10. Efecto del MK-801 0.2 mg/kg ip. sobre la facilitación de la consolidación.....	37
11. Efecto del MK-801 utilizado como EI en dosis de 0.1 y 0.2 mg/kg.....	38
12. Efecto de la administración de MK-801 ip. sobre la consolidación del CAO retronasal.....	39
13. Índice de preferencia de las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación en animales condicionados con estimulación olfativa ortonasal y variando el estímulo incondicionado.....	41
14. Índice de preferencia de las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación condicionados con estimulación olfativa retronasal y variando el estímulo incondicionado.....	42

15. Índices de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo condicionados con estimulación olfativa ortonasal y retronasal variando el estímulo incondicionado.....	42
16. Índice de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación condicionados con estimulación olfativa ortonasal y variando el IIE.....	43
17. Índices de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación condicionados con estimulación olfativa retronasal y variando el intervalo interestímulo.....	44
18. Índices de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo condicionados con estimulación olfativa ortonasal y retronasal variando el intervalo interestímulo.....	44
19. Dinámica de la memoria aversiva después de la adquisición para tres condiciones diferentes de LiCl.....	49
20. Efecto de las reactivaciones de corto plazo (triángulos) sobre la dinámica de la memoria aversiva generada en condiciones de bajo LiCl (0.15 M 1 % peso corporal).....	50
21. Efecto de las reactivaciones de corto plazo (triángulos) sobre la dinámica de la memoria aversiva generada en condiciones de bajo LiCl (0.15 M 0.5 % peso corporal).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Acetato de isoamilo
BLA	Núcleo basolateral de la amígdala
CAO	Condicionamiento aversivo al olor
CAS	Condicionamiento aversivo al sabor
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
IIE	Intervalo interestímulo
IP	Índice de preferencia
MCP	Memoria de corto plazo
MLP	Memoria de largo plazo
PAOS	Potenciación de la aversión al olor por el sabor

1. RESUMEN

La consolidación es un proceso mediante el cual la memoria de corto plazo se estabiliza en una memoria de largo plazo; durante este proceso la memoria es lábil y susceptible a deteriorarse, sin embargo, existen manipulaciones que pueden favorecer su reforzamiento. En nuestro laboratorio, al estudiar el condicionamiento aversivo al olor usando condiciones subóptimas de aprendizaje (lo cual produce una memoria débil que no se consolida), se encontró que su evocación de corto plazo, facilita la consolidación a largo plazo, sin que sea necesario parear los estímulos nuevamente como se hace durante la adquisición de este aprendizaje. En general, la evocación de una memoria asociativa por la reexposición al estímulo condicionado puede generar dos procesos opuestos: la reconsolidación de la memoria o su extinción. Sin embargo, la facilitación no coincide con ninguna de estas opciones.

El fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo no se ha caracterizado del todo, y se desconocen los sistemas de neurotransmisión y estructuras cerebrales que podrían estarlo regulando. El glutamato, neurotransmisor excitador más abundante del sistema nervioso central, es liberado por las terminales presinápticas activando diferentes tipos de receptores dentro de los que destacan los NMDA, los cuales participan de manera fundamental en la plasticidad sináptica, y su activación en distintas estructuras del cerebro, se ha relacionado con los mecanismos celulares de la adquisición y consolidación de la memoria, por lo que podrían estar involucrados en el fenómeno de facilitación.

Por tanto, nos propusimos determinar la participación de los receptores glutamatérgicos NMDA en este fenómeno, utilizando la estimulación olfativa retronasal que permite un mejor control del estímulo condicionado. Para esto, se variaron las condiciones del estímulo condicionado e incondicionado así como el intervalo interestímulo con el objeto de generar un aprendizaje subóptimo que pudiera ser facilitado por evocación a corto plazo.

A pesar de las numerosas condiciones probadas utilizando la presentación retronasal del olor, solo con una (Acetato de isoamilo 5×10^{-5} % v/v y LiCl 0.5 % peso corporal) se logró reproducir el fenómeno de facilitación de la consolidación. Esto contrasta con estudios previos usando la presentación ortonasal. Por otro lado, la administración sistémica de MK-801 (antagonista de los receptores NMDA) antes o inmediatamente después de la facilitación, tuvo un efecto limitado, lo cual podría indicar que el sistema glutamatérgico juega un papel secundario en el fenómeno de facilitación, abriendo la posibilidad de que otros sistemas de neurotransmisión estén involucrados.

2. ABSTRACT

Consolidation is a process whereby the short term memory is stabilized in a long term memory; during this process the memory is labile and susceptible to deteriorate, however, there are manipulations that can favor its strengthening. In our laboratory, studying aversive conditioning to odor using suboptimal learning conditions (which produces a weak memory which is not consolidated), it was found that its short term evocation, facilitates its consolidation into a long term memory, without requiring to match it again the stimuli, as it is done during the acquisition of this learning. In general, the evocation of an associative memory by reexposure to the conditioned stimulus can generate two opposite processes: memory reconsolidation or extinction. However, the facilitation does not coincide with any of these possibilities.

The phenomenon of facilitation of the consolidation by short term evocation has not been fully characterized, and the neurotransmitter systems and cerebral structures that could be involved are unknown. Glutamate, the most abundant exciter neurotransmitter in the central nervous system is released by presynaptic terminals, activating different types of receptors within highlighting NMDA, which are fundamentally involved in synaptic plasticity, and its activation in different structures of the brain, has been related with the cellular mechanisms of memory acquisition and consolidation, so they could be involved in the facilitation phenomenon.

Therefore, we proposed to determine the participation of NMDA glutamate receptors in this phenomenon, using the retronasal olfactory stimulation that allows a better control of the conditioned stimulus. For this, the conditioned and unconditioned stimulus and the interstimulus interval was varied in order to generate a suboptimal learning that could be facilitated by short term evocation.

Despite the numerous conditions tested using the retronasal odor presentation, only one (Isoamyl acetate $5 \times 10^{-5}\%$ v/v and 0.5% LiCl body weight) produced the phenomenon of facilitation of the consolidation. This contrasts with previous studies using the orthonasal presentation. On the other hand, systemic administration of MK-801 (antagonist of NMDA receptors) before or immediately after facilitation, had a limited effect, which might indicate that the glutamatergic system plays a secondary role in the facilitation phenomenon, opening the possibility that other neurotransmitter systems contribute to this process.

3. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo y la vida de los animales, la interacción entre sus genes y el medio modifican su sistema nervioso e influyen en su conducta. El aprendizaje y la memoria son los procesos más importantes a través de los cuales ocurre esto, y permiten que los animales recuerden y respondan apropiadamente ante situaciones que han experimentado anteriormente (Squire, 1987; Jerusalinsky *et al.*, 1997; Bear *et al.*, 2001; Kandell *et al.*, 2001).

El aprendizaje es un proceso continuo que desencadena la formación de la memoria (Davis, 2005); consiste en la adquisición y codificación en el sistema nervioso de información nueva sobre el medio externo e interno (Squire, 1986; Ambrogi *et al.*, 1999; Aguado, 2001; Kandel *et al.*, 2001; Bouton y Moody, 2004), lo que en determinadas circunstancias produce modificaciones conductuales transitorias o permanentes como consecuencia de la experiencia, y permite a los organismos su adaptación al ambiente (Ambrogi *et al.*, 1999; Aguado, 2001; Davis, 2005; Carlson, 2006).

La memoria es el resultado del almacenamiento de la información en células del sistema nervioso gracias a su plasticidad, y se define como los cambios estructurales y funcionales que codifican lo aprendido (Squire, 1986; Woolf, 1998; Ambrogi *et al.*, 1999; Davis, 2005). Se utilizan como sinónimos los términos trazo, huella o engrama de memoria (Squire, 1986 y Woolf, 1998).

3.1 Temporalidad de la formación de memoria

Usualmente se acepta que los procesos de formación de la memoria siguen una secuencia lineal (Sutherland y Lehmann, 2011), que pueden ser divididos en tres etapas (fig. 1):

1. Adquisición de la información: corresponde a la transducción sensorial de los estímulos y su codificación en una memoria de corto plazo (MCP) por el sistema nervioso (Woolf, 1998; Salamon, 2002; Dux y Marois, 2009), solo aquellos estímulos que inducen una mayor atención son almacenados de esta manera (Woolf, 1998; Salamon, 2002). La MCP puede durar desde segundos hasta unas cuantas horas (Cammarota *et al.*, 2004).

2. Consolidación sináptica o molecular y almacenamiento de la memoria de largo plazo (MLP): son una serie de eventos a nivel celular como la activación genética para incrementar la

síntesis de proteínas y de circuitos neuronales como el desarrollo de nuevas conexiones sinápticas, que estabilizan el engrama y hacen que la MCP se transforme en MLP. La duración de este proceso varía de unas cuantas horas a unos pocos días dependiendo del tipo de aprendizaje (Bailey *et al.*, 1996; Nader y Hardt, 2000; Salamon, 2002; Sutherland y Lehmann, 2011). Desde el punto de vista de la neurobiología celular, se considera suficiente un lapso de 24 h para que se forme una MLP (Curtis *et al.*, 2000; Dudai, 2002; Lamprecht y Ledoux, 2004). Una de las diferencias moleculares más importantes entre la MCP y la MLP es que esta última depende de la síntesis de proteínas (Davis y Squire, 1984; Martin *et al.*, 2000; Dudai y Eisenberg, 2004). Durante la consolidación, la memoria es susceptible de ser modificada por diversas intervenciones, de manera que su evocación puede verse deteriorada (Pedreira y Maldonado, 2003). Una vez que la MCP se consolida en una MLP puede durar días, meses, años o incluso el resto de la vida (Squire, 1986; Bailey *et al.*, 1996; Woolf, 1998; Ambrogi *et al.*, 1999; Bear *et al.*, 2001).

3. Evocación o recuperación de la memoria: corresponde a la reactivación de la memoria que yace latente según sea requerida para guiar el comportamiento futuro (Woolf, 1998; Ambrogi *et al.*, 1999; Salamon, 2002 y Cammarota *et al.*, 2004), depende de la correspondencia entre las condiciones presentes durante el aprendizaje y las condiciones durante la evocación, y es interdependiente de la consolidación (Summers *et al.*, 2003; Bouton y Moody, 2004 y Cammarota *et al.*, 2004). Por otro lado, en el ámbito de la investigación, las modificaciones observables en la conducta y en la fisiología son las evidencias de que un sujeto ha aprendido; a partir de éstas se infieren los cambios en el sistema nervioso que debieron ocurrir a consecuencia del aprendizaje y por lo tanto, se utilizan como indicadores para medir la memoria (Ambrogi *et al.*, 1999; Bouton y Moody, 2004; Davis, 2005). Así, debe quedar clara la diferencia entre la memoria: aquellos cambios físicos en el sistema nervioso como resultado del aprendizaje, y la ejecución: la manifestación conductual de estos cambios (Bouton y Moody, 2004).

3.2 Aprendizajes alimenticios

Los aprendizajes alimenticios se consideran una forma de adaptación al ambiente cambiante que se encuentran presentes en todas las especies animales (Staddon, 1983; Batselll y Blankenship, 2002), y participan en diversos aspectos de las conductas alimentarias como: identificación de los alimentos, forma de conseguirlos, selección de los mismos y la asociación de sus propiedades



Figura 1. Procesos de formación de la memoria. Inician con la adquisición de información novedosa por medio de los sentidos que puede dar origen a una MCP, si la información es suficientemente relevante, esta MCP puede ser consolidada en una MLP. Finalmente la memoria puede ser reactivada mediante la evocación desencadenando una conducta (Modificado de Ambrogui *et al.*, 1999).

organolépticas con las consecuencias de su ingesta (Lorden *et al.*, 1970; Revusky, 1971; Bures *et al.*, 1998). De acuerdo con Sclafani (1997) y Bures y cols. (1998) estas asociaciones se forman entre estímulos externos mediados por aferencias gustativas, olfativas, visuales y somatosensoriales (estímulo condicionado, EC) y el estado general del sujeto a partir de señales de las aferencias viscerales, principalmente las que detectan las consecuencias de su ingestión (estímulo incondicionado, EI). Dichas asociaciones pueden darse por consecuencias favorables o por efectos adversos como el malestar gástrico y las intoxicaciones (fig. 2).



Figura 2. Formación de memorias alimenticias. La asociación de las características organolépticas de los alimentos con sus consecuencias postingestivas determina la formación de memorias seguras o aversivas que guiarán posteriormente el comportamiento alimenticio; Si se forma una memoria segura se incrementará el consumo del alimento, en caso de una asociación aversiva se evitará consumirlo nuevamente. Este proceso se repite durante toda la vida de un animal (Adaptado de Kyriazakis *et al.*, 1999).

Aunque las consecuencias de la ingestión de alimentos puede ser benéfica o perjudicial, en investigación se ha profundizado más en las últimas, estas han sido nombradas aprendizaje o condicionamiento toxicofóbico, y experimentalmente se utilizan creando asociaciones entre un gusto –o sabor- (condicionamiento aversivo al sabor, CAS) o un olor (condicionamiento aversivo al olor, CAO) con malestar visceral producido por algún agente físico o químico, de los cuales, el más ampliamente utilizado es el LiCl (Welzl *et al.*, 2001) (fig. 3).

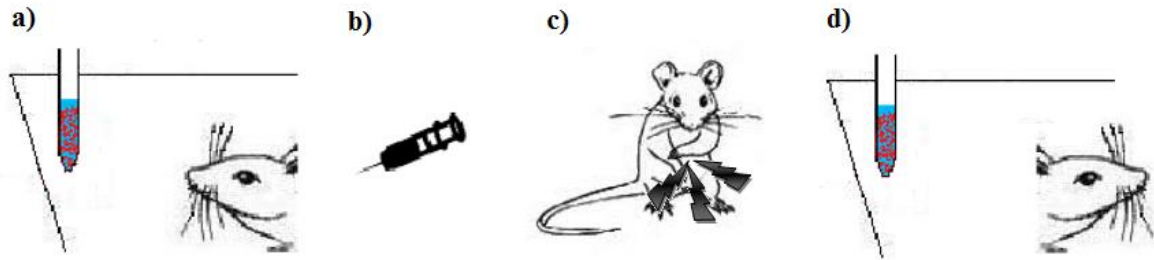


Figura 3. Protocolo experimental habitual del CAS y CAO. a) La rata ingiere una bebida con un sabor u olor novedoso (estímulo condicionado), b) posteriormente se le inyecta por vía intraperitoneal LiCl (estímulo incondicionado), c) El LiCl genera malestar gastrointestinal en el animal (respuesta incondicionada), d) la siguiente vez que se le ofrece la bebida con el sabor u olor la rata evitará ingerirla (respuesta condicionada).

3.3 Gusto y tipos de presentación de los olores

Naturalmente cuando un animal ingiere un alimento, la experiencia de su consumo se logra a través de diferentes canales sensoriales, principalmente el olfato y el gusto. De estos, el olfato actúa como una doble modalidad, ya que permite a los organismos explorar la comida a través de vías externas e internas (Rozin, 1982). Por ejemplo, cuando un animal se alimenta, inicialmente está expuesto al olor por una detección distal (ruta ortonasal), en la que los odorantes llegan a la mucosa olfativa a través de las fosas nasales. Posteriormente, cuando introduce la comida a su boca, se activa una ruta proximal a través de la nasofaringe (estimulación retronasal); nótese, que esta última vía produce necesariamente estimulación ortonasal y retronasal¹ (fig. 4) (Murphy *et al.*, 1977; Rozin, 1982; Pierce y Halpern, 1996; Chapuis *et al.*, 2007; Chapuis *et al.*, 2009). Adicionalmente, se debe considerar que los alimentos no solo tienen el componente olfativo, también presentan el gustativo, por lo que cuando se degluten estos dos componentes (compuesto olor-gusto), son percibidos simultáneamente como un sabor (Small y Prescott, 2005).

¹ A pesar que de manera natural la estimulación retronasal está acompañada de estimulación ortonasal, es decir, se trata de estimulación orto-retronasal, por cuestiones prácticas, en adelante se obviará y la estimulación orto-retronasal solo se nombrará como retronasal.

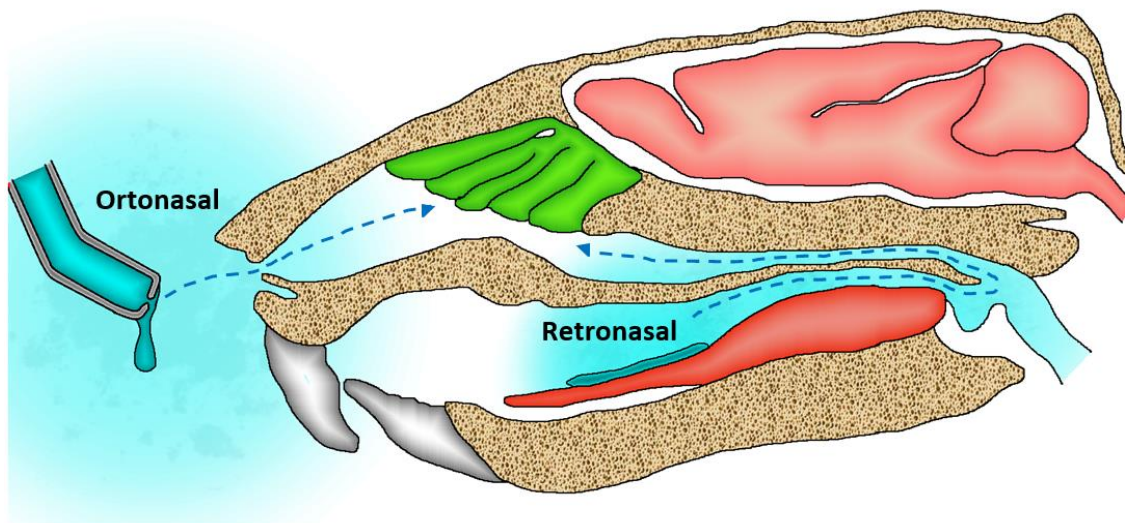


Figura 4. Vías de presentación de los olores. El epitelio olfativo (en verde) puede ser estimulado por moléculas odorantes que llegan del exterior por las fosas nasales (presentación ortonasal) o desde la cavidad oral a través de la nasofaringe (presentación retronasal), ambas presentaciones constituyen experiencias sensoriales cualitativamente diferentes.

En el estudio del CAO la presentación retronasal tiene ventajas experimentales sobre la ortonasal, ya que con esta, es más fácil controlar la cantidad del olor que está llegando al sujeto de prueba porque el odorante se diluye en una concentración preestablecida y fácilmente modificable. Mientras que con la presentación ortonasal, se requiere de aparatos especiales y costosos conocidos como olfatómetros para regular de manera más precisa este aspecto. Además, la presentación retronasal se acerca más a lo que naturalmente ocurre durante la alimentación.

3.4 El condicionamiento aversivo a los sabores

De los dos tipos de aprendizaje toxicofóbico, el relativo al gusto fue el primero en describirse y ha sido por mucho, el más estudiado de los dos modelos, por lo que algunas de sus interpretaciones han influido o se han extrapolado al conocimiento de las aversiones olfativas.

Los primeros antecedentes del estudio de la aversión condicionada alimenticia, fueron los trabajos realizados en la mitad del siglo XX para el desarrollo de tecnologías para la eliminación de roedores (por ej. Chitty, 1954; Elton, 1954; Elton y Laurie, 1954; Freeman *et al.*, 1954). Algunos de los resultados obtenidos llevaron a Elton (1954) a pensar, que las ratas podrían estar siendo condicionadas contra los cebos utilizados cuando consumían dosis subletales del veneno y asociaban alguno de sus ingredientes con las consecuencias desagradables de su ingestión.

Posteriormente, Rzóska interpretó este fenómeno como un aprendizaje asociativo que es dosis dependiente, y encontró que sigue presente después de 374 días, por lo que se retiene por grandes periodos de tiempo (Rzóska, 1954 a; Rzóska, 1954 b; Freeman y Riley, 2009).

Posteriormente John Garcia y otros investigadores reportaron que las ratas tienden a evitar un gusto (sacarina) que ha sido asociado con la exposición a radiación gamma, la cual actúa como EI, y que el grado de aversión y su persistencia, son dependientes de la dosis de radiación (Garcia *et al.*, 1955). Además, especularon que el motivo de esta asociación aversiva se debe a que la radiación afecta la función gastrointestinal, idea que fue aceptada cuando Garcia y Kimeldorf (1960) reportaron que la radiación produce una mayor aversión cuando es aplicada en la región abdominal en comparación con otras zonas.

En el tiempo en que se documentó la existencia del CAS, se aceptaba como dogma el “principio de contigüidad”. Este establecía que el intervalo entre el EC y el EI o de la conducta operante y su reforzador, tenía que ser del orden de milisegundos a segundos para que el aprendizaje asociativo ocurriera (Kimble, 1961). Sin embargo, los trabajos con el CAS demostraron que este aprendizaje podía resistir intervalos interestímulo (IIE) muy largos, incluso 50 min (por ej. McLaurin y Scarborough, 1963 y Garcia *et al.*, 1966), lo que evidentemente contravenía el principio de contigüidad. Esta resistencia a los IIE grandes se ha interpretado desde hace mucho, como resultado de presiones evolutivas por selección natural, que han favorecido notablemente el que los animales aprendan asociaciones entre su estado interno, con el gusto y el olfato. Además, los efectos de la ingesta de alimentos están retrasados de manera natural, por lo que la asociación efectiva gustativo-visceral necesita IIE largos² (Garcia *et al.*, 1964; Garcia *et al.*, 1966; Garcia y Koelling, 1966; Garcia y Ervin, 1968; Freeman y Riley, 2009).

A pesar de las interpretaciones evolutivas del CAS, durante mucho tiempo siguió siendo controvertido el que tuviera la capacidad de generar condicionamiento con IIE de varias horas, inclusive si se hacía una sola adquisición, por lo que se han propuesto varios modelos a lo largo del tiempo para explicar tal efecto (para una revisión ver Anexo I). Actualmente sigue sin ser explicada la asombrosa particularidad que tiene el CAS de resistir grandes IIE.

²Algo importante de mencionar, es que cuando el IIE es suficientemente largo en el CAS, el gusto -el estímulo propiamente- no está presente durante la asociación, entonces ¿qué es lo que se asocia? En 1990 Bures y Buresova propusieron que la asociación entre el EC y el EI requiere el almacenamiento del EC en la MCP, por lo que esta memoria podría entonces, ser asociada al EI y almacenarse en la MLP. Actualmente hay consenso de que esto es lo que ocurre.

3.5 El condicionamiento aversivo a los olores

En 1973 Hankins y cols. compararon el CAO orthonasal con el CAS variando el IIE (0, 10 y 30 min); encontraron que el olor aguantaba IIE de 0 y 10 min, en comparación, el gusto producía una mayor aversión aún con el IIE de 30 min, por lo que concluyeron que el sabor ejerce un control más fuerte y directo sobre la ingesta de los alimentos que el olor. Este resultado y los posteriores experimentos donde se observó que el CAS resiste IIE de varias horas (2-4 horas, por ej. Palmerino *et al.*, 1980 y Ferry *et al.*, 1996), mientras que con el CAO –orthonasal- no se puede obtener a menos que el IIE sea menor de 15 min (Ferry *et al.*, 1996), influyeron durante mucho tiempo las ideas e interpretaciones que se hicieron del CAO, ya que se empezó a afirmar, que los sabores son el estímulo crítico para la inducción de aversiones alimentarias, y que constituyen la señal fundamental para el sistema de defensa interno o visceral, regulando la participación del olfato en la alimentación, por lo que el papel de los olores en la formación de recuerdos hacia los alimentos sería secundario, como el resto de los sistemas sensoriales externos (García y Koelling, 1966; García *et al.*, 1974; García *et al.*, 1985; Chapuis *et al.*, 2007).

3.6 Potenciación de la aversión al olor por el sabor

La idea de la preponderancia del sabor sobre el olor, fue reforzada por el descubrimiento del fenómeno de “potenciación de la aversión al olor por el sabor” (PAOS) por Rusiniak y cols. (1979). Ellos encontraron que cuando la sacarina es mezclada con una solución odorante que contiene extracto de almendra (olor retronasal), la sacarina potencia el condicionamiento a la almendra -un año después Palmerino y cols. (1980) encontraron este fenómeno con presentación orthonasal del olor-. Por tanto, la PAOS volvería los olores tan eficaces como los sabores en la señalización del malestar (García y Rusiniak, 1980). A pesar de estos reportes, varios de los primeros investigadores que intentaron replicar este fenómeno fueron incapaces de hacerlo (por ej. Rosellini *et al.*, 1981; Bouton y Whiting, 1982; Mikulka *et al.*, 1982; Ida, 1984), y por el contrario, algunos encontraron que el sabor atenuaba o “ensombrecía” el CAO.

Posteriormente Bouton y cols. (1986), encontraron que el método utilizado en la presentación del olor, es importante en la determinación de la potenciación, ya que el olor orthonasal solo, produce una aversión débil, y presentado junto con la sacarina se potencia, mientras que el olor retronasal por si solo produce una aversión grande que es ensombrecida cuando se presenta junto con la sacarina (si el olor retronasal se presenta en una baja concentración no se presenta el

ensombrecimiento). Además, pensaron que aunque la presentación retronasal tiene cierta relevancia como señal para el envenenamiento, es incapaz de potenciar la aversión a un olor ortonasal, por lo que los olores y sabores tienen propiedades cualitativamente diferentes y las señales condicionadas débilmente son especialmente propensas a ser potenciadas en lugar de eclipsadas.

Una de las explicaciones para las diferencias entre el gusto y el olfato con grandes IIE, es que se creía –en realidad se sigue haciendo– que a diferencia del gusto, la memoria del estímulo olfativo no perdura lo suficiente como para asociarse con el EI (por ej. Ferry *et al.*, 1999 y Ferry *et al.*, 2007), y por tanto, la PAOS y otros fenómenos, permitirían que la duración de la memoria olfativa se prolongue y pueda de esta manera, ser asociada con el EI. Sin embargo, es importante señalar que las pruebas que se hicieron variando el IIE con el olfato -y con el gusto-, se hicieron considerando solamente la MLP, por lo que las interpretaciones de que los déficits en las memorias olfativas con grandes IIE se deben a una falla en la asociación entre los estímulos, no es del todo correcta como veremos más adelante.

3.7 Reconsideración del condicionamiento aversivo al olor

Desde el año de 1982 Rozin observó que el olfato es la única modalidad sensorial dual, ya que la misma estimulación olfativa, puede ser percibida y evaluada de dos maneras cualitativamente diferentes dependiendo de si se hace referencia al mundo exterior (presentación ortonasal), o a la boca (presentación retronasal). De hecho, la ilusión de que los olores retronasaes son percibidos como localizados en la boca es tan poderosa, que las personas rutinariamente confunden la olfacción retronasal con el gusto (Murphy *et al.*, 1977 y Rozin, 1982). Por tanto, la afirmación de que un olor es una señal menos eficaz para el malestar, podría ser la consecuencia de un sesgo metodológico, ya que en muchos experimentos, el estímulo olfativo es colocado a unos centímetros de la boquilla del bebedero (presentación ortonasal), pero de esta manera no es un atributo intrínseco de la solución consumida, como lo serían el gusto y la presentación retronasal del olor (Chapuis *et al.*, 2007).

En 1997 Slotnick y cols. reportaron que una solución odorífera sin propiedades gustativas³ (presentación retronasal) produjo CAO con un IIE de 4 h., por lo que el olor retronasal puede ser tan eficaz como un sabor con IIE largos. Más sorprendente aún, encontraron que cuando un sabor débil (sacarina 0.006 %) con el que no se puede producir aversión, era acompañado de un olor retronasal, el olor era capaz de potenciar la aversión al sabor. Estos descubrimientos claramente desafían la

idea de que el gusto es la señal fundamental para el sistema interno y que dirige el papel del olfato en la alimentación (por ej. Garcia *et al.*, 1985).

Otro estudio importante que desafió la idea de la importancia del sabor sobre el olor, fue el de Chapuis y cols. (2007). Ellos hicieron una comparación directa entre la presentación retronasal+ortonasal *vs* ortonasal y encontraron que al variar el IIE, la presentación retronasal+ortonasal soporta intervalos de hasta 120 minutos, comparado con los 5 minutos que resistió la ortonasal. Estos resultados junto con los de Slotnick y cols (1997), confirman la importancia de la ingestión del olor para el desarrollo de una aversión fuerte y estable que puede ser tan eficaz como la del gusto, y parecen corroborar la idea de que las presentaciones retronasal y ortonasal representan experiencias sensoriales cualitativamente distintas.

Después de que se estableció la importancia del olor en las aversiones alimenticias condicionadas, particularmente su presentación retronasal, se han realizado varios estudios para discernir las diferencias entre sus dos tipos de presentación, los cuales, han estado enfocados a cuestiones neuroanatómicas.

3.8 Diferencias anatómicas entre la olfacción ortonasal y retronasal

En el 2005 Small y cols. realizaron un estudio en humanos, encontraron que los olores retronasales fueron percibidos como provenientes de la cavidad oral, mientras que los ortonasales como procedentes de la punta de la nariz. Así mismo, por medio de resonancia magnética funcional, encontraron que la presentación retronasal *vs* ortonasal produjo actividad preferente en la base del surco central que corresponde a la región somatosensorial de la cavidad oral. Además, la presentación ortonasal produjo mayor activación diferencial en la ínsula dorsal, media y ventral anterior, en los opérculos frontales bilaterales, el tálamo, hipocampo derecho, corteza orbitofrontal caudal, y en la región anterior de la amígdala y de la corteza piriforme derecha. Mientras que en la vía retronasal fue en la región cingulada posterior y perigenual, y en la corteza orbitofrontal medial.

³ La solución utilizada fue acetato de amilo en solución acuosa [0.01 % v/v], que no produce aversión en ratas bulbectomizadas y entrenadas en un condicionamiento operante. Sin embargo, se debe considerar que no se ha replicado este experimento y que la bulbectomía no parece ser la técnica más adecuada para producir anosmia, ya que da lugar a una serie de cambios endocrinos, neuroquímicos, inmunológicos y del comportamiento (Barge y Edwards, 1976; Leonard y Tuite, 1981; Jancsár y Leonard, 1984; Lumia *et al.*, 1987; Lumia *et al.*, 1988; Lumia *et al.*, 1992).

Posteriormente Chapuis y cols. (2009) reportaron que después del CAO en ratas, la actividad oscilatoria en la banda de las frecuencias beta (15-40 Hz) se incrementó en los animales que presentaron una clara aversión. Este aumento fue selectivo de ciertas regiones según la presentación del olor usado durante la adquisición, por ejemplo, cuando el olor fue retronasal, la actividad se amplió en las áreas frontales correspondientes a las cortezas infralímbica e insular (zonas granular y agranular). Según estos autores, esto podrían explicar en parte el que con esta presentación se logre generar aversiones con IIE grandes. Interesantemente, cuando el olor perdió su propiedad como señal para los alimentos tóxicos después de la extinción, la respuesta beta regresó a los valores de precondicionamiento.

3.9 Reevaluación de los intervalos interestímulos y la olfacción ortonasal

Tovar-Díaz y cols. (2011) investigaron si el olor ortonasal y el malestar visceral se pueden asociar con IIE largos comparando las evocaciones a corto plazo (4h) con las de largo plazo (48h). Encontraron que en las pruebas de corto plazo, los grupos con un IIE de 5, 15, 30 y 60 min mostraron una clara aversión, dicho periodo es al menos tres veces mayor a lo considerado anteriormente para la asociación efectiva de la presentación ortonasal del olor. En contraste, la evaluación de la MLP mostró que sólo aquellos animales condicionados con un IIE de 5 y 15 min presentaron una aversión fuerte y leve respectivamente, mientras que con intervalos mayores no mostraron aversión. Los autores sugieren, que la ausencia de MLP cuando se usan IIE largos se debe a una consolidación deficiente, más que a un problema de asociación como se ha pensado, por lo que su hallazgo exige una reconsideración y reinterpretación de la hipótesis estándar sobre la fuerza de la huella de la memoria olfativa y su importancia relativa en el aprendizaje de la aversión condicionada a los alimentos (Tovar-Díaz *et al.*, 2011).

3.10 La facilitación de la consolidación por la evocación a corto plazo

En nuestro laboratorio, Tovar-Díaz (2011) reportó un fenómeno que describió como “facilitación de la consolidación por reactivación de la MCP”, como su nombre lo indica, consiste en que una memoria débil adquirida en condiciones subóptimas que no logra consolidarse, cuando es evocada a corto plazo, se favorece su estabilización y permanencia como una MLP (esquemática del fenómeno fig. 5).

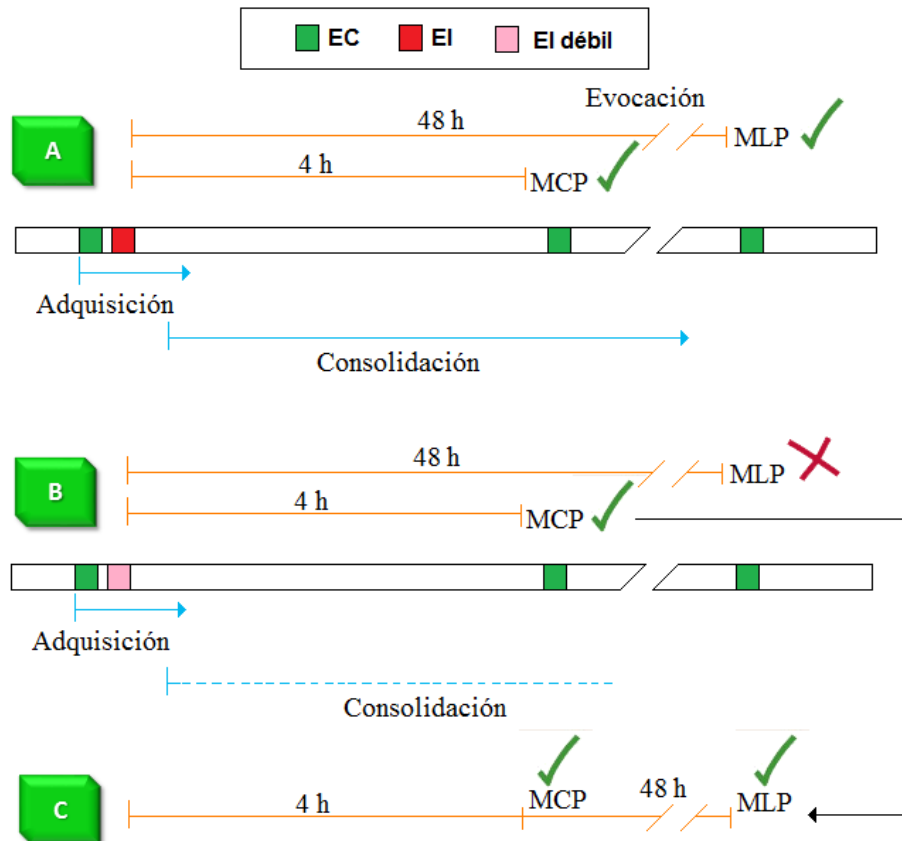


Figura 5. Fenómeno de facilitación de la consolidación por la reactivación a corto plazo. A) En condiciones óptimas de adquisición cuando se evocan grupos independientes a corto o largo plazo, la respuesta conductual que se obtiene es buena porque las etapas del aprendizaje transcurrieron sin ninguna afectación. B) Cuando las condiciones de adquisición son deficientes (por ej. por un EI débil), puede haber una buena evocación a corto plazo, pero en un grupo independiente una falta de evocación a largo plazo, esto se debe a que la adquisición se vio perturbada y esto afectó la posterior consolidación. C) Sin embargo, si el grupo que fue evocado a corto plazo se vuelve a evocar a largo plazo, puede presentar ahora una buena memoria porque la primera evocación (la reactivación) facilitó la consolidación.

Las condiciones de adquisición para generar el aprendizaje débil que puede ser facilitado, pueden ser producidas por la prolongación del IIE e inclusive por la administración previa de antagonistas colinérgicos como la escopolamina y la pirenzepina (fig. 6). Además, Sánchez (2010) siguiendo la misma línea de investigación, realizó un estudio diseñado para evaluar la existencia de MCP aversiva al olor orthonasal en otra forma de aprendizaje débil (disminuyendo el EI); Encontró el mismo fenómeno y reportó que la facilitación es dependiente del tiempo: mientras más alejada se realice la evocación de corto plazo de la adquisición, es proporcionalmente menor la MLP que se obtiene (fig. 7). Este fenómeno de facilitación de la consolidación en todos estos casos, no se explica como un evento de repetición del aprendizaje, que sería la forma más fácil de explicarlo o

interpretarlo, ya que el reentrenamiento en los aprendizajes asociativos incluye un nuevo apareamiento de los estímulos originales (Tovar-Díaz, 2011), y en este caso solo se requiere presentar el EC para evocar la MCP y obtener la facilitación. Además, generalmente la evocación de una memoria asociativa como estas, puede generar dos procesos opuestos; reconsolidación o extinción del aprendizaje (Bouton y Moody, 2004; Dudai y Eisenberg, 2004; De la Fuente *et al.*, 2011), sin embargo, este fenómeno no coincide con ninguna de estas opciones (Tovar-Díaz, 2011).

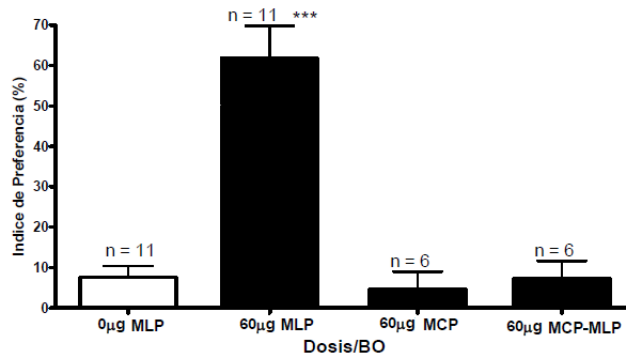


Figura 6. La evocación de la MCP facilita la consolidación de la MLP bajo condiciones de aprendizaje débil producido por la administración en el bulbo olfatorio de escopolamina [60 µg] previo a la adquisición. Nótese que al grupo que se le administro el antagonista y se probó a largo plazo no presenta aversión debido a una falla en la consolidación, mientras que si un grupo independiente en las mismas condiciones es evocado a corto plazo muestra una aversión muy grande, y si este último grupo vuelve a ser evocado a largo plazo, la aversión sigue presente, ya que la primera evocación facilitó su consolidación, $\bar{X} \pm EEM$. *** $p \leq 0.001$, en comparación con el grupo control 0 µg (Tovar-Díaz, 2011).

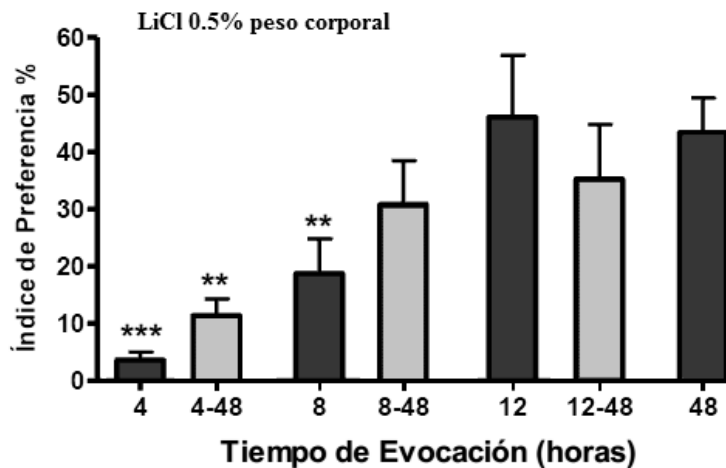


Figura 7. La facilitación de la consolidación es dependiente del tiempo. Como se puede observar, entre más alejada se dé la primera evocación de la adquisición de un aprendizaje subóptimo por LiCl bajo (barras oscuras), se presenta una mayor deficiencia en la memoria, esta deficiencia disminuye la facilitación de la consolidación que se alcanzara en la siguiente evocación (barras claras). $\bar{X} \pm EEM$. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ en comparación con el grupo 48 h (Sánchez, 2010).

Con base en lo anterior, las características generales del fenómeno de facilitación de la consolidación por reactivación de la MCP son:

- ❖ Solo se requiere la presentación del EC en la evocación de corto plazo para generar la facilitación.
- ❖ Las condiciones durante el aprendizaje deben ser tales, que se logre la asociación de los estímulos y se generen una buena MCP, pero una mala MLP debido a una falla en la consolidación.
- ❖ La facilitación es dependiente del tiempo, entre más alejada se dé la reactivación del condicionamiento, proporcionalmente es menor el grado de aprendizaje al evaluar la MLP.

A pesar de lo antes mencionado, la facilitación de la consolidación por la evocación a corto plazo es un fenómeno no documentado en la literatura especializada, y se desconocen los sistemas de neurotransmisión y el sustrato neurofuncional que participan en este.

3.11 Vía olfativa

La vía olfativa se pueden dividir en tres partes (Weismann *et al.*, 2001):

(1) Las moléculas odorantes se unen a los receptores olfativos de las neuronas olfativas sensitivas que se encuentran en el epitelio olfativo. A partir de ahí, los axones de estas neuronas (nervio olfativo) llegan a los glomérulos del bulbo olfatorio donde hacen sinapsis con las células mitrales y en penacho (Mori *et al.*, 1999; Shepherd *et al.*, 2004) (fig. 8). Desde un punto de vista evolutivo, el bulbo olfatorio no es un ganglio sino parte del telencéfalo, siendo una de las estructuras más antiguas del cerebro; por consiguiente, se ha postulado que constituye la verdadera corteza olfativa primaria (Cleland y Linster, 2003), lo cual contradice la literatura común (Albrecht y Wiesmann, 2009).

(2) El tracto olfativo, formado por los axones de las células mitrales y en penacho, conecta el bulbo olfatorio a las regiones olfativas secundarias que consisten en: el núcleo anterior olfativo, tubérculo olfatorio, corteza piriforme, partes de la amígdala (corteza periamigdalina, núcleos corticales anterior y posterior, núcleo del tracto olfativo lateral) y una pequeña parte anteriomedial de la

corteza entorrinal. Desde el reconocimiento del bulbo olfatorio como una estructura cortical, estas áreas se denominan corteza olfativa secundaria (Cleland y Linster, 2003).

(3) Las regiones que se sabe reciben proyecciones de la corteza olfativa secundaria incluyen: la corteza orbitofrontal, corteza insular agranular, subnúcleos adicionales de la amígdala, hipotálamo medial y lateral, tálamo medial, ganglios basales y el hipocampo. Estas regiones se denominan regiones olfativas terciarias (Albrecht y Wiesmann, 2009).

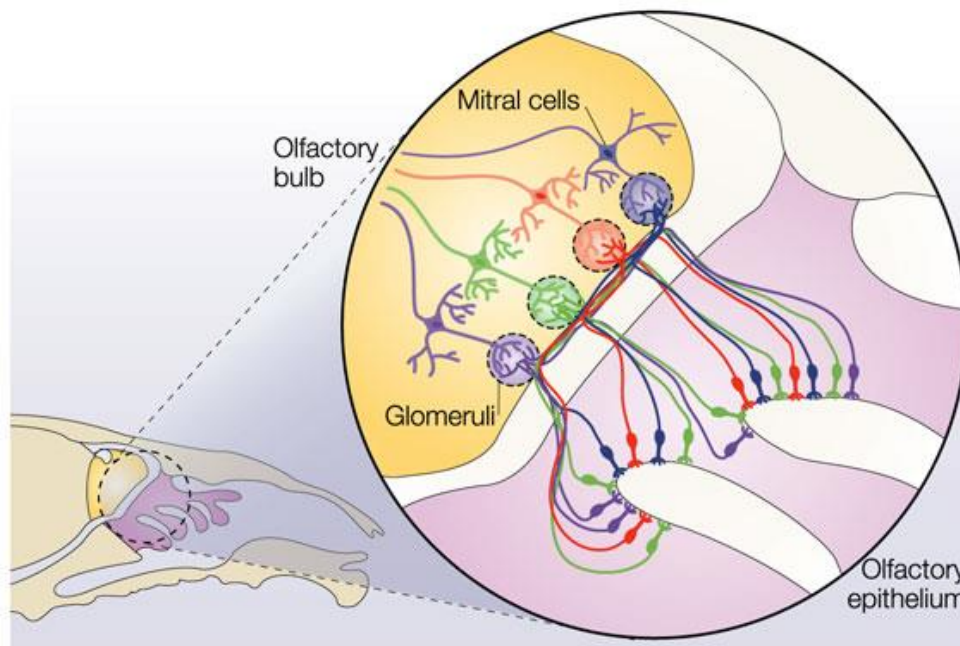


Figura 8. Inervación de los glomérulos del bulbo olfatorio por las neuronas olfativas sensitivas del epitelio olfativo, y su sinapsis con las células mitrales. Nótese que cada glomérulo es inervado únicamente por neuronas sensitivas con la misma proteína receptora olfativa representada con un color distinto (Dulac y Torello, 2003).

3.12 Vías de integración del condicionamiento aversivo al olor

Como se mencionó, el sistema olfativo principal procesa el estímulo olfativo, a partir de la transducción sensorial en el epitelio olfativo de la cavidad nasal; las neuronas olfativas primarias mandan sus axones a la capa glomerular del bulbo olfatorio principal, donde hacen sinapsis con las neuronas mitrales, que envían sus axones directamente al tubérculo olfativo, la corteza piriforme, corteza entorrinal y la amígdala (Isaacson, 2010). Por otro lado, la información del malestar gástrico inducido por LiCl es llevada por el nervio vago (par craneal X) al núcleo del tracto solitario y luego al núcleo parabraquial, el cual se conecta con la amígdala y otras estructuras (fig. 9). Debido a la convergencia de información olfativa y visceral en la amígdala, algunos creen que es donde ocurre

la asociación (Ferry y Di Scala, 1997). En este sentido, se cree que el valor hedónico de la memoria –acercamiento o evitación– involucra a la amígdala (Wilson y Sullivan, 1994; Rainekei *et al.*, 2009). Además, se han visualizado neuronas en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) que reciben información convergente del EC y el EI durante la adquisición del CAS (Barot *et al.*, 2008). También por medio de microdiálisis *in vivo* se ha visto que la administración de LiCl (EI) induce un aumento dramático en la liberación de glutamato en la amígdala (Miranda *et al.*, 2002). A pesar de esto, hay quienes creen que la amígdala participa principalmente en la neofobia hacia el EC, más que en la asociación de los estímulos (Reilly y Bornovalova, 2005), o que la amígdala desempeña una función moduladora en la formación de la memoria, facilitando su almacenaje en otras estructuras y no almacenándola propiamente (Wilson y Sullivan, 1994). Por lo tanto, existe la posibilidad de que otras áreas como el tálamo ventroposteromedial o el hipotálamo lateral sean las encargadas –también– de la asociación de los estímulos (Para una revisión de los estudios anatómicos del CAO ver Anexo II).

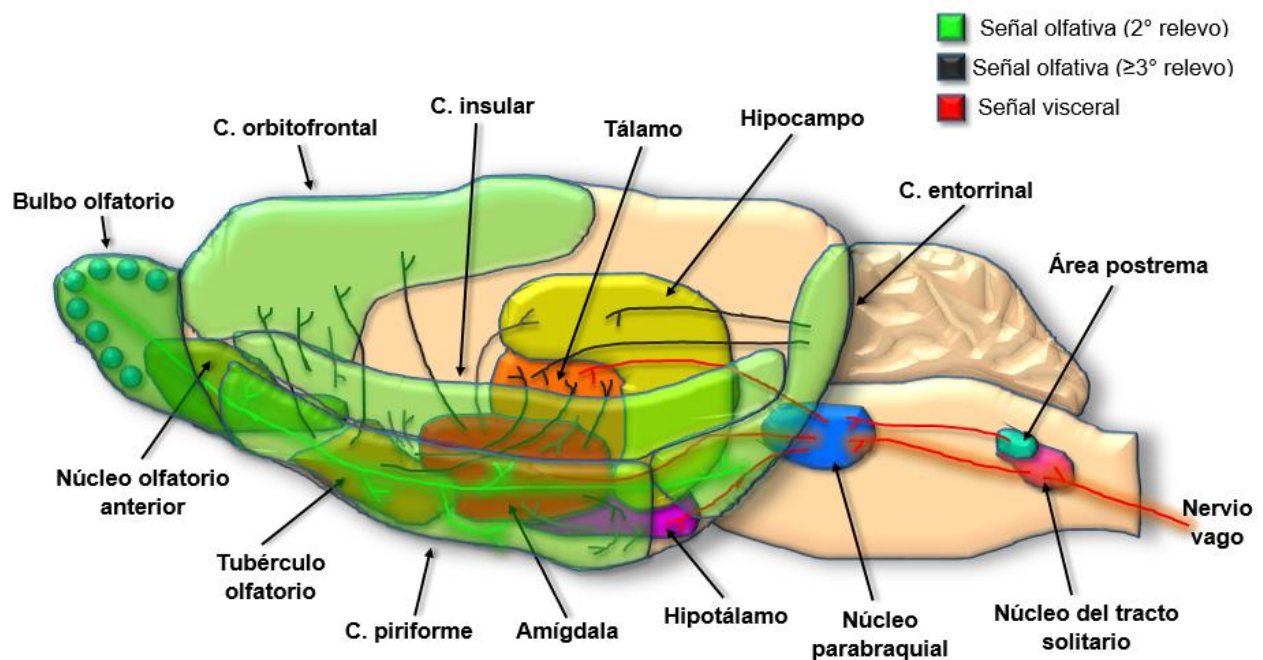


Figura 9. Vías de integración de la información olfativa y del malestar visceral producido por LiCl. Al estar expuestas a un olor, las neuronas sensitivas olfatorias activan sus sinapsis con las células mitrales en el bulbo olfatorio (corteza olfativa primaria), en unas estructuras conocidas como glomérulos. Las células mitrales inervan a las regiones olfativas secundarias, que a su vez mandan proyecciones hacia las regiones olfativas terciarias. Por otro lado, la información visceral es llevada por el nervio vago al núcleo del tracto solitario y posteriormente al núcleo parabraquial, el cual se conecta con el tálamo, el hipotálamo y la amígdala; es en esta última estructura donde se piensa que ocurre la asociación entre estos estímulos.

3.13 Glutamato y memoria

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante del sistema nervioso central de los mamíferos (Riedel *et al.*, 2003). Es liberado en las terminales presinápticas y activa tres clases principales de receptores ionotrópicos, estos tienen una arquitectura similar pero se diferencian por su farmacología y la homología de sus secuencias, estos son: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y kainato (McEntee y Crook, 1993; Riedel *et al.*, 2003; Chen y Wyllie, 2006). Además, el glutamato se une a una familia de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G llamados mGluRs (fig. 10). Mientras los receptores AMPA son muy importantes para la transmisión sináptica general *per se*, los receptores NMDA son considerados receptores clásicos para el aprendizaje y la memoria (Riedel *et al.*, 2003). Los receptores NMDA generan una corriente catiónica con una cinética muy lenta, conducen Na^+ y K^+ y son altamente permeables a iones Ca^{2+} que es el segundo mensajero más importante, en contraste, los otros receptores ionotrópicos de glutamato generalmente no permiten el flujo de este segundo mensajero (Nusser, 2000; Cull-Candy *et al.*, 2001; Kandell *et al.*, 2001; Riedel *et al.*, 2003; Chen y Wyllie, 2006; Traynelis *et al.*, 2010).

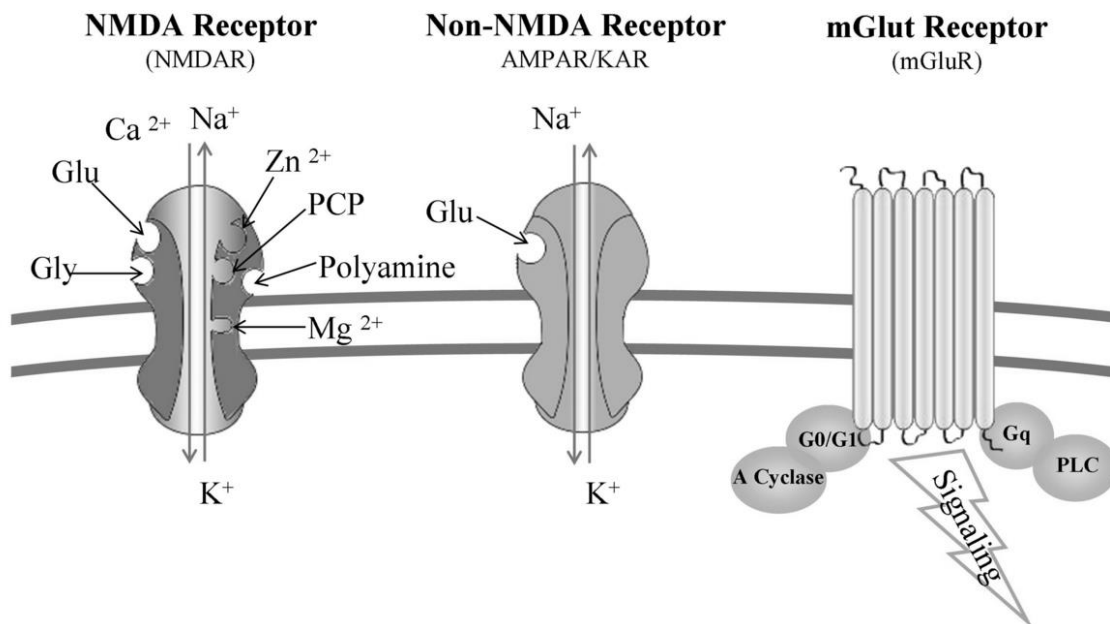


Figura 10. Tipos de receptores glutamatérgicos. Los receptores NMDA tienen sitio de unión a glutamato y a otra gran variedad de ligandos que regulan su función, forman canales permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Dentro de los receptores no NMDA están los de Kainato y AMPA, estos interactúan únicamente con el glutamato y sus agonistas específicos, y son más permeables al Na^+ y K^+ que al Ca^{2+} . Los mGluRs son receptores a glutamato acoplados a proteínas G y desencadenan cascadas de segundos mensajeros (Kritis *et al.*, 2015).

Se conocen al menos diez subunidades de los receptores NMDA: ocho GluN1 (1a a 4a y 1b a 4b), cuatro GluN2 (A-D) y dos GluN3 (A y B) (Köhr, 2006; Traynelis *et al.*, 2010; Paoletti, 2011). Estas subunidades funcionan en ensamblajes heterotetraméricos, y dado su gran repertorio existen varias combinaciones que dan lugar a una multitud de receptores NMDA distintos (Paoletti, 2011). Se considera que los receptores NMDA funcionales, requieren el montaje de dos subunidades GluN1 (que proporcionan los sitios de unión a la glicina), que pueden estar junto con dos subunidades GluN2 (con sitios de unión al glutamato) o con una combinación de GluN2 y GluN3 (Schorge y Colquhoun, 2003; Furukawa *et al.* 2005; Ulbrich y Isaacoff, 2008). Además, la subunidad GluN2 determinan según su tipo, otras propiedades como: la sensibilidad al Zn^{2+} , H^+ y poliaminas, probabilidad de apertura del canal, tiempo de desactivación, conductancia e interacciones con moléculas de señalización intracelular entre otras (Dingledine *et al.*, 1999; Sheng y Kim, 2002; Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Paoletti, 2011).

Para la activación de los receptores NMDA se requiere la unión tanto del glutamato como de la glicina como coagonista. Bajo el potencial de membrana en reposo, los iones Mg^{2+} se unen al canal bloqueando el flujo de cationes; se requiere una despolarización de la membrana para liberar el Mg^{2+} permitiendo el flujo de iones (Novak *et al.*, 1994). Debido a esto, se dice que estos receptores son detectores de coincidencia, ya que permiten el flujo de iones solo cuando son excitadas al mismo tiempo la célula presináptica y la postsináptica (Kohr, 2006). Esta característica es la que les confiere propiedades para ser considerados los más importantes inductores de plasticidad sináptica, ya que regulan cambios funcionales y morfológicos en la sinapsis, lo cual puede relacionarse con los mecanismos celulares de la formación y consolidación de la memoria (Balderas *et al.*, 2004).

Numerosas investigaciones han sugerido que los receptores NMDA juegan un papel en los procesos de aprendizaje y memoria (McEntee y Crook, 1993). Muchas de estas investigaciones están relacionadas con su capacidad para inducir potenciación a largo plazo (McEntee y Crook, 1993): un fenómeno celular de plasticidad neuronal (Bliss y Lomo, 1973), que se ha propuesto como un modelo electrofisiológico para el almacenamiento de la información (Morris *et al.*, 1986). Por ejemplo, en el hipocampo (Robinson y Reed, 1992) y en la amígdala (Liang *et al.*, 1994) se requiere la activación de estos receptores para que la potenciación se presente. Además, existe amplia evidencia de que el MK-801 un antagonista no competitivo de los receptores NMDA afecta la adquisición y la memoria en una amplia gama de tareas de comportamiento como evitación pasiva y activa, aprendizaje espacial (Riedel *et al.*, 2003) y aprendizaje asociativo (Hatfield y Gallagher,

1995; Ferry y DiScala, 2000; Riedel *et al.*, 2003) y dentro de este último, se ha reportado que el condicionamiento clásico o pavloviano requiere la activación de los receptores NMDA en la amígdala, la cual es clave en el aprendizaje del miedo (Lavond *et al.*, 1993; Davis, 1994; LeDoux, 1994; Maren y Fanselow, 1996) y la modulación de la memoria (McGaugh y Introini-Collison, 1987).

Sobre los aprendizajes toxicofóbicos, los receptores NMDA se han asociado a la adquisición y consolidación del CAS (Gutiérrez *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2002), y en lo concerniente al CAO, se ha observado que varias regiones del cerebro relacionadas con la olfacción, son especialmente ricas en receptores NMDA, particularmente la corteza olfativa primaria, núcleo olfatorio anterior, tubérculos olfatorios, bulbo olfatorio, además, en núcleos específicos de la amígdala y en el hipocampo se encuentra una alta concentración de estos receptores (Monaghan y Cotman, 1985). En nuestro laboratorio se ha estudiado la participación de los receptores NMDA en el CAO ortonasal mediante administraciones sistémicas de MK-801, encontrándose que su administración previa a la adquisición produjo amnesia, este efecto también se presentó cuando la administración se hizo inmediatamente después del EI, por lo que también participan en la consolidación (Sólis, 2003), esto mismo ocurre cuando este fármaco se administra directamente en el bulbo olfatorio (Quiroz, 2006). Además, se ha reportado la participación de los receptores NMDA utilizando la PAOS, por ejemplo Robinson y cols. (1989) realizaron administraciones sistémicas de MK-801, encontraron que su administración 20 min antes del entrenamiento afecta el CAO potenciado evaluado tres días después, mientras que la aversión al sabor no se vio alterada. Como la administración sistémica de MK-801 deteriora la adquisición de la PAOS y del laberinto acuático de Morris (aprendizaje espacial), y ambos dependen de la integridad del hipocampo, los autores de este trabajo sugirieron que la administración sistémica de MK-801 imita las lesiones en esta estructura, sin embargo otros han interpretado los déficits encontrados por la administración sistémica de antagonistas a NMDA por sus efectos sobre la BLA (Willner *et al.*, 1992) o sobre regiones corticales (Traverso *et al.*, 2003).

También se han realizado administraciones intraventriculares de APV (un antagonista competitivo de los receptores NMDA), en las que se encontró un déficit en el CAO potenciado pero no en el CAS cuando la administración fue 5 min antes de la adquisición (Willner *et al.*, 1992), además las administraciones intracerebrales de este antagonista en la BLA antes de la adquisición del TPOA, producen el mismo efecto (Hatfield y Gallagher, 1995). Estos experimentos han sido replicados y ampliados por Ferry y Di Scala (2000), quienes encontraron que la administración de APV

inmediatamente después de la presentación del olor-sabor no afecta el CAO potenciado, lo que sugiere que los receptores de NMDA en la BLA, están involucrados en la formación de la huella de memoria olfativa potenciada por el sabor durante un intervalo de tiempo crítico que cubre la presentación del EC, pero no se extiende después de que el EC ha sido procesado. En contraste con esto, Traverso y cols. (2003) usando MK-801, encontraron que los receptores NMDA están involucrados en el procesamiento y consolidación del EC, ya que la administración inmediatamente después de la primera exposición a un gusto, abolió la inhibición latente.

En conjunto, la gran cantidad de evidencias con las que se cuentan, ponen a los receptores NMDA en el centro del proceso de aprendizaje, y a pesar de algunas discrepancias, de manera general se observa amnesia cuando los receptores NMDA se bloquean durante el entrenamiento, lo que claramente indica que tienen un papel crucial en la adquisición de la memoria (Riedel *et al.*, 2003), mientras que otras evidencias muestran su participación en la consolidación (Ferreira *et al.*, 2002). En contraste, parecen tener poca importancia durante la evocación (Martin *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2002; Riedel *et al.*, 2003).

4. JUSTIFICACIÓN

Se acepta comúnmente que durante el proceso de consolidación, la memoria es susceptible a diversas manipulaciones que pueden deteriorarla, sin embargo, también existen manipulaciones o condiciones que durante dicho proceso pueden favorecer su reforzamiento. El fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo corresponde a esta última situación, ya que bajo ciertas circunstancias permite que una memoria que no llegaría a ser consolidada lo consiga. A pesar de esto, es un fenómeno poco estudiado, por lo que se desconocen los mecanismos neurales que participan en él. En vista de que el sistema glutamatérgico es clave para el aprendizaje y la consolidación del CAO, analizaremos si este fenómeno depende de los receptores NMDA.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las condiciones de adquisición para generar la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo en la memoria olfativa retronasal y ver la contribución de los receptores NMDA en éste fenómeno.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar las condiciones del EC, EI y el IIE para generar un aprendizaje subóptimo que pueda ser facilitado por reactivación, utilizando la presentación retronasal.
- 2) Estudiar la participación de los receptores NMDA mediante la administración sistémica de MK-801 antes y después de la reactivación.

7. HIPÓTESIS

- 1) La evocación de corto plazo de una memoria olfativa retronasal generada bajo condiciones subóptimas de adquisición, facilita su consolidación formando una memoria de largo plazo.
- 2) El bloqueo de los receptores NMDA inhibe la facilitación de la consolidación por evocación de corto plazo de la memoria olfativa retronasal.

8. METODOLOGÍA

8.1 Dispositivo de experimentación

Consiste en una caja de acrílico rectangular de 50x40x18.5 cm con una cama de aserrín. El líquido, agua simple y/o solución de acetato de isoamilo⁴ (AI) se colocó en cuatro bebederos graduados con capacidad de 10 ml c/u dispuestos cerca de cada una de las esquinas por medio de placas de acrílico, encontrándose a una altura de 7 cm y separados de la pared trasera por 1.5 cm (fig. 11).

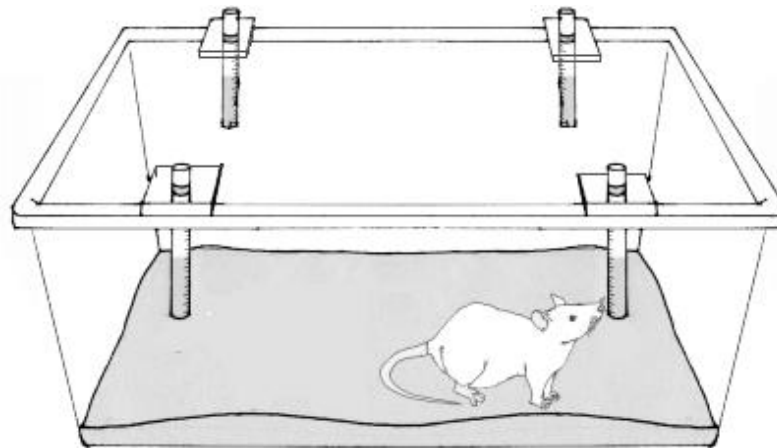


Figura 11. Dispositivo de experimentación. Consistió en una caja de acrílico transparente con cuatro bebederos de 10 ml c/u cerca de las esquinas.

8.2 Sujetos experimentales

Ratas Wistar macho de 200 a 250 g mantenidas en condiciones estándar con un ciclo de luz y oscuridad de 12h (luz de 8 am a 8 pm) con alimento *ad libitum* y con agua racionada mientras duraba el experimento. El número de animales vario dependiendo del experimento, por lo que se especificara posteriormente.

⁴ Slotnick y cols. (1997) reportaron que esta solución a una concentración de 0.01 % (v/v) no presenta componente gustativo.

8.3 Protocolo experimental

Se utilizaron ratas privadas de agua 24 h antes del experimento en una habitación separada del bioterio (día 0). Cada experimento tenía una duración de 5 días y consistieron en varias etapas que iniciaban con la habituación: durante los dos primeros días se colocaba a las ratas en la caja de experimentación por 10 min, tiempo en el que podían consumir agua de los bebederos (10 ml/bebedero). Al día siguiente (día 3) se realizaba la adquisición, que tenía una duración de cinco minutos; en esta se expuso a las ratas a un olor retronasal al beber 4 ml (1 ml/bebedero) de una solución de AI cuya concentración variaba según el experimento (generalmente fueron menores a 5×10^{-3} , concentración menor a la que se considera tiene solo componente olfativo). Si no se variaba el IIE, inmediatamente después se les administró LiCl 0.15M intraperitoneal como inductor de malestar visceral (la cantidad varió según el experimento; como referencia una cantidad igual en ml al 2 % del peso corporal se considera un EI óptimo). Cuatro horas después de la adquisición, se realizó una evocación/reactivación de la MCP en los grupos en los que se quería facilitar la memoria (suponemos que se trata de una memoria de corto plazo o plazo intermedio); durante ésta, se puso a beber a las ratas en la caja de prueba donde dos bebederos en esquinas opuestas contenían la solución de AI y los otros dos bebederos contenían agua simple (10 ml/ bebedero), esta prueba tuvo una duración de 10 min. Durante el cuarto día (recuperación) se les permitió beber agua como en los dos primeros días del protocolo. Finalmente, el quinto día se realizó la prueba de evocación de la MLP (48 h después de la adquisición), ésta fue similar a la evocación de la MCP del día tres pero con la posición de los bebederos invertida (fig. 12).

Como se mencionó en los objetivos, se realizaron algunos experimentos con la administración sistémica (intraperitoneal) de MK-801 (un antagonista no competitivo de los receptores a NMDA) antes o después de la evocación a corto plazo -la reactivación- (para una descripción breve del fármaco ver Anexo III). El momento de la administración de este antagonista y las concentraciones utilizadas se especificarán más adelante.

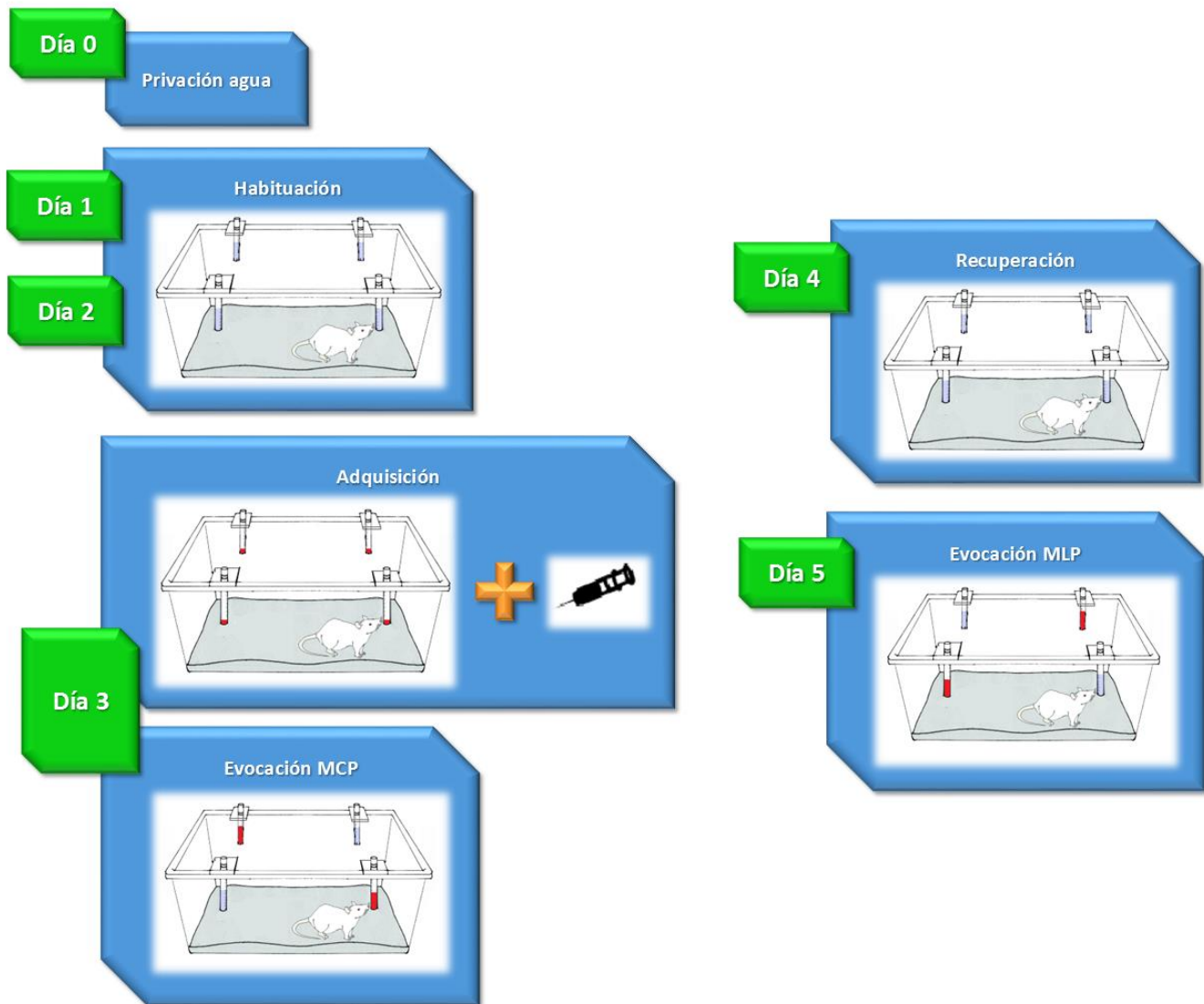


Figura 12. Protocolo experimental del CAO utilizado en este trabajo. En el día 0 las ratas fueron privadas de agua, en los días 1 y 2 se habituaron a la caja de experimentación y a los bebederos. En el día 3 se realizó la adquisición con AI como EC seguido de una inyección de LiCl como EI, los grupos que se iban a facilitar se evocaron 4 h después de la adquisición ese mismo día. El día 4 se dejó recuperar a los animales, y finalmente el día 5 se hizo la evocación de largo plazo de los grupos control y facilitados.

8.4 Obtención y análisis de los datos

Todos los días se registró el peso de los animales y el líquido consumido, con los consumos obtenidos durante las evocaciones se calculó el índice de preferencia (IP) para cada sujeto experimental, el cual consiste en el porcentaje del consumo de la solución de AI (EC) con respecto al total de líquido que consumió durante la prueba. El IP tiene valores de 0 a 100 y se usa como indicador de la memoria aversiva; los valores cercanos a cero reflejan que consumió una nula o pequeña cantidad del EC y se consideran como buena memoria, mientras que valores cercanos a 50 indican un consumo similar de ambas soluciones lo que indica falta de memoria aversiva.

Los análisis estadísticos y las gráficas fueron realizados con el paquete estadístico Graphpad Prism 6®. Cuando se compararon dos grupos, se realizó una prueba de t no pareada de dos colas, mientras que cuando eran más grupos fue un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni múltiple o comparando contra un grupo control, se consideró significativa una $\alpha \leq 0.05$. Los datos reportados son las medias \pm error estándar de la media de los IP de cada uno de los grupos. El número de animales utilizados se especifica en los pies de figuras de las gráficas cuando son iguales, o arriba de cada barra cuando son distintos. Así mismo, arriba de cada gráfica de resultados se muestra un esquema del protocolo utilizado para ese experimento (ejem. fig. 13).

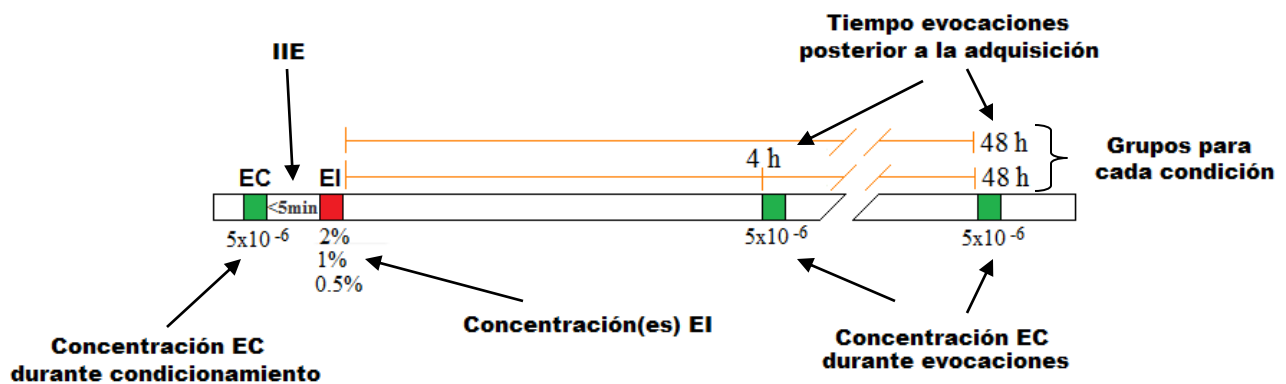


Figura 13. Ejemplo del esquema de un protocolo experimental con la diferente información que contiene.

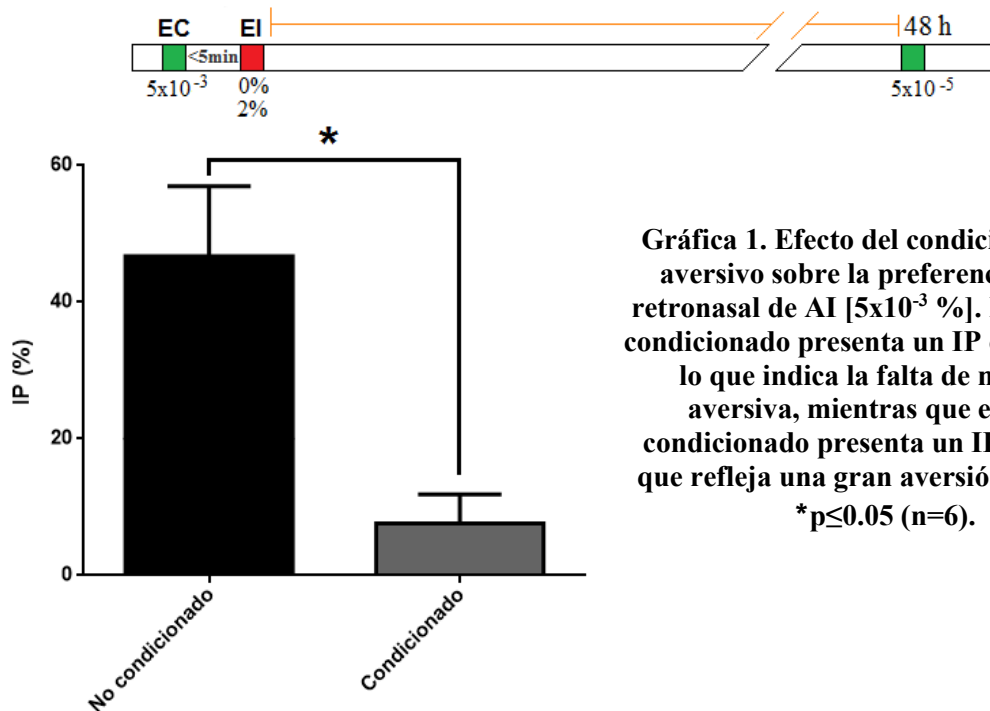
9. RESULTADOS

9.1 Efecto del condicionamiento aversivo al olor sobre la preferencia al acetato de isoamilo por vía retronasal

Se expuso a dos grupos de ratas a una solución de AI [5×10^{-5}], que fue seguida en uno de los grupos (grupo condicionado) de la inyección de LiCl ip. (0.15 M 2 % peso corporal), al segundo grupo no se le administró (grupo no condicionado).

Como se puede observar en la gráfica 1, el grupo no condicionado al que después de la presentación de la solución de AI [5×10^{-3}] no se le administró LiCl, presenta un IP cercano a 50 ya que los consumos de agua simple y agua odorizada fueron muy parecidos, por lo que no existe preferencia o aversión innata a la concentración utilizada, esto hace al AI un buen EC. Por el contrario, el grupo condicionado aversivamente (con LiCl ip. 0.15 M 2 % peso corporal) disminuyó el consumo de líquido odorizado, esto se refleja con un IP bajo (<10) que indica un aprendizaje óptimo (se encontraron diferencias significativas entre los grupos $p \leq 0.05$).

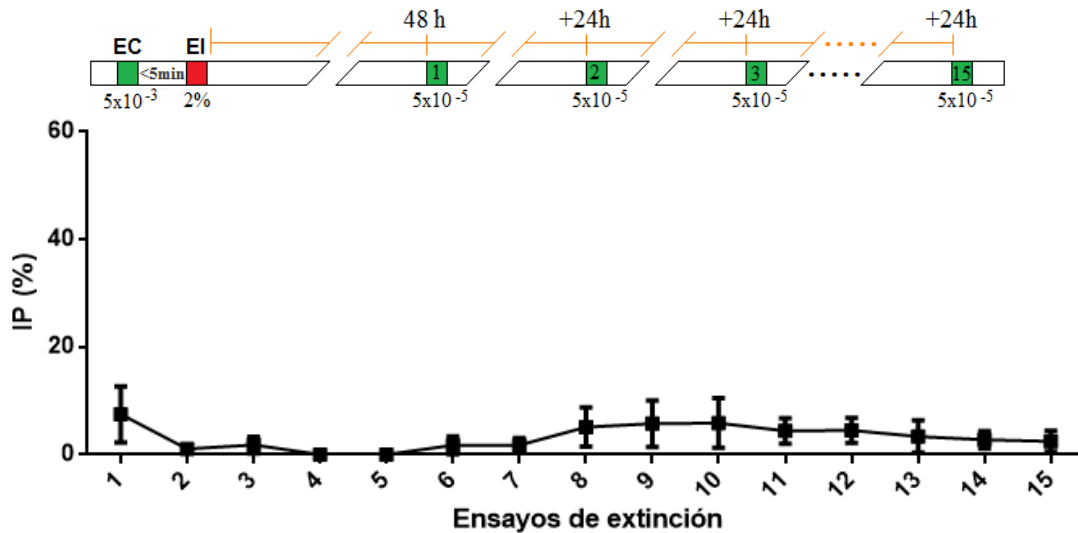
Se debe hacer notar que la concentración utilizada del EC en esta prueba fue equivalente a 0.05 veces la utilizada en otros trabajos y que se ha reportado no presenta componente gustativo (Slotnick *et al.*, 1997).



Gráfica 1. Efecto del condicionamiento aversivo sobre la preferencia al olor retronasal de AI [5×10^{-3} %]. El grupo no condicionado presenta un IP cercano a 50 lo que indica la falta de memoria aversiva, mientras que el grupo condicionado presenta un IP muy bajo que refleja una gran aversión. $\bar{X} \pm EEM$. * $p \leq 0.05$ (n=6).

9.2 Ensayos de extinción de la aversión al acetato de isoamilo retronasal mediante evocaciones con opción

En las condiciones de la prueba anterior, se evaluó la resistencia del CAO al AI retronasal mediante evocaciones consecutivas con opción durante 15 días, estas evocaciones pueden ser consideradas como ensayos de extinción (el consumo del AI no fue forzado). Como se puede ver en la gráfica 2, las numerosas evocaciones no afectaron la aversión al AI, ya que sigue siendo idéntica aun después de 15 ensayos, por lo que la olfacción retronasal en las condiciones utilizadas no extingue espontáneamente.



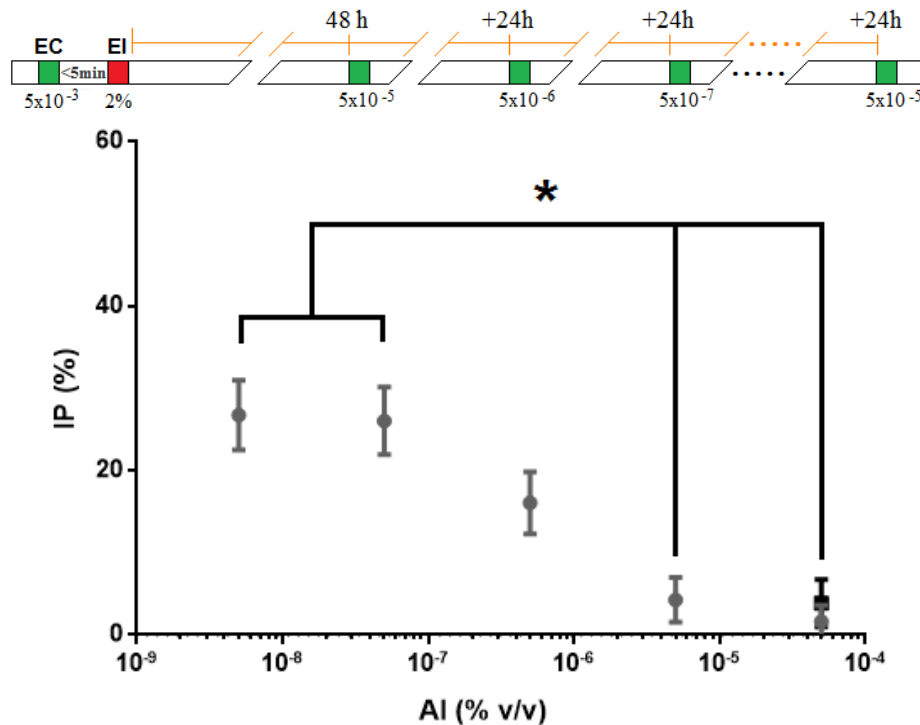
Gráfica 2. Ensayos consecutivos de extinción/evocación con opción del CAO retronasal a AI [5×10^{-3} %]. Como se puede ver, la aversión hacia el AI retronasal se mantiene aun después de 15 evocaciones. $\bar{X} \pm \text{EEM}$, sin diferencias significativas ($n=5$).

9.3 Umbral olfativo para el acetato de isoamilo por vía retronasal

Para evaluar el umbral olfativo mediante la evocación de una memoria aversiva, se condicionó “óptimamente” a un grupo de ratas en las mismas condiciones que en los dos experimentos previos. Estas fueron probadas en días consecutivos con cinco concentraciones decrecientes de AI y en el sexto día se volvió a evocar con la concentración más alta (la del día uno) para comprobar que no hubo extinción del aprendizaje durante las evocaciones.

Se encontró un efecto dependiendo de la concentración de AI, disminuyendo el reconocimiento de este odorante y por tanto aumentando el IP mientras menor fue la concentración del odorante utilizado durante la evocación. Las concentraciones a las que se encontró un mejor reconocimiento ($\text{IP} < 10$) fueron las de 5×10^{-5} y 5×10^{-6} (diferencias significativas con las dos concentraciones más

altas $p \leq 0.05$). Además, en la sexta evocación (cuadrado negro), se comprobó que el decremento de la respuesta no se debió a la extinción del aprendizaje, ya que no se encontraron diferencias significativas con la evocación del primer día (gráfica 3).



Gráfica 3. Preferencias obtenidas al evocar con concentraciones decrecientes de AI por vía retronasal; en negro la evocación del último día. Se observa una respuesta directamente proporcional a la concentración del AI; entre menor es esta, menor reconocimiento y por tanto menor IP. El eje x esta en escala logarítmica ya que las concentraciones probadas cubren una amplia gama de valores. $\bar{X} \pm EEM$. * $p \leq 0.05$ (n=10).

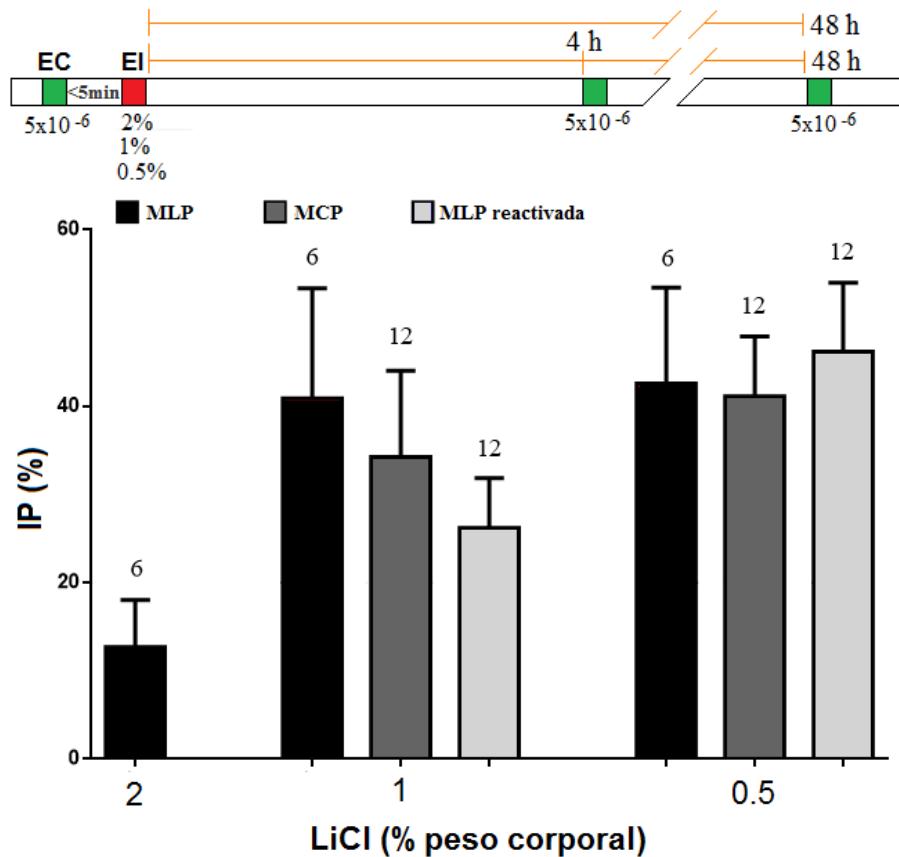
9.4 Variación de los parámetros de adquisición con olfacción retronasal para encontrar las mejores condiciones en que se presenta el fenómeno de facilitación de la consolidación

9.4.1 Estímulos condicionado e incondicionado:

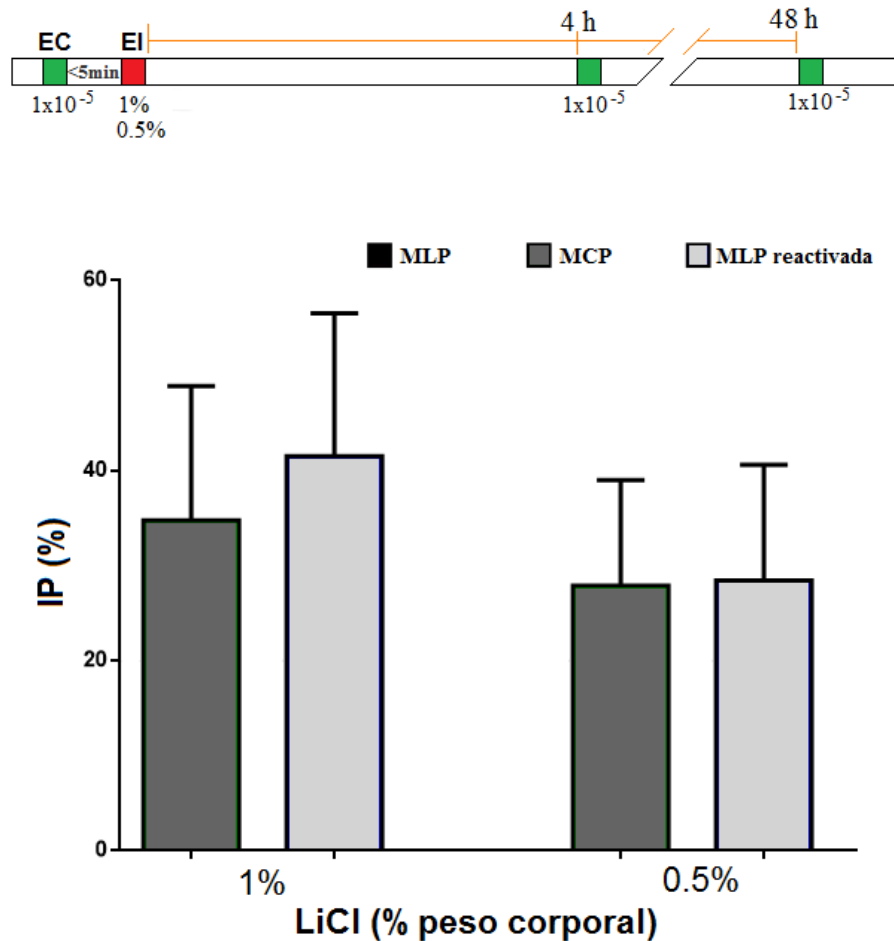
Se variaron las concentraciones del AI (EC) y el LiCl (EI) para encontrar las mejores condiciones en las que se presenta el fenómeno de facilitación de la consolidación. Para las variaciones del EC se usaron concentraciones de AI comprendidas entre 5×10^{-6} y 1×10^{-4} durante la adquisición y las evocaciones; estas concentraciones incluyen aquellas con las que se obtuvo una mejor evocación en el experimento anterior. En cuanto a la variación del EI se probaron dosis de LiCl (0.15 M) del 2 al 0.125 % del peso corporal dependiendo de la concentración de AI utilizada. Por otro lado, algunas evocaciones a largo o corto plazo no fueron realizadas porque a partir de las evocaciones hechas se

podía inferir que no se encontraría el fenómeno buscado, ya sea porque la MLP era buena y por tanto no se podría facilitar de una manera obvia, o porque la MCP era muy mala y por tanto la reactivación no sería suficiente para facilitar su consolidación a largo plazo.

Como se ve en la gráfica 4, con la menor concentración de AI utilizada de 5×10^{-6} , tanto con 0.5 y 1 % de LiCl no se encontró buena memoria en las evocaciones de largo plazo, ni en las de corto, por lo que la memoria a pesar de esta reactivación de corto plazo no pudo ser facilitada. En contraste el grupo condicionado con 2 % de LiCl y evocado a largo plazo mostró buena memoria. Por lo anterior decidimos incrementar el AI a 1×10^{-5} . Se realizaron evocaciones a corto plazo -la reactivación-, pero estas y las posteriores evocaciones a largo plazo siguieron siendo deficientes, por lo que no se realizaron los grupos evocados solo a largo plazo con estos parámetros (gráfica 5).

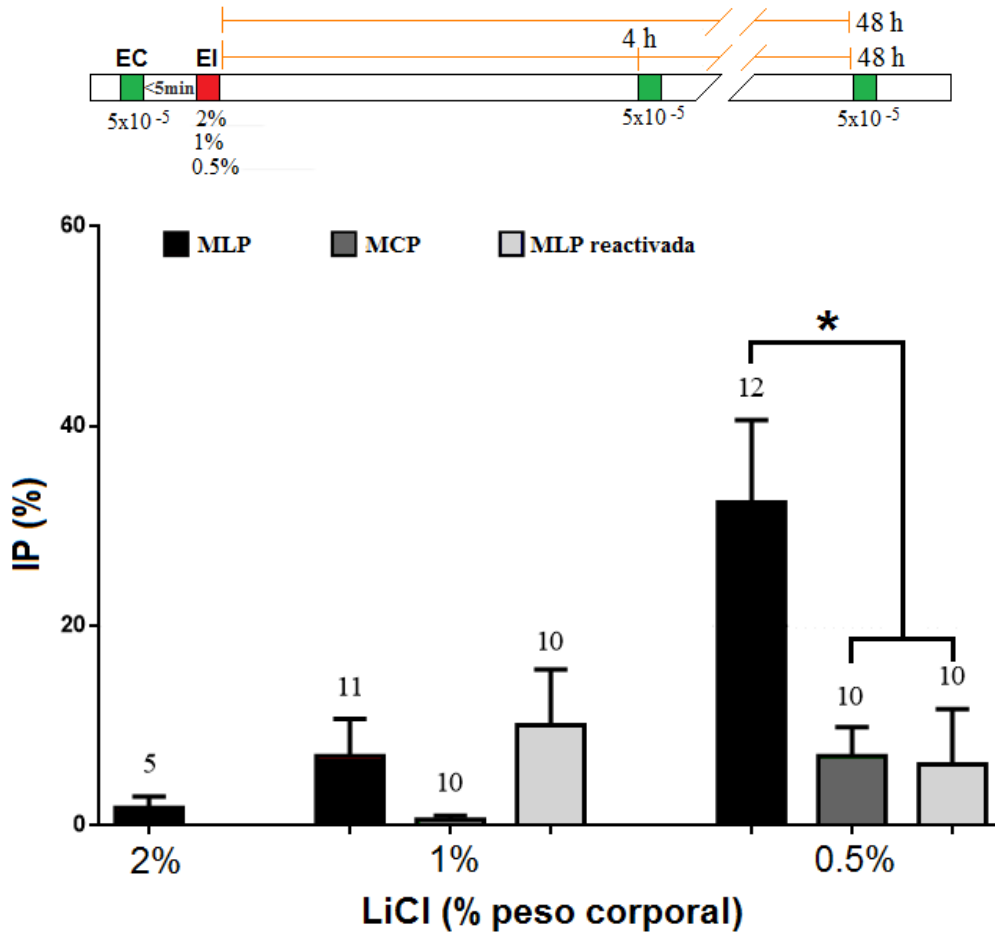


Gráfica 4. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 5×10^{-6} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h. Con ninguna de las condiciones se presentó el fenómeno de facilitación. $\bar{X} \pm EEM$, sin diferencias significativas.



Gráfica 5. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 1×10^{-5} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h. Con ninguna de las condiciones se presentó el fenómeno de facilitación. $\bar{X} \pm \text{EEM}$, sin diferencias significativas ($n=6$).

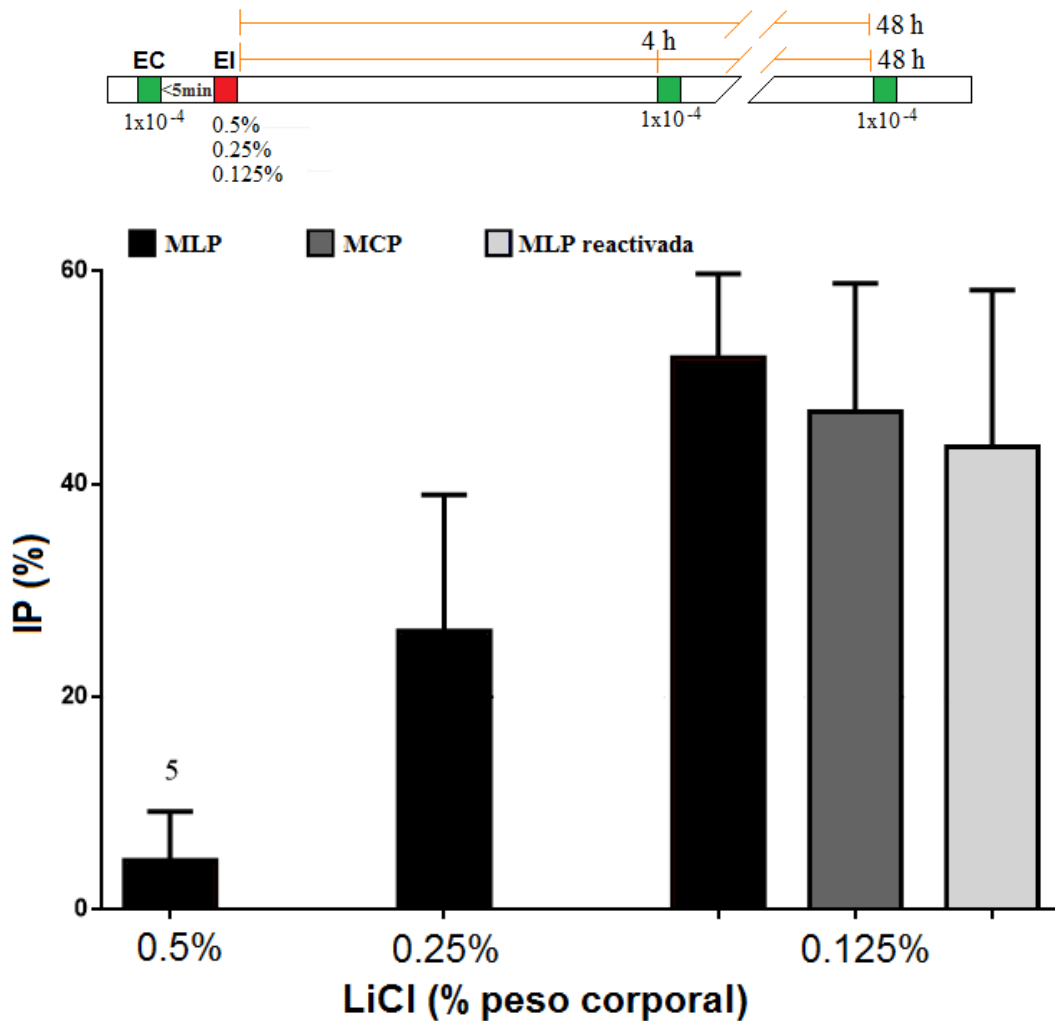
Cuando se utilizó AI en una concentración de 5×10^{-5} y 1 % de LiCl se obtuvo una MLP muy buena por lo que ésta no se facilitó. Además, cuando se disminuyó la concentración de LiCl a 0.5 % se encontró mala MLP, sin embargo, hubo buena MCP en un grupo independiente y este mismo grupo reactivado siguió presentando buena MLP 48h después del condicionamiento, obteniéndose diferencias significativas con el grupo sin reactivar ($p \leq 0.05$), por lo que **con estas condiciones se encontró la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo** (gráfica 6).



Gráfica 6. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 5×10^{-5} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h. Con la condición de LiCl 0.5 % se presentó el fenómeno de facilitación de la consolidación. $\bar{X} \pm \text{EEM}$. * $p \leq 0.05$.

Finalmente se incrementó la concentración de AI a 1×10^{-4} , para ver si con estas condiciones también era posible encontrar el fenómeno de facilitación. Como esta concentración fue la mayor de las ensayadas y se encontró buena MLP con 0.5 % de LiCl, se redujo la cantidad de LiCl a 0.25 y 0.125 %. Con la primera concentración se encontró una MLP relativamente buena que difícilmente sería facilitada, por lo que no se hicieron los demás grupos. Con la concentración de 0.125 % de LiCl no se encontró el fenómeno de facilitación porque no hubo MLP ni MCP (gráfica 7).

En resumen, de todas las condiciones estudiadas variando el EC y el EI, solo en la que el EC fue AI 5×10^{-5} por vía retronasal, con 0.5 % de LiCl como EI se presentó el fenómeno buscado; la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo.

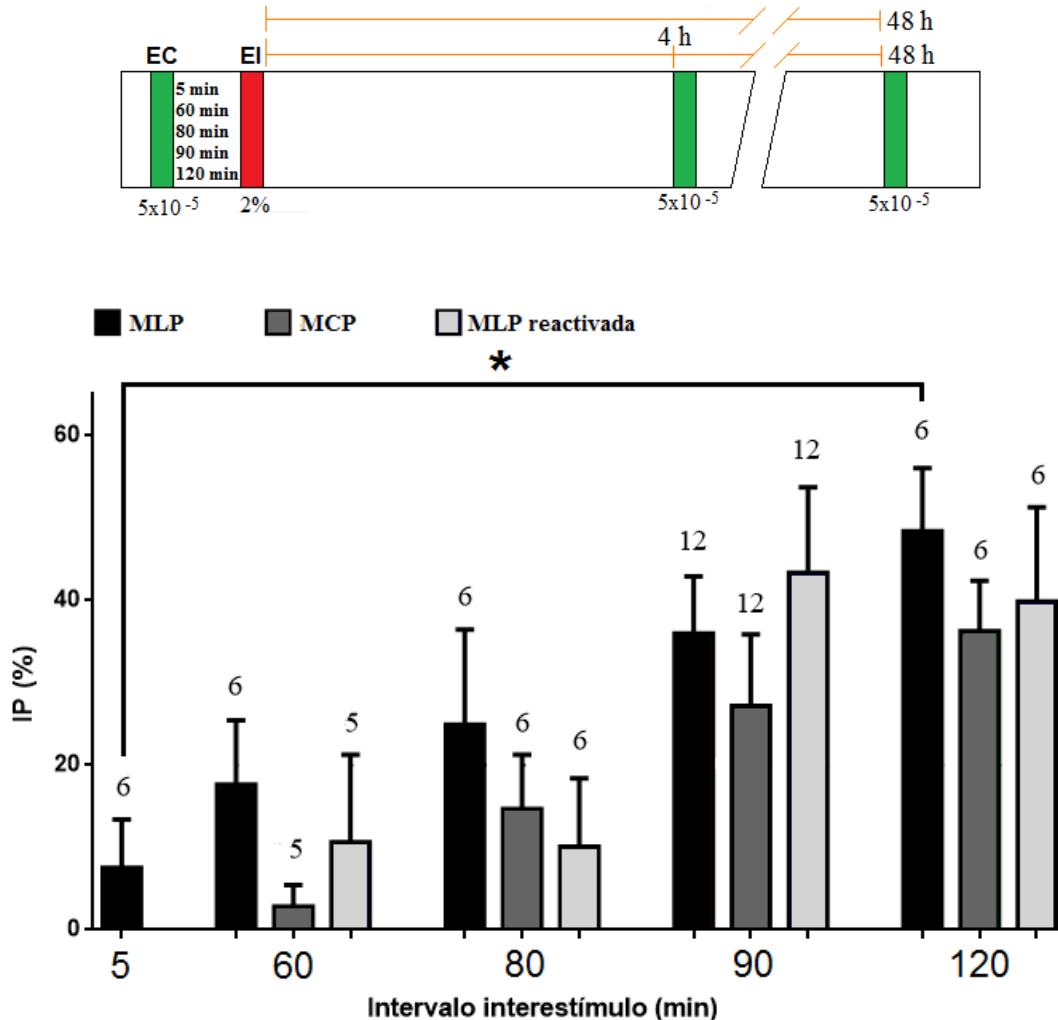


Gráfica 7. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 1×10^{-4} % y una concentración variable de LiCl a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h. Con ninguna de las condiciones se presentó el fenómeno de facilitación. $\bar{X} \pm EEM$, sin diferencias significativas (n=6).

9.4.2 Intervalo interestímulo:

Como se ha mencionado antes, además de disminuir el EC y el EI, otra forma de generar un aprendizaje deficiente a largo plazo es aumentando el tiempo entre estos estímulos, por lo que se probaron en grupos independientes IIE crecientes de 60, 80, 90 y 120 min, utilizando AI al 5×10^{-5} % por vía retronasal (esta concentración es equivalente a 0.05 veces lo usado previamente en otros estudios) y LiCl al 2 %. Dichos estímulos con un IIE <5 min durante la adquisición genera un aprendizaje “óptimo” cuando es evocado a largo plazo (ver gráfica 6).

Como se puede observar en la gráfica 8, al variar el IIE no se encontró el efecto de facilitación de la consolidación, ya que no hubo diferencias significativas entre las diferentes evocaciones de cada uno de los IIE ($p>0.05$). Sin embargo, como se puede ver en los intervalos evaluados, se obtuvo un comportamiento tiempo-respuesta, en el que el aprendizaje disminuye conforme se separan más el EC del EI, tanto en las evocaciones de largo plazo como en las de corto. Además, es notable que la presentación retronasal soporte IIE tan largos como 80 min con una MLP relativamente buena ($IP=24.9$).

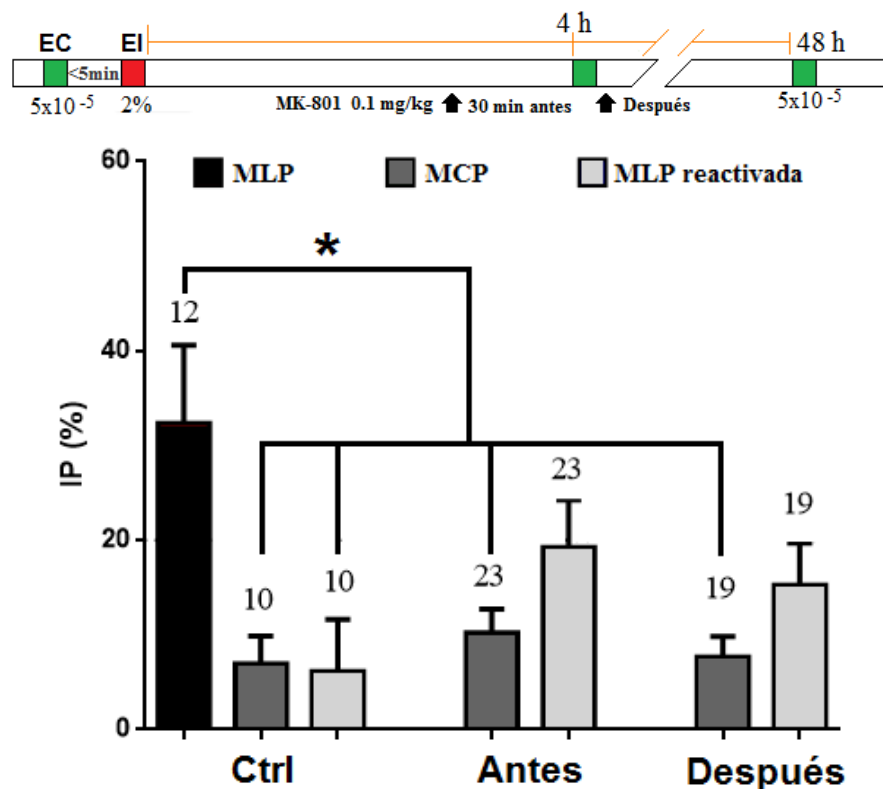


Gráfica 8. Índices de preferencia obtenidos con una concentración de AI de 5×10^{-5} % y una concentración de LiCl de 2 % peso corporal variando el IIE, y evocando a las 48 h (MLP), 4 h (MCP) y este último grupo evocado nuevamente a las 48 h. Aunque con ninguna de las condiciones se presentó el fenómeno de facilitación, se observa que el IP es directamente proporcional al IIE. $\bar{X} \pm EEM$. * $p \leq 0.05$.

9.5 Efecto de la administración intraperitoneal de MK-801

Para ver la participación del sistema glutamatérgico en la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo, se bloquearon los receptores NMDA con el antagonista no competitivo MK-801 administrado de manera intraperitoneal. Se utilizó la única condición de aprendizaje en la que en los experimentos previos se encontró el fenómeno de facilitación: AI [5×10^{-5}] y LiCl 0.5 % (v/v) del peso corporal (gráfica 6, grupo Ctrl en las gráficas 9 y 10).

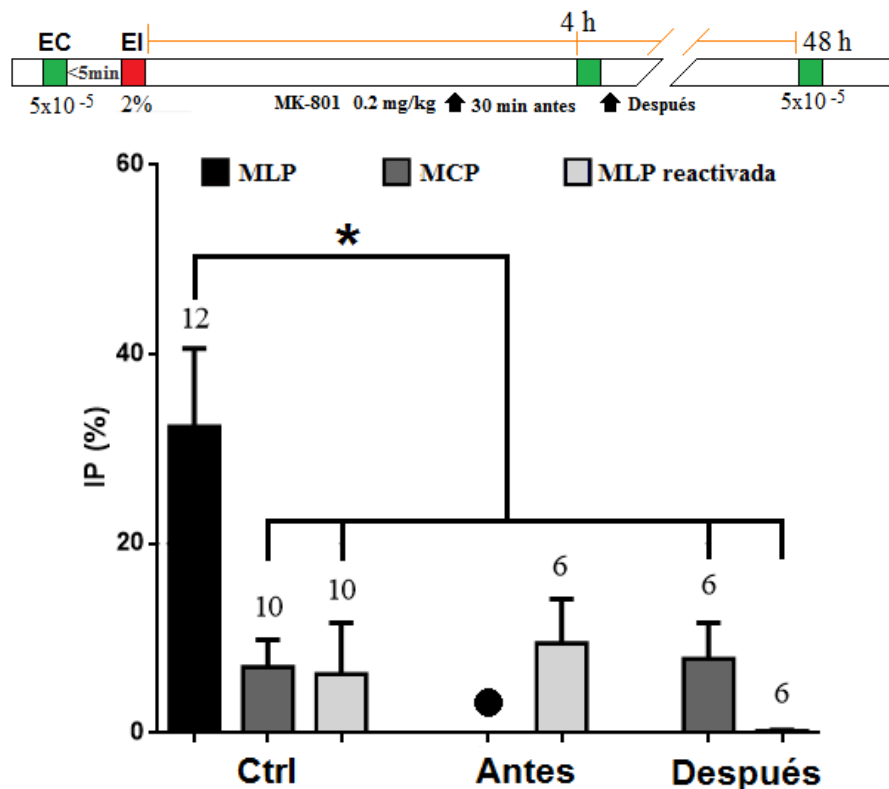
Se probaron dos concentraciones de MK-801: 0.1 y 0.2 mg/kg, administradas antes de la evocación a corto plazo (la reactivación) e inmediatamente después de ésta. Se debe indicar que concentraciones mayores o iguales a 0.1 mg/kg producen amnesia cuando son administradas antes o inmediatamente después de la adquisición del CAO orthonasal (Sólis, 2003). Con la concentración de 0.1 mg/kg se probaron dos tiempos de administración previos a la reactivación (15 y 30 min), sin embargo, como no se observaron diferencias significativas entre estos intervalos ($p > 0.05$) se juntaron los datos en un solo grupo y se decidió usar el de 30 min para la dosis mayor de 0.2 mg/kg.



Gráfica 9. Efecto del MK-801 0.1 mg/kg ip. sobre la facilitación de la consolidación. Se les administro el antagonista antes de la evocación a corto plazo o inmediatamente después de esta, como se puede observar no tuvo efecto el antagonista sobre la facilitación de la consolidación. $\bar{X} \pm \text{EEM}$. * $p \leq 0.05$.

Como se puede ver en la gráfica 9, la administración de MK-801 antes de la evocación a corto plazo no produjo ningún efecto sobre la misma, sin embargo, provocó un ligero déficit en la facilitación, ya que en la posterior evocación a largo plazo tuvo un IP más elevado que el control y no presentó diferencias con el control a largo plazo ($p > 0.05$). Un efecto semejante se encontró en la MLP cuando la administración fue hecha inmediatamente después de la evocación de corto plazo.

Al incrementar la dosis de MK-801 a 0.2 mg/kg se encontró que su administración 30 min antes de la evocación, impidió que la conducta se ejecutara debido a la gran cantidad de problemas motores y/o desorientación que presentaban las ratas (marcado en la gráfica con un círculo negro). A pesar de esto, la evocación a largo plazo fue buena aunque no presentó diferencias estadísticas con el grupo control a largo plazo. En cuanto al grupo administrado inmediatamente después de la evocación, sorprendentemente esta dosis no afectó la facilitación de la consolidación como lo hizo un poco la dosis menor de MK-801 de 0.1 mg/kg, sino que además presentó un IP muy bajo (gráfica 10).



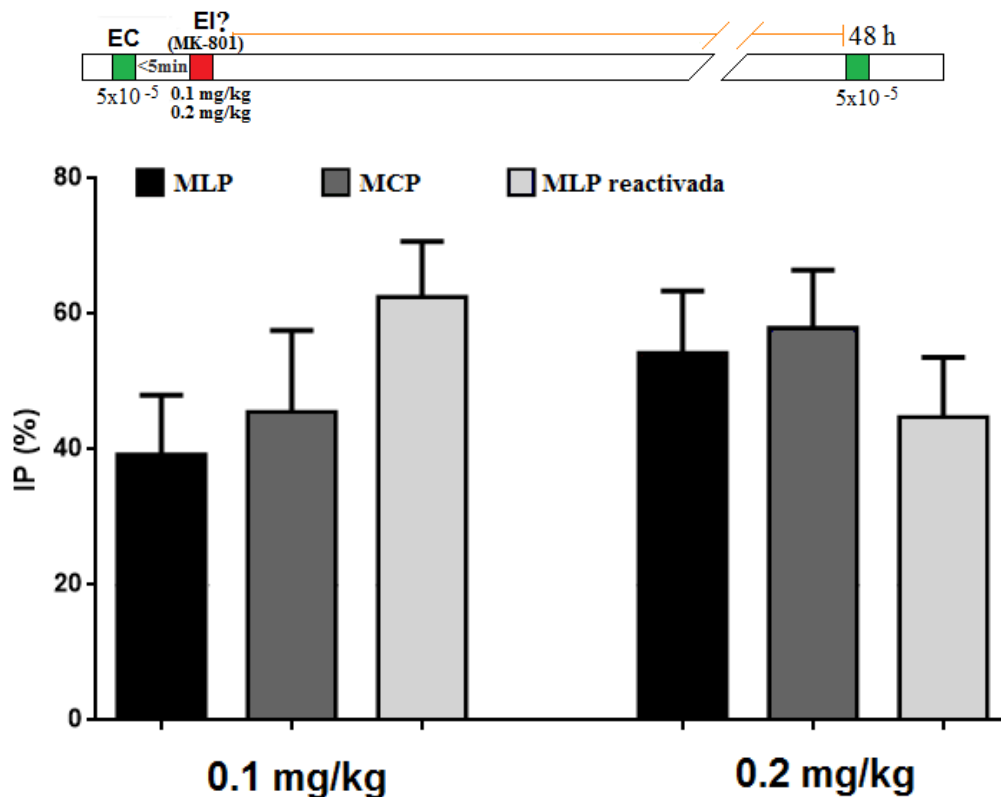
Gráfica 10. Efecto del MK-801 0.2 mg/kg ip. sobre la facilitación de la consolidación. Se les administro antes de la evocación a corto plazo e inmediatamente después de esta, el punto indica que el grupo no pudo evocar por problemas motores. $\bar{X} \pm EEM$. * $p \leq 0.05$.

En resumen, las dos concentraciones utilizadas de MK-801 parecen tener un efecto limitado en el fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo.

9.6 MK-801 intraperitoneal como estímulo incondicionado

Como se encontró un efecto muy limitado de la administración de MK-801 sobre la facilitación de la consolidación y en una de las dos concentraciones lo opuesto a lo esperado, se decidió probar si esto se debió porque el MK-801 estuviera actuando como EI. Por lo que se administró en las dosis utilizadas en los experimentos anteriores (0.1 y 0.2 mg/kg) inmediatamente después del EC sin la utilización de LiCl.

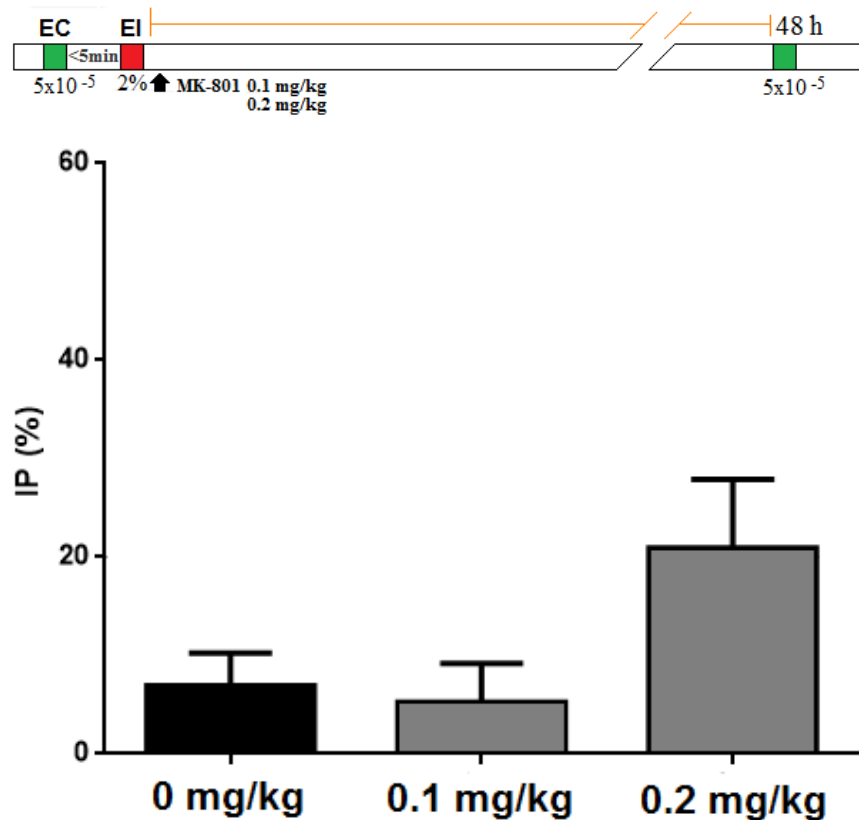
Como se puede observar en la gráfica 11 ninguna de las dosis produjo aversión cuando fue evaluada la memoria a corto o largo plazo con y sin reactivación, por lo que el MK-801 no actúa como EI en estas concentraciones.



Gráfica 11. Efecto del MK-801 utilizado como EI en dosis de 0.1 y 0.2 mg/kg. El IP cercano a 50 indica que las dosis utilizadas no funcionan como EI. $\bar{X} \pm \text{EEM}$, sin diferencias significativas (n=6).

9.7 MK-801 como agente amnésico durante la consolidación

Otra opción para el pequeño efecto encontrado -o el efecto contrario con la dosis mayor-, es que el MK-801 no estuviera teniendo efectos amnésicos afectando la consolidación como previamente se ha reportado para el CAO con presentación oronasal, por lo que se probaron las dosis utilizadas inmediatamente después de la administración del EI. No se encontró efecto sobre la consolidación del CAO retronasal (gráfica 12), esto podría explicarse por las diferencias que esta vía de administración tiene con la oronasal y que hace que se parezca más al gusto, ya que el MK-801 intraperitoneal no impide la consolidación del CAS (Sólis, 2003).



Gráfica 12. Efecto de la administración de MK-801 ip. sobre la consolidación del CAO retronasal. El antagonista no produce efectos amnésicos al ser administrado inmediatamente después de la adquisición. $\bar{X} \pm EEM$, sin diferencias significativas (n=11).

10. DISCUSIÓN

Tres son los aspectos más relevantes de los resultados del presente estudio:

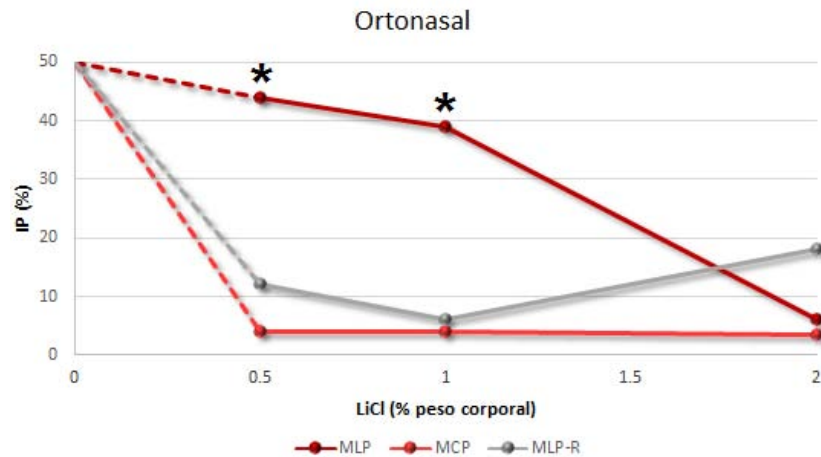
- a) Es posible generar un CAO retronasal con una concentración de AI de 5×10^{-5} %, equivalente a 0.005 veces a lo reportado previamente, el cual resiste IIE tan prolongados como 80 min con solo una adquisición cuando se prueba la MLP (IP=24.9, gráfica 7). Esto concuerda con otros reportes que muestran que la presentación retronasal tolera IIE mucho más largos que la presentación ortonasal.

- b) El fenómeno de facilitación de la consolidación de la MLP por evocación a corto plazo resultó difícil de reproducir en nuestras condiciones experimentales, a diferencia de los trabajos previos realizados en el laboratorio en los que se replicó fácilmente (Sánchez, 2010 y Tovar 2011). Así, de las 16 condiciones ensayadas variando el EC, EI o el IIE, solo en una (AI [5×10^{-5}] y LiCl 0.5 %, gráfica 6) pudimos encontrar este efecto: por ejemplo, algunas condiciones generaban un aprendizaje tan bueno que no podía mejorarse, o por el contrario, el aprendizaje era tan deficiente por la falta de asociación de los estímulos, que a pesar de que se hiciera la evocación a corto plazo, la consolidación no podía facilitarse. Como hemos señalado, **la condición fundamental para poder observar la facilitación, es aquella en la que se observa una buena MCP, pero una MLP deficiente.**

Aunque hubo diferencias menores en los protocolos utilizados previamente con el nuestro que podrían explicar lo anterior, entre ellas el número de bebederos 4 en lugar de 2, la cantidad de agua consumida durante la adquisición, que en su caso fue *ad libitum* y en el nuestro ≤ 4 ml, la duración de la sesión de adquisición de 10 a 5 minutos y el odorante AI en lugar de almendra, la diferencia que parece ser determinante como se discutirá más adelante, es la forma de presentación del odorante: retronasal en lugar de ortonasal.

- c) El efecto limítrofe que produce el bloqueo sistémico de los receptores a NMDA por MK-801 en la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo.

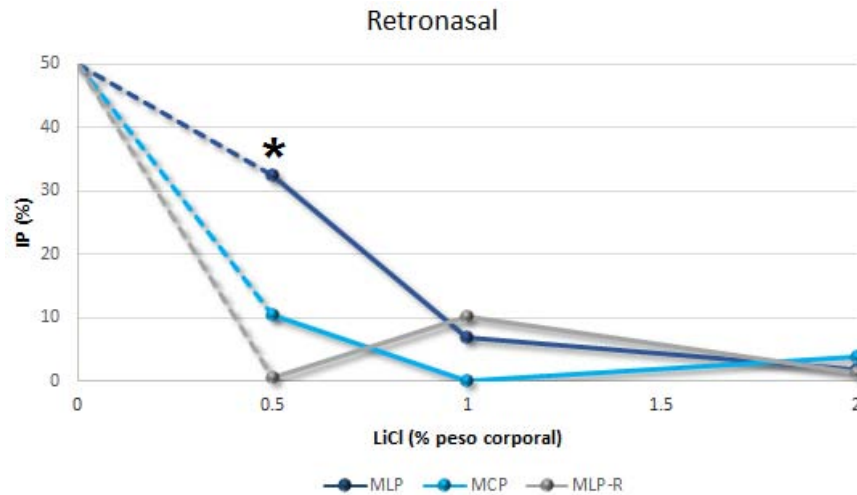
Aunque no parecieran estar muy ligados los dos primeros puntos: la resistencia de la presentación retronasal a los IIE largos y la dificultad de encontrar el fenómeno de facilitación con esta misma presentación, los resultados de este trabajo así lo demuestran. Para ver la relación más claramente es necesario comparar los resultados del presente trabajo con estudios previos de “facilitación de la consolidación” realizados en nuestro laboratorio.



Gráfica 13. Índice de preferencia de las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación en animales condicionados con estimulación olfativa ortonasal y variando el estímulo incondicionado. Con las dos condiciones bajas de LiCl (0.5 y 1 %) se presentó el fenómeno de facilitación. \bar{X} , $*p \leq 0.05$ en comparación con los grupos reactivados (Datos obtenidos del trabajo de Sánchez 2010).

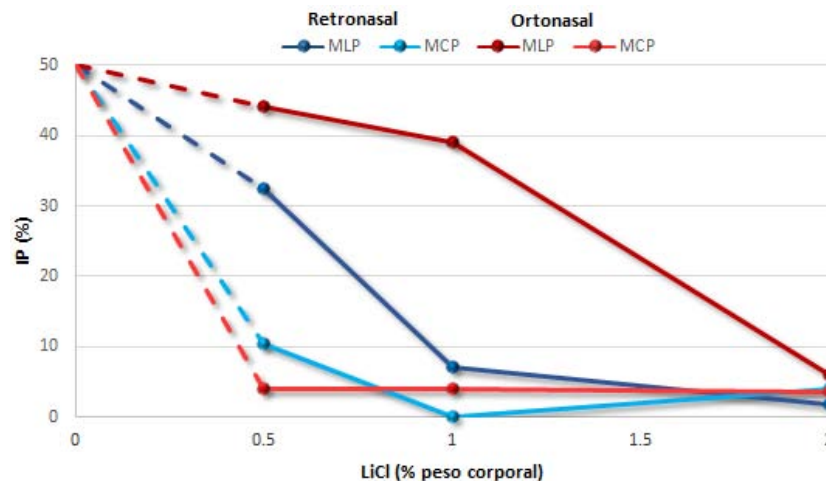
La primera comparación será entre los resultados de Sánchez (2010) quien usó presentación ortonasal variando la concentración del EI (gráfica 13) y los de este trabajo con presentación retronasal variando igualmente el EI; se considerarán únicamente las condiciones del EC donde se encontró la “facilitación” (gráfica 14). Lo primero que debe notarse, es que Sánchez usando una presentación ortonasal y una concentración baja de LiCl (0.5 y 1 %) encontró una buena MCP (línea roja clara), lo cual demuestra que hubo una buena asociación de los estímulos; a pesar de esto no encontró MLP (línea roja oscura), por lo que concluyó que sus condiciones provocan una deficiencia importante en la consolidación. En contraste, los resultados del presente trabajo con presentación retronasal muestran que las diferencias son menores: una buena asociación de los estímulos revelada por buena MCP (línea azul clara) -como en el caso anterior-, pero a diferencia del estudio referido, la MLP no es tan deficiente (línea azul oscura). Además, en los resultados de Sánchez, la MCP (línea clara) es muy parecida a la MLP facilitada (línea gris); esto mismo sucede con la presentación retronasal, sin embargo, como las condiciones con estimulación ortonasal resultan en una mala MLP, en esta presentación se encontró el fenómeno de facilitación para ambas

condiciones de LiCl bajo (0.5 y 1 %; ver asteriscos gráfica 13), mientras que en nuestro trabajo con presentación retronasal, solo una de estas condiciones alcanzó diferencias significativas (ver asterisco gráfica 14).



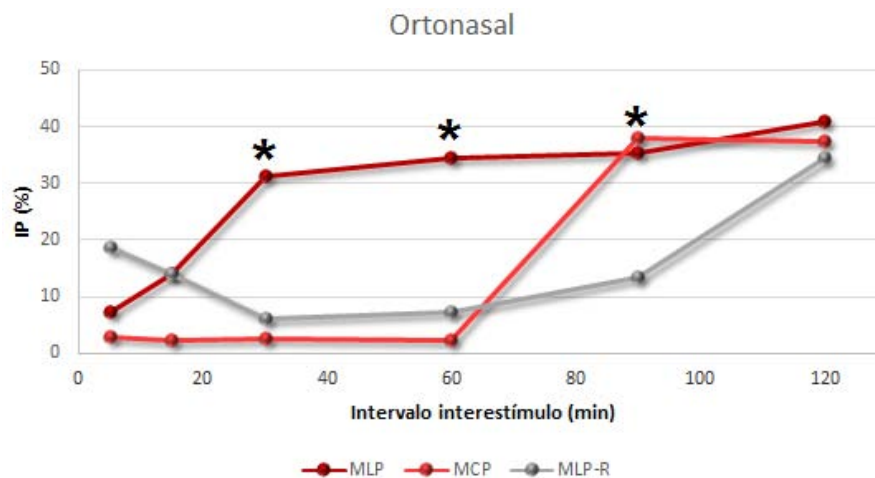
Gráfica 14. Índice de preferencia de las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación condicionados con estimulación olfativa retronasal y variando el estímulo incondicionado. Solo con una condición se presentó el fenómeno de facilitación (0.5 %). \bar{X} , * $p \leq 0.05$ en comparación con los grupos reactivados.

Al comparar entre sí los datos obtenidos en ambos trabajos (gráfica 15), es evidente que la MCP obtenida con ambas presentaciones es muy similar (líneas claras), sin embargo, hay diferencias sustanciales en la MLP (líneas oscuras), que se deben a que hubo una deficiencia de la consolidación más importante en la presentación ortonasal que con la retronasal.

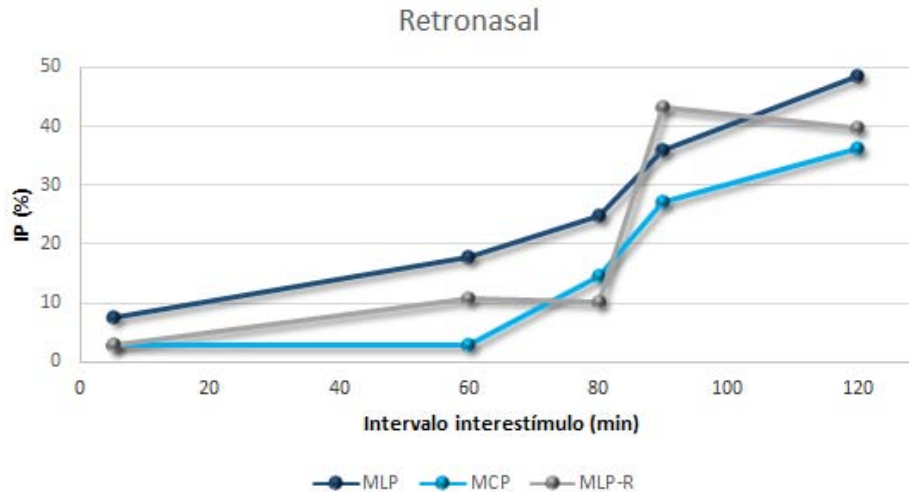


Gráfica 15. Índices de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo condicionados con estimulación olfativa ortonasal y retronasal variando el estímulo incondicionado. Las diferencias de la MCP con respecto a la MLP son mayores en la vía ortonasal que en la retronasal. \bar{X} (Datos ortonasales obtenidos del trabajo de Sánchez 2010).

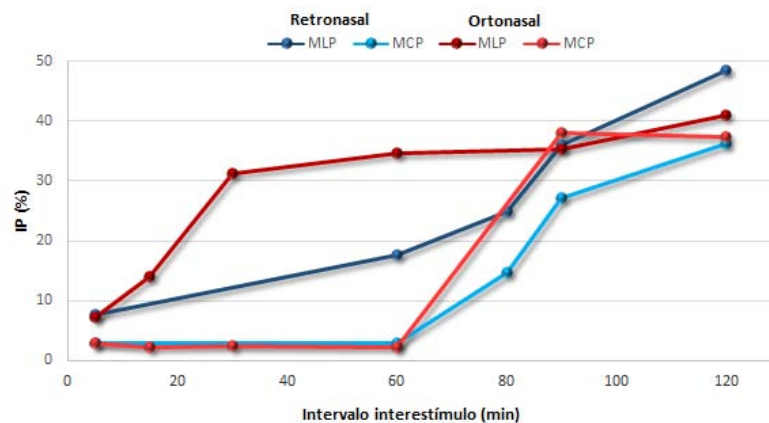
Al comparar los datos obtenidos por Tovar (2011) usando presentación ortonasal (gráfica 16), con los obtenidos en este trabajo con presentación retronasal (gráfica 17), lo primero que se puede notar es que con presentación ortonasal hay diferencias notables entre la MCP (línea rojo claro) y la MLP (línea rojo oscuro); recuérdese que esto mismo sucedió con esta presentación al variar el EI. Además, con la presentación ortonasal la MCP se mantiene con un IIE hasta de 60 min, mientras que la MLP se pierde con IIE muy cortos: a los 15 min ya es deficiente y a los 30 min es inexistente. En contraste, en nuestro estudio la presentación retronasal induce una MCP muy parecida a la MLP, excepto que la MLP es un poco más deficiente, por lo que la dinámica de la memoria de corto y largo plazo en función del IIE es similar. Por tanto, la diferencia entre la MCP y la MLP con la presentación ortonasal se debe principalmente a un defecto en la consolidación, mientras que con la retronasal tal deficiencia no se presenta. Como se ha resaltado en las comparaciones realizadas, **esta deficiencia en la consolidación es una condición necesaria para observar la reactivación de la memoria y como se vio, en la presentación retronasal es difícil generarla y por tanto inducir la facilitación.**



Gráfica 16. Índice de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación condicionados con estimulación olfativa ortonasal y variando el IIE. El incremento del IIE produjo tres condiciones deficientes en la MLP que pudieron ser facilitadas por reactivación (30, 60 y 90 min). \bar{X} , * $p \leq 0.05$ en comparación con los grupos reactivados (Datos obtenidos del trabajo de Tovar 2011).



Gráfica 17. Índices de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo con y sin reactivación condicionados con estimulación olfativa retronasal y variando el intervalo interestímulo. La MCP y MLP son muy similares por lo que no se pudo facilitar. \bar{X} , sin diferencias significativas en comparación con los grupos reactivados.



Gráfica 18. Índices de preferencia obtenidos en las evocaciones de corto y largo plazo condicionados con estimulación olfativa ortonasal y retronasal variando el intervalo interestímulo. La presentación ortonasal produce déficits importantes en la consolidación al incrementar el IIE, por lo que la MCP y la MLP son diferentes, mientras que en la retronasal son similares. \bar{X} (Datos ortonasales obtenidos del trabajo de Tovar 2011).

Al analizar las gráficas de la presentación ortonasal vs retronasal en conjunto (gráfica 18), se puede observar que las evocaciones de corto plazo son prácticamente iguales (líneas claras), esto demuestra que no hay diferencias en la asociación de los estímulos entre ambos tipos de presentación de los olores, contrario a lo que en trabajos previos se ha sugerido (por ej. Chapuis *et al.*, 2007). Como se puede observar, con ambas presentaciones se empieza a ver deficiencia en la MCP a partir de los 60 min y para los 90 min la asociación es prácticamente nula. Por otro lado, al

comparar las evocaciones de la MLP (líneas oscuras) se observa que son muy diferentes, ya que como se ha recalcado, con la presentación ortonasal hay una deficiencia en la consolidación que no existe en la retronasal. Por tanto, los datos del presente trabajo comprueban lo que Tovar (2011) anticipaba: que la diferencia en términos de MLP con ambas presentaciones de los odorantes se debe no a un problema de asociación de los estímulos como se ha propuesto, sino más bien a un problema en la consolidación del CAO ortonasal. Además, nuestros datos sugieren que la diferencia entre la memoria ortonasal y retronasal es la sensibilidad a problemas de consolidación, y que la dinámica de formación/pérdida de la MCP en función del IIE es muy similar en ambas vías de presentación.

Por todo lo anterior, queda clara la relación entre los dos primeros puntos mencionados al inicio de la discusión sobre la presentación retronasal: su capacidad para resistir IIE largos y la dificultad para evidenciar el fenómeno de “facilitación” con esta presentación, ambos se deben a que **no hay deficiencias en la consolidación como ocurre con la presentación ortonasal.**

Se ha propuesto que las diferencias en las memorias generadas a partir de la presentación ortonasal y retronasal -que incorrectamente se pensaban eran provocadas por la incapacidad de asociar los estímulos más que por una consolidación deficiente-, se deben a diferentes patrones de activación neural durante la adquisición y evocación. En humanos, la presentación retronasal a diferencia de la ortonasal produce actividad en la base del surco central que corresponde a la región somatosensorial de la cavidad oral, en la región cingulada posterior y perigenual, y en la corteza orbitofrontal medial (Small *et al.*, 2005). En ratas, durante la evocación de una memoria aversiva olfativa, hay un aumento de la actividad oscilatoria en la banda de las frecuencias beta (15-40 Hz) en las cortezas infralímbica e insular (zonas granular y agranular), cuando la adquisición se hace con la presentación retronasal (Chapuis *et al.*, 2009), por lo que las deficiencias en la consolidación usando la presentación ortonasal en contraste con la retronasal pueden deberse a estas diferencias.

Es interesante que los datos obtenidos con ratas con lesiones de la corteza entorrinal que presentan una mayor resistencia a IIE largos en el CAO ortonasal cuando son evocadas a largo plazo (Ferry *et al.*, 1996), sean parecidos a los obtenidos por Tovar (2011) en ratas intactas con esta misma presentación pero con evocaciones a corto plazo, y a las de corto y largo plazo del presente trabajo con presentación retronasal. En sus trabajos Ferry y cols. (Ferry *et al.*, 1996; Ferry y Di Scala., 1997; Ferry *et al.*, 1999; Ferry *et al.*, 2006), han interpretado que la lesión de la corteza entorrinal provoca que se mantenga durante más tiempo la huella de memoria del olor, que suponen

normalmente es lábil, lo que permitiría su asociación con la toxicosis a pesar del retraso. Sin embargo, sabemos por el trabajo de Tovar-Díaz y cols. (2011) que esta interpretación tiene una falla de fondo, y es como se ha venido mencionando, que con IIE largos en la presentación ortonasal no hay un impedimento de asociación, sino de consolidación, por lo que la reinterpretación de los resultados obtenidos en animales con lesiones de la corteza entorrinal, sería que presentan una facilitación en la consolidación del CAO ortonasal (Tovar-Díaz, 2011). Además, como mencionan Ferry y cols. (1996 y 2006), una de las posibilidades es que esta lesión elimine mecanismos inhibitorios que ocurren naturalmente, por lo que la similitud de sus datos con los de nuestro trabajo podría ser un indicativo de que la corteza entorrinal participa diferencialmente según el tipo de presentación del odorante, por ejemplo; podría ser que durante el CAO retronasal a diferencia del ortonasal, se diera una inhibición de la corteza entorrinal que a su vez dejaría de inactivar a la BLA, que sería una de las responsables de que esta presentación de los odorantes sea resistente a los IIE largos. Evidentemente se requieren experimentos adicionales para probar esta idea; una forma de corroborar lo anterior sería activar la corteza entorrinal antes de un CAO retronasal con IIE largo, de ser cierta esta hipótesis al evaluar la MLP no debería de encontrarse aversión o debería estar deteriorada de manera importante, además, si esta vía es una de las responsables de algunas de las diferencias entre las dos presentaciones, durante la estimulación ortonasal podría haber una mayor activación de la corteza entorrinal, y una menor activación de la BLA -y tal vez del hipocampo- en comparación con la retronasal. Así mismo, este circuito podría estar involucrado en la PAOS. A pesar de esto, se debe considerar la actividad diferencial de la corteza insular dependiente de la forma de presentación de los odorantes reportada por Chapuis y cols. (2009), ya que seguramente tiene participación en las diferencias entre las presentaciones del olor.

Si comparamos la memoria con IIE largos conseguida en este trabajo con otros estudios usando el mismo odorante, vemos que Slotnick y cols. (1997) encontraron un condicionamiento aversivo bueno con un solo entrenamiento usando un IIE de 240 min y una concentración de 0.01 %, mientras que Chapuis y cols. (2007) usando la misma concentración y dos ensayos de adquisición (uno no generaba aversión) lograron un IIE de 120 min. En contraste Inui y cols. (2006) con una concentración menor (0.001 %), no observaron aversión con IIE de 30 min, mientras que Ferry y Duchamp-Viret (2014) con una concentración de 0.0001% (según ellos 10^{-6}) y un IIE de 20 min encontraron una aversión leve que extinguía en una sesión. En nuestro trabajo logramos un buen aprendizaje con una sola sesión de adquisición y un IIE de 80 min usando una concentración de AI de 0.00005 %, lo que evidentemente es menor a todas las concentraciones que han sido utilizadas con anterioridad. Desconocemos si con la concentración reportada por Slotnick y cols. (1997) de

0.01 % (que se supone no tiene componente gustativo), podemos incrementar el IIE máximo encontrado en el presente estudio con buena memoria usando la presentación retronasal.

Debemos recalcar que aunque hay más similitudes entre la presentación olfativa retronasal y la estimulación gustativa, en comparación con la ortonasal, tanto así, que es común confundir el sabor con la estimulación retronasal (Murphy *et al.*, 1977; Rozin, 1982). Investigaciones que se están haciendo actualmente en nuestro laboratorio, donde la única diferencia con respecto al presente estudio es el uso de un sabor (sacarina 0.1 %) en lugar de un olor retronasal, muestran que a pesar de la gran diferencia de resistencia de la presentación retronasal con la ortonasal, el sabor resiste IIE hasta de 120 min obteniendo muy buena retención de la MCP y MLP, (intervalo en el que ya no hay asociación con estímulos olfativos retronasales), e incluso tan largos como 180 min -ya con cierta deficiencia- (Trejo 2015, comunicación personal), por lo que claramente hay diferencias en este sentido entre la olfacción retronasal y el sabor. Dichas diferencias no se deben a una falta de consolidación como sucede entre la presentación ortonasal y retronasal, sino parecen deberse a una falla en la asociación de los estímulos, la cual puede deberse como lo indican algunas teorías, a que la memoria del sabor dura o puede ser asociada durante más tiempo con la toxicosis y/o a que hay diferencias entre el olor retronasal y el sabor en la formación de la “memoria de lo seguro”, generándose o interfiriendo más rápido en el olfato que en el gusto. A pesar de esto, el hecho de que el olfato retronasal resista IIE tan grandes como 80 min con buena memoria, le da tanta relevancia ecológica como la que se le atribuye al gusto en la regulación de las conductas alimenticias; además, el olfato tiene la ventaja sobre el gusto de que no es necesario que el animal ingiera algún alimento potencialmente tóxico para reconocerlo (Lorden *et al.*, 1970; Rusiniak *et al.*, 1979). Así cotidianamente nuestros animales condicionados de manera óptima con estímulos olfativos no prueban el agua odorizada, es decir presentan un $IP = 0$, por lo que no extinguen espontáneamente la aversión al olor aún después de numerosas evocaciones donde se les da a escoger entre agua simple y agua odorizada (recuérdese gráfica 2).

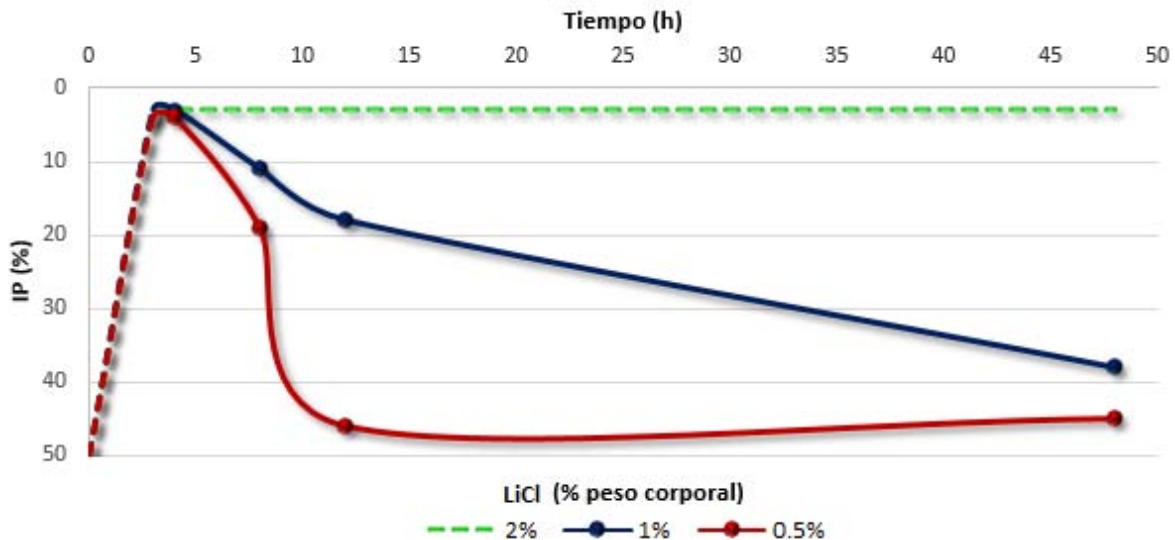
Una constante del presente estudio y los dos previos sobre facilitación de la consolidación por la reactivación de corto plazo, es que si se comparan las evocaciones de corto plazo con las de largo plazo que han sido reactivadas antes (facilitadas) éstas son similares, por lo que parecería que la evocación a corto plazo “fija” la memoria casi tal cual se encontraba en el momento en que esta primera evocación sucede, independientemente de que tan buena o deficiente sea la memoria. Esto sugiere que la evocación de la MCP, más que incrementar la memoria, la asociación o su evocación, favorece que sea consolidada en el nivel en el que se encuentra; es por eso que, en términos

generales, el IP obtenido durante la evocación de la MCP será similar al que ese mismo grupo alcanzará en una posterior evocación a largo plazo. Fisiológicamente hablando, esto podría deberse a que la reactivación está provocando, más que el reclutamiento de nuevas neuronas –o sinapsis-, el que las neuronas que están participando en la memoria continúen formando parte del engrama, manteniendo y/o reforzando sus conexiones que de otra manera se debilitarían.

Como se mencionó en la introducción, Sánchez (2010) condicionó grupos de animales con almendra ortonasal y una dosis baja de LiCl (1 o 0.5 %) lo cual resulta en una falta de MLP cuando se prueba a las 48h, pero se obtiene una buena MCP evocada 4 h después del entrenamiento en grupos diferentes. En estas condiciones, realizó evocaciones a diferentes intervalos después de la adquisición en grupos independientes; Si asumimos que los valores que obtuvo en las evocaciones a corto plazo reflejan principalmente el estado de la memoria durante su reactivación, y consideramos en conjunto las evocaciones secuenciales con estos grupos independientes, se puede interpretar la curva obtenida como la dinámica de la memoria durante la consolidación. Para una representación visual más intuitiva, a diferencia de las gráficas que se han presentado a lo largo del trabajo, en las siguientes gráficas (19 a 21) se invirtió el eje Y, por lo que los valores de IP están en orden descendente, esto hace que los IP bajos que representan una buena memoria queden en la parte superior y que valores altos que representan memoria deficiente se localicen en una posición baja en la gráfica.

En la gráfica 19 se presentan los datos reportados por Sánchez (2010) en dos condiciones con bajo LiCl: 1 % puntos azules y 0.5 % puntos rojos, además de una tercera condición hipotética con 2 % de LiCl con la cual se produce un aprendizaje “óptimo”. Como se puede observar, a las 4 h con dosis bajas de LiCl la memoria es muy buena –prácticamente inmejorable-, y conforme pasa el tiempo la memoria se deteriora hasta que a las 48 h no se puede evocar. Podemos teorizar que estas curvas corresponden a la pérdida de la memoria/engrama dependiente del tiempo por una falta de consolidación, debido a deficiencias durante la adquisición provocadas en este caso por un baja dosis de LiCl; nótese que entre más grande sean las deficiencias durante la adquisición, más rápido se pierde la memoria. El IP indistinguible a las 4h hace suponer que la asociación de los estímulos fue similar con todas las dosis de LiCl. Sin embargo, es evidente que algo interfiere con la consolidación en el caso de las dosis bajas. ¿Cómo? El descenso de la memoria aversiva en las horas posteriores a la adquisición puede deberse a la pérdida de sinapsis y/o neuronas reclutadas durante la adquisición, lo cual se traduce en un engrama endeble por la falta de estabilidad a largo plazo que proporciona la consolidación. Desconocemos si hay diferencias importantes en la

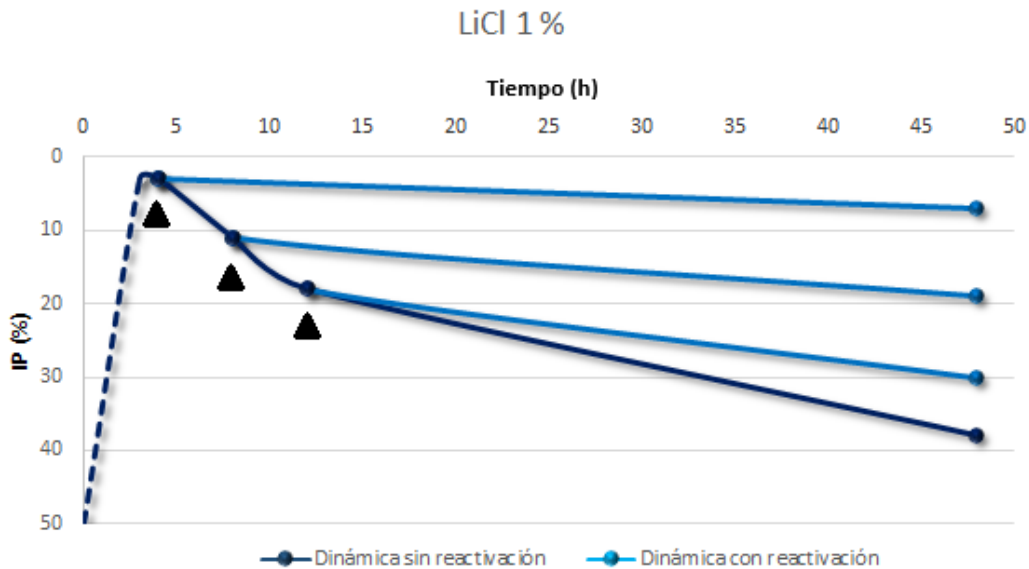
cantidad de sinapsis/neuronas reclutadas bajo las diferentes condiciones de adquisición producidas por bajo LiCl, de ser así, esto puede explicar la falta de consolidación. Alternativamente a estas diferencias cuantitativas podríamos suponer diferencias cualitativas en el sentido de la actividad reverberante del ensamble producido y la persistencia de ésta a lo largo del tiempo. Dicha actividad reverberante, así como diversas cascadas de señalización intracelular y la síntesis de proteínas, pueden ser las favorecidas por la reactivación de la memoria y seguramente participan en el fenómeno de facilitación de la consolidación.



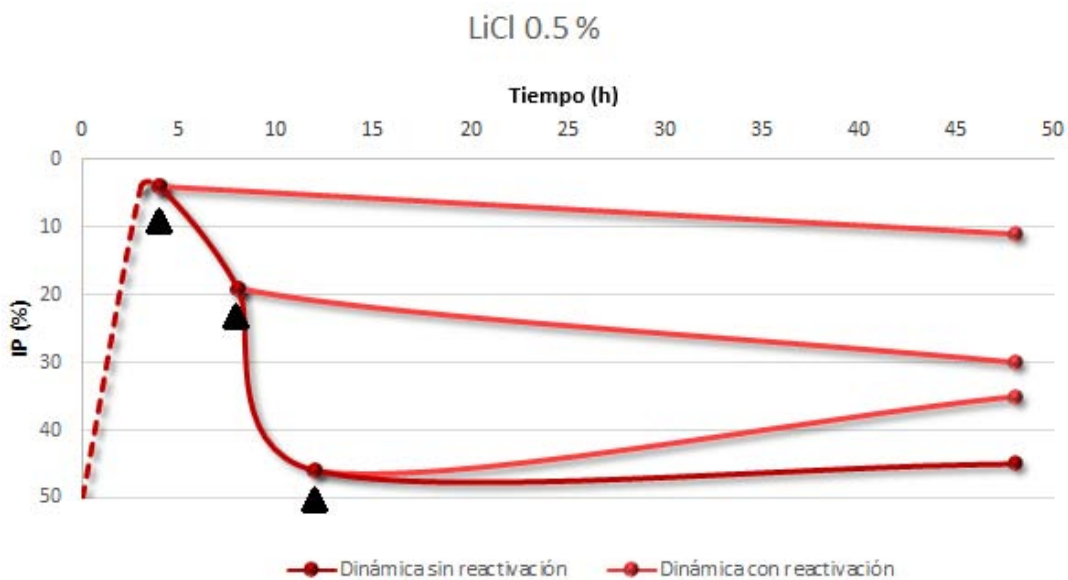
Gráfica 19. Dinámica de la memoria aversiva después de la adquisición para tres condiciones diferentes de LiCl; los puntos son evocaciones en grupos independientes. La memoria decae con el tiempo en las condiciones con LiCl deficientes (1 y 0.5 %), mientras que en la óptima (2 %) se mantiene, formando una buena MLP. \bar{X} (Datos 1 y 0.5 % obtenidos del trabajo de Sánchez 2010).

En las gráficas 20 y 21 están las curvas mostradas en la gráfica anterior (en color oscuro), así como las evocaciones a largo plazo que se hicieron de cada uno de estos grupos (puntos claros), los cuales están unidos por curvas que representan la dinámica de estas memorias después de su reactivación (triángulos). Como se puede ver y como hemos indicado anteriormente con otros datos, los valores de largo plazo son similares a los de las evocaciones a corto plazo de los mismos grupos, es decir, la primera evocación (la reactivación) evitó que la memoria decayera por una falta de consolidación - como en las curvas oscuras-, y que lograran consolidarse, por lo que las líneas que unen las evocaciones de corto plazo con las de largo (líneas claras) tienen una pendiente poco pronunciada. Además, en estas gráficas es evidente lo reportado por Sánchez (2010): el grado de facilitación depende del tiempo entre la adquisición y la primera evocación/reactivación, lo que claramente depende del estado de la memoria en el momento de esa primera evocación. Como parece indicar el hecho de que la MCP y la MLP facilitada sean parecidas, la reactivación a corto plazo solo puede

salvar el engrama (número de sinapsis y/o neuronas reclutadas) en el estado en el que se encontraban en ese momento, durante la reactivación a corto plazo.



Gráfica 20. Efecto de las reactivaciones de corto plazo (triángulos) sobre la dinámica de la memoria aversiva generada en condiciones de bajo LiCl (0.15 M 1 % peso corporal), las evocaciones fueron hechas en grupos independientes. Nótese que las evocaciones a corto plazo son similares a las obtenidas posteriormente a largo plazo. \bar{X} (Datos obtenidos del trabajo de Sánchez 2010).



Gráfica 21. Efecto de las reactivaciones de corto plazo (triángulos) sobre la dinámica de la memoria aversiva generada en condiciones de bajo LiCl (0.15 M 0.5 % peso corporal), las evocaciones fueron hechas en grupos independientes. Nótese que las evocaciones a corto plazo son similares a las obtenidas posteriormente a largo plazo. \bar{X} (Datos obtenidos del trabajo de Sánchez 2010).

Por otro lado, se ha propuesto que un fenómeno importante para la consolidación de la memoria es la reactivación espontánea del engrama en ausencia de estimulación sensorial, nombrada “teoría de la reactivación del trazo” (Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2011). Dicha actividad podría promover la facilitación de las interacciones neuronales, potenciar la eficacia sináptica y fortalecer el trazo de memoria; además, se ha propuesto que estas reactivaciones pueden estar relacionadas con la relevancia de la información adquirida (Hoffman y McNaughton, 2002; Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2011). En el CAS se ha encontrado evidencia de que esta actividad espontánea postaprendizaje puede ser parte de los mecanismos de consolidación, por ejemplo, la BLA presenta un aumento de actividad 30 min después de la adquisición (Yamamoto y Fujimoto, 1991), y esto mismo se encontró en la corteza insular 20-30 minutos posteriores a la adquisición (Yasoshima y Yamamoto, 1998). En esta última estructura (corteza insular), se ha encontrado mediante microdiálisis, que 40 minutos después de la adquisición hay un aumento extracelular transitorio de dopamina y glutamato asociados al EC y al EI respectivamente, similares a los que se producen durante la adquisición. Además, dicha liberación postadquisición no se produce sin la formación de la asociación aversiva y el bloqueo por TTX (bloqueador selectivo de canales de sodio) de la corteza insular después del EI impide dicho aumento y afecta la consolidación del CAS (Guzmán-Ramos *et al.*, 2010). Actualmente se desconoce si tales reactivaciones ocurren en varias ocasiones (Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2011). De ser este el caso, podría ser que las reactivaciones espontáneas sean parte de la actividad reverberante postadquisición, correlacionando inversamente con el grado de aprendizaje, por lo que entre mayor sea este, menor grado de reactivación espontánea posterior se alcanzaría y menor consolidación habría. Además, es posible que cuando las condiciones de adquisición son muy deficientes, las reactivaciones espontáneas no se presenten o duren menos de lo que lo haría bajo mejores condiciones. En este sentido la “reactivación” por evocación que se induce en este trabajo y los trabajos de Tovar-Díaz (2011) y Sánchez (2010) para lograr consolidar una memoria que de otra manera no lo haría, podría emular hasta cierto grado las “reactivaciones espontáneas”, e incluso, podría hacer que se presenten o que continúen durante más tiempo del que lo harían sin dicha reactivación inducida.

Por otro lado, algo que debe resaltarse y que es común en los estudios farmacológicos del CAO, CAS y otros modelos de aprendizaje asociativo, es que si la manipulación -en este caso la administración del fármaco MK-801- se hace después de la adquisición, incluso inmediatamente, por lo general no se observa efecto o es muy débil (por ej. para el caso del CAO y POAS Fery y Di Scala, 2000; Miranda *et al.*, 2007; Desgranges *et al.*, 2008; Sevelinges *et al.*, 2009). Así, el efecto

limitado del MK-801 sobre la facilitación de la consolidación podría deberse a que ya han pasado muchos eventos en ese lapso de horas entre la adquisición y la reactivación, provocando que éste y otros fármacos tengan efectos restringidos sobre el fenómeno de facilitación. Una segunda posibilidad es que, a pesar de las dosis sistémicas utilizadas en este trabajo -que no son bajas-, la administración de este fármaco de manera intracerebral (por ej. en la amígdala) interrumpa de manera más importante la facilitación. Aun así, se debe considerar que otra posibilidad para el escaso efecto encontrado por el bloqueo sistémico de los receptores NMDA, sea que el sistema glutamatérgico tiene un papel limitado en este fenómeno y que otros sistemas de neurotransmisión como el colinérgico o el dopaminérgico que se han asociado con la percepción de la novedad de los estímulos y la consolidación en el CAS (por ej. Miranda *et al.*, 2002; Guzmán-Ramos *et al.*, 2010) sean los principales responsables del fenómeno de facilitación de la consolidación por reactivación.

Como se vio en los experimentos adicionales, el MK-801 no parece tener un gran efecto sobre la consolidación del CAO retronasal en condiciones óptimas de aprendizaje, cuando es administrado inmediatamente después del LiCl (gráfica 12). Esto contrasta con lo que se ha encontrado en el laboratorio y en otros estudios con la presentación ortonasal, donde una dosis de 0.1 mg/kg de MK-801 administrada entre el olor y el LiCl o inmediatamente después de este último, genera amnesia total a largo plazo (Solís, 2003), lo que demuestra otra diferencia entre ambas presentaciones del olor. De hecho, Solís encontró que en la PAOS si un olor ortonasal se condiciona junto con un sabor usando un IIE de 30 min, el MK-801 administrado entre los estímulos no produce efectos amnésicos sobre el CAS y ya no los provoca sobre el olor ortonasal potenciado, es decir, la presentación retronasal se parece más a lo que ocurre con el sabor. Además, en ese estudio Solís mostró que el MK-801 no funciona como EI en la presentación ortonasal, encontrando lo mismo que nosotros con la retronasal (véase gráfica 11).

Por otro lado, algo que debe quedar claro es que evidentemente las manipulaciones realizadas en los trabajos de Sánchez (2010), Tovar-Díaz (2011) y las del presente estudio, al basarse en cambios de la estimulación están teniendo efecto en el momento de la adquisición, y ésta a su vez afecta la consolidación de la memoria formada.

10.1 Modelo de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo

Se acepta comúnmente que, durante la consolidación, la memoria es susceptible a diversas manipulaciones que pueden deteriorarla; sin embargo se considera menos que existen manipulaciones o “situaciones” que durante dicho proceso puedan favorecer su reforzamiento. El fenómeno estudiado en este trabajo corresponde a esta última situación, ya que en ciertas condiciones la evocación a corto plazo hace que una memoria que no iba a ser consolidada lo consiga.

Normalmente cuando se usa el modelo del CAO con condiciones óptimas, se forma una MLP aversiva con un IP muy bajo (≤ 10), mientras que si se manipula alguno de los parámetros durante la adquisición como en el presente trabajo, sea una disminución del EC y/o EI y/o un aumento en el IIE, la memoria se deteriora. Esto se puede manifestar por un pequeño déficit durante la evocación (reflejado por un IP > 10), hasta la ausencia total de MLP. Dentro de todo este abanico de posibilidades y dependiendo de las condiciones de adquisición, se debe considerar que la falta de evocación de la MLP puede deberse a tres situaciones: 1) falta de asociación entre los estímulos, 2) falta de consolidación de la memoria y/o 3) incapacidad de evocar el engrama. De las primeras dos posibilidades, históricamente en el CAO se le ha dado más importancia a la falta de asociación, sin embargo como fue evidente en la introducción de este trabajo, muchas veces no se hacen las evocaciones a corto plazo indispensables para saber si se debe a la falta de asociación o a un problema en la consolidación. En cuanto a la tercera posibilidad; incapacidad de evocar el engrama, al estar basados muchos trabajos -como este- en correlaciones conductuales para inferir el estado de la memoria, es imposible discernir si la falta de una conducta aprendida se debe a que el engrama existe pero no se puede acceder a él, si se ha perdido, o si por el contrario nunca se formó, por lo que no ahondaremos en esta posibilidad.

Como se puede ver en los resultados mostrados en este trabajo y en lo reportado previamente, tanto la asociación como la consolidación se pueden ver afectadas dependiendo de las condiciones de adquisición. Si las condiciones del entrenamiento son medianamente malas, se traducirán en deficiencias de la consolidación y serán evidentes como falta de aversión en la MLP, pero robusta aversión en la MCP. Si las condiciones de entrenamiento son muy malas, se traducirá en deficiencias en la asociación de los estímulos y serán evidentes como falta de aversión en la MCP y la MLP. Uno puede pensar entonces sobre un nivel de actividad que debe ser superado para que se lleve a cabo una asociación, y que el superarlo depende de las memorias previas, la intensidad y

“saliencia” de los estímulos, entre otras cosas. Sin embargo, como se ha mencionado y como los resultados lo muestran, el hecho de que se forme una asociación aversiva que puede ser evocada a corto plazo, no significa que necesariamente se convierta en una MLP. En este sentido Tovar-Díaz (2011) usando ideas de Abel y Kandel (1998) y Dudai (2004) sobre un “umbral” de actividad con suficiente liberación de neurotransmisores, neoromoduladores, de suma de estímulos coincidentes etc. sugirió que es necesario –además- superar este umbral para que se lleve a cabo la consolidación de la memoria (“umbral de consolidación”) y por extensión, la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo. Este umbral como en la asociación, depende de las condiciones durante la adquisición, por lo que ambos procesos son interdependientes.

Se debe tener en mente que aunque el superar el “umbral de consolidación” forme una MLP aversiva que pueda ser evocada, en caso de que ocurra lo contrario no significa necesariamente que no se forme ninguna memoria; siempre se debe considerar que en las pruebas de evocación no se evalúa la memoria de manera directa, sino indirectamente a través de las manifestaciones conductuales que ésta produce, y que dichas manifestaciones aunque dependan ciertamente de la memoria física, también dependen de las condiciones durante la evocación, como la saliencia del EC, el contexto, entre muchas cosas más.

Con base en la interpretación anterior, presento una esquematización gráfica del fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo en la figura 14. En esta, represento la dinámica de la memoria aversiva a lo largo del tiempo -después de la asociación- para tres condiciones diferentes de adquisición, representando la curva 1 condiciones óptimas (línea verde), y la 2 y 3 condiciones subóptimas progresivamente más deficientes (azul y rosa respectivamente). Estas condiciones subóptimas se pueden deber a una disminución de la intensidad del EC y/o EI, un IIE largo, la administración de fármacos amnésicos, etc. Como se observa, la dinámica de memoria ejemplificada en la curva 1 que representa el aprendizaje en condiciones óptimas, forma en poco tiempo una memoria que supera el umbral de consolidación (línea roja) y genera un aprendizaje robusto que no decae en el tiempo. En las curvas 2 y 3 las condiciones subóptimas ejemplificadas no superan el umbral de consolidación, por lo que las memorias formadas decaen con el tiempo; nótese que la curva 3 decae más rápido que la 2 porque representa condiciones de adquisición más deficientes.

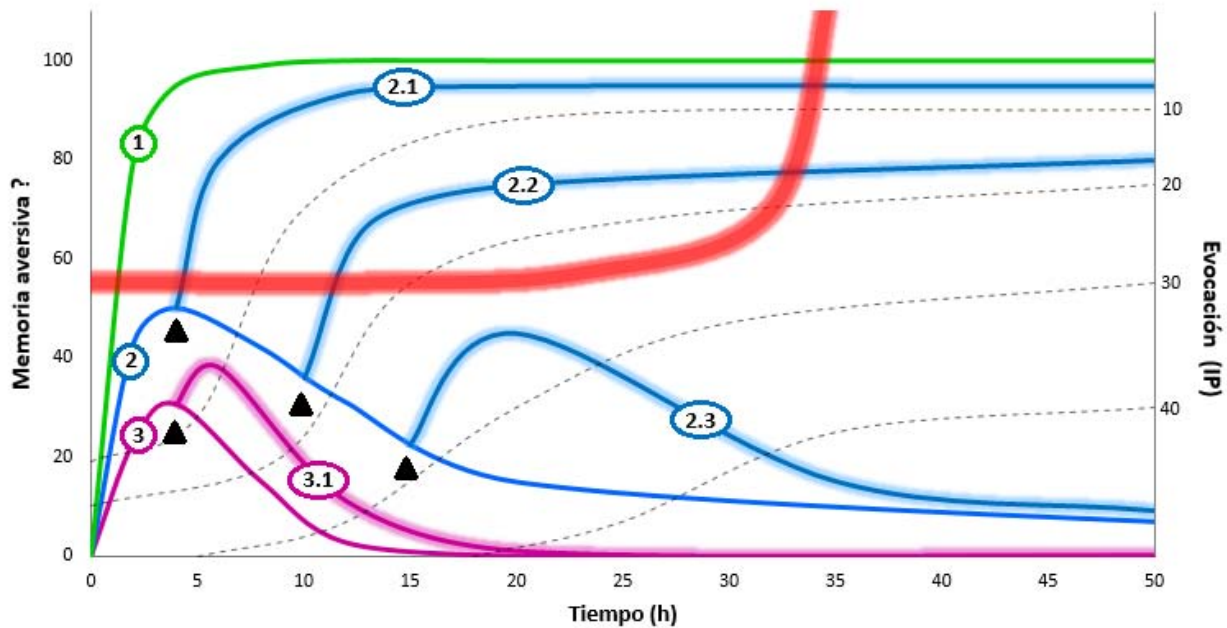


Figura 14. Modelo gráfico del fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo en tres condiciones hipotéticas de adquisición. Mientras que la condición 1 genera una buena MLP, las condiciones 2 y 3 generan una memoria que decae con el tiempo por las condiciones deficientes durante su adquisición, sin embargo su evocación a corto plazo podrá en ciertas condiciones facilitar su consolidación formando una buena MLP.

Los triángulos negros en la gráfica representan evocaciones de corto plazo -o plazo intermedio según se considere-. Dichas evocaciones reactivan el engrama de memoria que en ese momento se está consolidando modificando el estado de la memoria y cambiando la trayectoria que tendría si no se produjeran (esta nueva trayectoria se representa con las curvas resaltadas y numeradas con decimales que surgen de las curvas “enteras”). Como se puede observar, estas reactivaciones acercan la memoria al umbral de consolidación haciendo posible que, en algunos casos, lo puedan alcanzar.

Si se observan las curvas 2.1 y 3.1 se puede ver que las evocaciones que las originan fueron realizadas en el mismo tiempo posterior a la adquisición. A pesar de esto, la curva 2.1 al provenir de una memoria más cercana al umbral de consolidación, logra superarlo consolidándose y -en este caso- formando una buena MLP aversiva. Mientras que la otra curva (3.1) que viene de una curva más lejana del umbral de consolidación -porque las condiciones de adquisición que la generaron son más deficientes- no logra alcanzar el umbral y termina decayendo con el tiempo. Otra cosa que se puede observar es que en la curva 2 de la gráfica se representan otras dos evocaciones a corto plazo -de grupos independientes- (curva 2.2 y 2.3), que a diferencia de la de la curva 2.1 se realizan más tarde, por lo que la memoria en este lapso mayor ha decaído más y por tanto, aunque con la primera

de estas evocaciones se logra superar el umbral de consolidación (curva 2.2), la MLP observada es menor que la que se obtuvo en la curva 2.1, y en la última de las reactivaciones (curva 2.3) la memoria ha decaído tanto, que ya no alcanza a superar el umbral por lo que decae con el tiempo. Esto refleja la dependencia del tiempo que tiene la facilitación de la consolidación: entre más alejadas ocurran las reactivaciones/evocaciones de la adquisición, menor es el efecto facilitador que éstas inducen.

Como se mencionó anteriormente en la discusión, en ciertas circunstancias es común que dos memorias que sean de diferente “magnitud”, cuando son reactivadas, den lugar a la misma evocación -mismo IP- (véase por ejemplo la primera evocación de los grupos de la gráfica 19). Este hecho es representado en el modelo mediante líneas punteadas grises de forma sigmoideal. Estas líneas delimitan el IP hipotético que se obtendría en cada momento según el estado de la memoria. Nótese que en las primeras horas si se realizara una evocación en las condiciones hipotéticas de las curvas 1, 2 y 3, la memoria a pesar de ser distinta en las tres curvas, al reactivarse se evoca la respuesta con la misma intensidad. Conforme pasa el tiempo si la memoria no superó el umbral de consolidación se va perdiendo obteniéndose una evocación menos intensa, por lo que las líneas punteadas tienden a subir y finalmente se van haciendo asíntotas. El que las evocaciones no se relacionen linealmente con el estado de la memoria, principalmente en las primeras etapas después de su formación -por eso las líneas tienen forma sigmoideal-, puede ser el reflejo de que la evocación de la memoria en sus primeras etapas, depende de maquinaria diferente de la que participa en estados posteriores donde ya está consolidada.

¿Qué significa el que las memorias tengan diferente magnitud? Como se mencionó antes desconocemos si las diferentes condiciones de adquisición recluten un diferente número de sinapsis, neuronas o incluso estructuras cerebrales, o si las diferencias son en el sentido de la duración de la actividad reverberante del circuito, la activación de cascadas de señalización, fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas, expresión de genes, reactivaciones espontaneas etc. seguramente todo esto tiene que ver en mayor o menor medida. Sin embargo, sabemos que aunque durante la primera evocación de memorias obtenidas con diferentes grados de deficiencia durante la adquisición, se puede evocar una respuesta “perfecta” –medida con nuestro sistema-, las distintas dinámicas que presentan con el paso del tiempo son un claro indicador de que se trata de memorias de magnitudes distintas, diferencias que incluso producirán que unas no logren consolidarse. Una forma de ver que tan robustas son las memorias es mediante la extinción: mientras más robusta sea

una memoria, más ensayos de extinción se requieren para eliminar la respuesta condicionada, mientras más débil, se necesitaran menos.

Por otro lado, algo que se puede observar en el modelo, es que el umbral de consolidación no es estático, sino que se “aleja” con el tiempo. Esto se debe a que conforme transcurre el tiempo las proteínas fosforiladas, las cascadas de señalización, las sinapsis activadas etc. decrecen, por lo que cada vez es más difícil alcanzar el nivel necesario de actividad para superar dicho umbral.

En el modelo, las memorias representadas en las curvas 2.3, 3 y 3.1 decaen con el tiempo porque no alcanzaron el umbral de consolidación, sin embargo ¿esto significa que desaparecieron, que no se formó una memoria aversiva, o por el contrario que se formó una memoria segura? Desconocemos cuál de estas posibilidades es la que ocurre, sin embargo, para el caso particular de la formación de una memoria segura, un segundo ensayo de adquisición podría evidenciarla, ya que si en éste se presenta el fenómeno de inhibición latente se puede interpretar que efectivamente hubo formación de una memoria segura, si por el contrario se obtiene aversión, esto indicaría que durante la primera adquisición se formó una memoria neutra o una aversiva muy débil. En este sentido los experimentos ya mencionados de Chapuis y cols. (2007), dan un poco de luz al respecto; estos autores condicionaron ratas con presentación ortonasal o retronasal; lo interesante es que sus condiciones de adquisición con IIE pequeños eran insuficientes para generar aversión con una sola adquisición, sin embargo, con un segundo ensayo lo lograron obteniendo una aversión muy fuerte, esto sugeriría que en su caso no hubo formación de una memoria de lo seguro que interfiriera con la segunda adquisición/asociación. A pesar de esto, no se puede descartar que condiciones muy malas de adquisición den lugar a la formación de una memoria segura en lugar de una aversiva, o que con el paso del tiempo una memoria aversiva muy mala o una neutra den paso a una segura, por ejemplo ¿qué hubiera pasado si Chapuis y cols. en lugar de hacer la segunda adquisición el día siguiente la hubieran realizado varios días después?

Finalmente, ¿cuál es la diferencia entre la olfacción ortonasal y retronasal, y entre la retronasal y el sabor en el modelo propuesto? Como Tovar-Díaz y cols. (2011) y el presente trabajo lo muestran, entre los dos tipos de presentación de los odorantes no hay diferencias en la asociación de los estímulos sino en su consolidación, por tanto, la principal diferencia en términos del modelo gráfico es que el umbral de consolidación se encuentra más “abajo” en la presentación retronasal, por lo que es más fácil que logre la consolidación, permitiendo mejores MLP cuando las condiciones de adquisición subóptimas -como la reducción del EC, EI o el aumento del IIE-, son de la misma

magnitud en ambas presentaciones. Esto, también hace que sea más difícil encontrar las condiciones necesarias para poder facilitar la consolidación de la memoria por reactivación en la presentación retronasal. El que el umbral de consolidación este más “abajo” en la presentación retronasal se puede deber, como se ha mencionado, a que esta presentación activa una mayor cantidad de zonas cerebrales, por lo que el reclutamiento adicional que se logra de muchos mecanismos celulares en última instancia favorecen la consolidación. Las diferencias entre el olor retronasal y el sabor no solo se debe a que el umbral de consolidación se encuentre todavía más “abajo” en el segundo, sino que las curvas de memoria con condiciones similares seguramente son además de mayor magnitud, lo que permite que el sabor resista IIE aún más grandes que el olor retronasal. Además, algo que no refleja el modelo y que podría explicar las diferencias entre el olor y sabor, es la velocidad con la que se forma la memoria segura, o la diferente capacidad de esta memoria segura de interferir con las asociaciones aversivas entre ambos estímulos, formándose o interfiriendo más con los estímulos olfativos retronasales que con el sabor. Además algunas de las diferencias entre el olor retronasal y el sabor podrían ser explicadas con alguna variante de la teoría de “desintegración del trazo de memoria”.

11. CONCLUSIONES

La olfacción retronasal presenta diferencias importantes con la ortonasal, particularmente en la resistencia a grandes IIE y a la dificultad de evidenciar el fenómeno de facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo. Dichas diferencias se deben principalmente a que el CAO retronasal presenta una consolidación más eficiente que el CAO ortonasal.

Los receptores NMDA parecen jugar un papel secundario en la facilitación de la consolidación por evocación a corto plazo del CAO retronasal, por lo que otros sistemas de neurotransmisores pueden ser los principales responsables de este fenómeno.

12. LITERATURA CITADA

Abel T. y E. Kandel. 1998. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Research Reviews*, 26(2-3): 330-378.

Aguado L., 2001. Aprendizaje y Memoria. *Revista de Neurología*, 32: 373-381.

Albrecht J. y M. Wiesmann, 2009. Olfactory pathways. En Binder M., N. Hirokawa, y U. Windhorst (Eds.), *Encyclopedia of neuroscience* (pp: 3003–3006). Springer. Berlin.

Ambrogio L., E. Baldie, C. Bucherelli, B. Sacchetti y G. Tassoni, 1999. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71(1): 1-18.

Bailey C., D. Bartsch y E. Kandel, 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24): 13445-52.

Balderas I., V. Ramírez-Amaya y F. Bermúdez-Rattoni, 2004. Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Revista de Neurología*, 38(10): 944-948.

Barge, K. y D. Edwards, 1976. Olfactory bulb removal results in elevated spontaneous locomotor activity in mice. *Physiology & Behavior*, 16: 83-89.

Barot S., Y. Kyono, E. Clark e I. Bernstein, 2008. Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 20959–20963.

Batsell W. y A. Blankenship, 2002. Beyond potentiation: synergistic conditioning in flavor-aversion learning. *Brain and Mind*, 3:383-408.

Bear M., B. Connors y M. Paradiso, 2001. *Neuroscience. Exploring the brain*. 2ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.

Bermúdez-Rattoni F., A. Chávez, K. Coburn, J. Garcia, 1983b. The role of the amygdala cholinergic activity in taste potentiated odor aversion learning. *Society Neuroscience Abstracts*, 9: 827.

Bermúdez-Rattoni F., C. Grijalva, S. Kiefer y J. Garcia, 1986. Flavor-illness aversions: The role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiology & Behavior*, 38: 503–508.

Bermúdez-Rattoni F., K. Lee, J. Fernández, A. Chávez y J. Garcia, 1987. Potentiation of odor by taste and odor aversions in rats are regulated by cholinergic activity of dorsal hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 26(3): 553–559.

Bermúdez-Rattoni F., K. Rusiniak y J. Garcia, 1983a. Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behavioral and Neural Biology*, 37: 61–75.

Bermúdez-Rattoni F., M. Sánchez y R. Prado-Alcalá, 1989. Learning of external and visceral cue consequences may be subserved by different neuroanatomical substrates. En Archer T. y L. Nilssen (Eds.), *Aversion, avoidance and anxiety: perspectives on aversively motivated behavior* (pp: 121-134). Lawrence Erlbaum Associated Publisher, New Jersey.

- Bitterman M., 1975. The comparative analysis of learning. *Science*, 188: 699–709.
- Blanpied T., F. Boeckman, E. Aizenman y J. Johnson, 1997. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of Neurophysiology*, 77: 309–323.
- Bliss T. y T. Lomo, 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*, 232: 331–356.
- Bouton M. y E. Moody, 2004. Memory processes in classical conditioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7): 663-674.
- Bouton M., D. Jones, S. McPhillips y D. Shwartzentruber, 1986. Potentiation and overshadowing in odor-aversion learning: role of method of odor presentation, the distal–proximal cue distinction and the conditionability of odor. *Learning and Motivation*, 17(2): 115–138.
- Bouton, M. y M. Whiting, 1982. Simultaneous odor-taste and taste-taste compounds in poison-avoidance learning. *Learning and Motivation*, 13: 472–494.
- Brackley P., D. Bell, S. Choi, K. Nakanishi y P. Usherwood, 1993. Selective antagonism of native and cloned kainate and NMDA receptors by polyamine-containing toxins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266: 1573–1580.
- Bures J. y O. Buresova, 1990. Reversible lesions allow reinterpretation of system level studies of brain mechanisms of behavior. *Concepts in Neuroscience*, 1: 69–89.
- Bures J., F. Bermúdez-Rattoni y T. Yamamoto, 1998. Conditioned taste aversion: memory of a special kind. Oxford University Press, USA.
- Cammarota M., D. Barros, M. Vianna, L. Bevilaqua, A. Coitinho, G. Szapiro, L. Izquierdo, J. Medina e I. Izquierdo, 2004. The transition from memory retrieval to extinction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(3): 573-82.
- Carlson N., 2006. *Fisiología de la conducta* 8ª ed. Pearson Educación. Madrid.
- Chapuis J., B. Messaoudi, G. Ferreira, y N. Ravel, 2007. Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behavioral Neuroscience*, 121(6): 1383-1392.
- Chapuis J., S. Garcia, B. Messaoudi, M. Thevenet, G. Ferreira, R. Gervais, y N. Ravel, 2009. The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *The Journal of Neuroscience*, 29: 10287–10298.
- Chen P. y D. Wyllie, 2006. Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147: 839–853.
- Chitty D., 1954. The study of the brown rat and its control by poison. En Chitty D. (Ed.), *Control of rats and mice: Vol. 1* (pp. 160–299). Oxford, England: Clarendon Press.
- Cleland T. y C. Linster, 2003. Central olfactory structures. En Doty R. (Ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation* (pp. 165–181). Marcel Dekker, New York.
- Cull-Candy S. y D. Leszkiewicz, 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science*, 2004: 16.

- Cull-Candy S., S. Brickley y M. Farrant, 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11: 327-35.
- Curtis H., N. Barnes, A. Schnek y G. Flores, 2000. *Biología 6ª ed. Médica Panamericana*. Buenos Aires, Argentina.
- Davis H. y L. Squire, 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, 96: 518–559.
- Davis M., 1994. The role of the amygdala in emotional learning. *International Review of Neurobiology*, 36:225–266.
- Davis R., 2005. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annual Review of Neuroscience*, 28: 275-302.
- De la Fuente V., R. Freudenthal y A. Romano, 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *The Journal of Neuroscience*, 31(15): 5562-5573.
- Desgranges B., F. Lévy y G. Ferreira, 2008. Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Research*, 236(21): 166–175.
- Desgranges B., Y. Sevelinges, M. Bonnefond, F. Lévy, N. Ravel y G. Ferreira. 2009. Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 29(8): 1654–1662.
- Dingledine R, K. Borges, D. Bowie y S. Traynelis, 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51: 7–61.
- Dravid S., K. Erreger, H. Yuan, K. Nicholson, P. Le, P. Lyuboslavsky, A. Almonte, E. Murray, C. Mosely y J. Barber, 2007. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of Physiology*, 581: 107–128.
- Dudai Y. y M. Eisenberg, 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44(1): 93-100.
- Dudai Y., 2002. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 211–16.
- Dudai Y., 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55: 51-86.
- Dulac C. y A. Torello, 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 551–562.
- Dux P. y R. Marois, 2009. How humans search for targets through time: A review of data and theory from the attentional blink. *Attention, Perception, & Psychophysics*, 71(8): 1683-1700.
- Elton C., 1954. Research on rodent control by the bureau of animal population, September 1939 to July 1947. En Chitty D. (Ed.), *Control of rats and mice: Vol. 1* (pp. 1–23). Oxford, England: Clarendon Press.

Elton, C. y E. Laurie, 1954. A sample census of rats and house mice in English corn-ricks in January to July 1943–7. En D. Chitty (Ed.), *Control of rats and mice: Vol. 2* (pp. 449–468). Oxford, England: Clarendon Press.

Fernandez-Ruiz J., M. Miranda, F. Bermudez-Rattoni y R. Drucker-Colin, 1993. Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behavioral and Neural Biology*, 60: 189–191.

Ferreira G., R. Gutiérrez, V. De La Cruz y F. Bermúdez-Rattoni, 2002. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 16: 1139–1145.

Ferry B. y G. Di Scala, 1997. Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67: 80–83.

Ferry B. y G. Di Scala, 2000. Basolateral amygdala NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 114: 1005–1010.

Ferry B. y P. Duchamp-Viret, 2014. The orexin component of fasting triggers memory processes underlying food selection in the rat. *Learning & Memory*, 21: 185–189.

Ferry B., B. Roozendaal y J. McGaugh, 1999. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: A critical involvement of the amygdala. *Biological Psychiatry*, 46: 1140–1152.

Ferry B., F. Guillaume, N. Traissard y M. Majchrzak, 2006. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 120(5): 1180-1186.

Ferry B., G. Sandner y G. Di Scala, 1995. Neuroanatomical and functional specificity of basolateral amygdaloid nucleus in taste potentiated odor aversion. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64: 169–180.

Ferry B., K. Herbeaux, B. Cosquer, N. Traissard, R. Galani y J. Cassel, 2007. Immunotoxic cholinergic lesions in the basal forebrain reverse the effects of the entorhinal cortex lesions on conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88: 114-126.

Ferry B., P. Oberling, L. Jarrard y G. Di Scala, 1996. Facilitation of conditioned odor aversion learning by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 110: 443–450.

Ferry B., S. Wirth, G. Di Scala, 1999. Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 113: 118–125.

Freeman K. y A. Riley, 2009. *The Origins of Conditioned Taste Aversion Learning: A Historical Analysis*. En *Conditioned Taste Aversion; behavioral and neural processes*, Reilly S.y T. Schachtman (Eds).

Freeman R., C. Elton, P. Leslie, R. Ranson, J. Rzóska y V. Thompson, 1954. Properties of the poisons used in rodent control. En D. Chitty (Ed.), *Control of rats and mice: Vol. 1* (pp. 25–136). Oxford, Clarendon Press, England.

Furukawa H., S. Singh, R. Mancusso y E. Gouaux, 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438: 185–192.

- García J. y D. Kimeldorf, 1960. Some factors which influence radiation conditioned behavior of rats. *Radiation Research*, 12: 719–727.
- García J. y F. Ervin, 1968. Gustatory-visceral and telereceptor-cutaneous conditioning: adaptation in internal and external milieus. *Communications in Behavioral Biology, Part A*: 389–415.
- García J. y K. Rusiniak, 1980. What the nose learns from the mouth. Müller-Schwarze D. y R. Silverstein (Eds.), *Chemical Signals* (pp. 141-156). Plenum, New York, NY.
- García J. y R. Koelling, 1966. Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4(1): 123-124.
- García J., D. Kimeldorf y R. Koelling, 1955. Condition aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122(3160): 157-58.
- García J., F. Ervin y R. Koelling, 1966. Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science*, 5: 121–122.
- García J., N. Buchwald, C. Hull, y R. Koelling, 1964. Adaptive responses to ionizing radiation. *Boletín del Instituto de Estudios Médicos y Biológicos*, 22: 101–113.
- García J., P. Lasiter, F. Bermúdez-Rattoni y D. Deems, 1985. A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443: 8–21.
- García J., W. Hankins y K. Rusiniak, 1974. Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science*, 185: 824-831.
- Gutiérrez H., E. Hernández-Echeagaray, V. Ramírez-Amaya y F. Bermúdez-Rattoni, 1999. Blockade of N-methyl-d-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, 89: 751–758.
- Guzmán-Ramos K y F. Bermúdez-Rattoni, 2011. Post-learning molecular reactivation underlies taste memory consolidation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5: 79.
- Guzmán-Ramos K., D. Osorio-Gómez, P. Moreno-Castilla y F. Bermúdez-Rattoni, 2010. Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of Neurochemistry*, 114: 226–236.
- Hankins W., J. García y K. Rusiniak, 1973. Dissociation of odor and taste in bait shyness. *Behavioral Biology*, 8: 407–419.
- Hatfield T. y M. Gallagher, 1995. Taste potentiated odor conditioning: Impairment produced by infusion of an N-methyl-d-aspartate antagonist into basolateral amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 109: 663–668.
- Hatfield T., P. Graham y M. Gallagher, 1992. Taste potentiated odor aversion learning: Role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behavioral Neuroscience*, 106: 286–293.
- Hoffman K. y B. McNaughton, 2002. Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. *Science*, 297: 2070–2073.

Huettner J. y B. Bean, 1988. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 1307–1311.

Ida M., 1984. An analysis of potentiation in flavor-aversion learning. *Journal of Child Development*, 20: 6–12.

Inui T., T. Shimura y T. Yamamoto, 2006. Effects of brain lesions on taste-potentiated odor aversion in rats. *Behavioral Neuroscience*. 120: 590–599.

Isaacson J., 2010. Odor representations in mammalian cortical circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(3): 328-31.

Jackson A. y D. Sanger, 1989. Conditioned taste aversions induced by phencyclidine and other antagonist of N-methyl-d-aspartate. *Neuropharmacology*, 28: 459–464.

Jancsár S. y B. Leonard, 1984. Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 8(2): 263–269.

Jerusalinsky D., E. Kornisiuk e I. Izquierdo, 1997. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochemical Research*, 22(4): 507-1515.

Kalat J. y P. Rozin, 1971. Role of interference in taste-aversion learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 77: 53-58.

Kalat J. y Rozin P. 1973. "Learned safety" as a mechanism in long-delay taste-aversion learning in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 83(2): 198-207.

Kalat J., 1971. The CS-US delay gradient as a learning curve. Unpublished doctoral dissertation, University of Pennsylvania.

Kandell E., J. Schwartz, T. Jessell, 2001. *Principios de Neurociencia*. 4ª ed. McGraw-Hill Interamericana, España.

Kiefer S., K. Rusiniak y J. Garcia, 1982. Flavor-illness aversions: gustatory neocortex ablations disrupt taste but not taste-potentiated odor cues. *J. Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96: 540–548.

Kimble G., 1961. *Hilgard and Marquis' Conditioning and Learning*. 2nd Edition. New York: Appleton-Century-Crofts.

Klosterhalfen W. y S. Klosterhalfen, 1985. Conditioned taste aversion and traditional learning. *Psychological Research*, 47: 71–94.

Köhr G., 2006. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and Tissue Research*, 326: 439–446.

Krane R. y A. Wagner, 1975. Taste aversion learning with a delayed shock US: implications for the generality of the laws of learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88: 882–889.

Kritis A., E. Stamoula, K. Paniskaki y T. Vavilis, 2015. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9: 1-18.

- Kwok D. y R. Boakes, 2015. Proximal, but not distal, pre-exposure reduces serial overshadowing in one-trial taste aversion learning. *Behavioral Processes*, 118: 111-114.
- Kyriazakis I., B. Tolkamp y G. Emmans, 1999. Diet selection and animal state: an integrative framework. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58: 765-772.
- Lamprecht R. y J. LeDoux, 2004. Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 45-54.
- Lasiter P., D. Deems y J. Garcia, 1985. Involvement of the anterior insular gustatory neocortex in the taste-potentiated odor aversion learning. *Physiology & Behavior*, 34: 71-77.
- Lavond D., J. Kim y R. Thompson, 1993. Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *Annual Review of Psychology*, 44: 317-342.
- LeDoux J., 1994. Emotion, memory and the brain. *Scientific American*, 270: 50-57.
- Leonard B. y M. Tuite, 1981. Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *International Review of Neurobiology*, 22: 251-286.
- Liang K., W. Hon y M. Davis, 1994. Pre- and post-training infusion of N-methyl-d-aspartate receptor antagonists into the amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task. *Behavioral Neuroscience*, 108: 241-253.
- Lin J., C. Roman y S. Reilly, 2009. Taste-potentiated odor aversion learning in rats with lesions of the insular cortex. *Brain Research*, 1297: 135-142.
- Lorden J., M. Kenfield, y J. Braun, 1970. Response suppression to odors paired with toxicosis. *Learning and Motivation*, 1: 391-400.
- Lubow R. y A. Moore, 1959. Latent inhibition: The effect of nonreinforced preexposure to the conditioned stimulus. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1959(52): 415-419.
- Lumia A., A. Zebrowski, y M. McGinnis, 1987. Olfactory bulb removal decreases androgen receptor binding in amygdala and hypothalamus and disrupts masculine sexual behavior, *Brain Research*, 404: 121-126.
- Lumia A., B. Possidente, L. DeLemos, L. Sterner, M. McGinhis y M. Teicher, 1988. Olfactory bulbectomy disrupts circadian rhythms and aggression in male mice, *Society Neuroscience Abstracts*, 2(14): 908.
- Lumia A., H. M. Teicher, F. Salchli, E. Ayers y B. Possidente, 1992. Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Author links open the overlay panel. Numbers correspond to the affiliation list which can be exposed by using the show more link. Brain Research*, 587(2): 181-185.
- Maier S., D. Zahorik, y R. Albin, 1971. Relative novelty of solid and liquid diet during thiamine deficiency determines development of thiamine-specific hunger. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 74: 254-262.
- Maren S, y M. Fanselow, 1996. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*, 16: 237-240.

- Martin S., P. Grimwood y R. Morris, 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, 23: 649–711.
- McEntee W. y T. Crook, 1993. Review: Glutamate: Its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 111: 391–401.
- McGaugh J. y B. Introini-Collison, 1987. Hormonal and neurotransmitter interactions in the modulation of memory storage: involvement of the amygdala. *International Journal of Neurology*, 21(22): 58–72.
- McLaurin W. y B. Scarborough, 1963. Extension of the interstimulus interval in saccharin avoidance conditioning. *Radiation Research*, 20: 317–323.
- McLaurin W., J. Farley, y B. Scarborough, 1963. Inhibitory effect of preirradiation saccharine habituation on conditioned avoidance behavior. *Radiation Research*, 1963(18): 473-478.
- Mikulka P., E. Pitts y C. Philput, 1982. Overshadowing not potentiation in taste aversion learning. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 20: 101–104.
- Miller J., A. Nonneman, K. Kelly, J. Neisewander y W. Isaac, 1986. Disruption of neophobia, conditioned odor aversion, and conditioned taste aversion in rats with hippocampal lesions. *Behavioral and Neural Biology*, 45(2): 240–53.
- Miranda M., B. Ferry y G. Ferreira, 2007. Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88: 260–263.
- Miranda M., G. Ferreira, L. Ramírez-Lugo y F. Bermúdez-Rattoni, 2002. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 11417–11422.
- Monaghan D. y C. Cotman, 1985. Distribution of N-Methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H] Glutamate-binding Sites in Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*, 5(11): 2909-2919.
- Mori K., H. Nagao, y Y. Yoshihara, 1999. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 286: 711–715.
- Morris R., E. Anderson, G. Lynch y M. Baudry, 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist. AP5. *Nature*, 319: 774–776.
- Murata S. y K. Kawasaki, 1993. Common and uncommon behavioral effects of antagonists for different modulatory sites in the NMDA receptor/channel complex. *European Journal of Pharmacology*, 239: 9–15.
- Murphy C, W. Cain y L. Bartoshuk, 1977. Mutual action of taste and olfaction. *Sens Processes*, 1: 204–211.
- Nachman M. y J. Anddoyle, 1974. Learned taste aversions over long delays in rats: the role of learned safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(5): 949-956.
- Nader K y O. Hardt, 2000. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(3): 224-34.

- Neely A. y C. Lingle, 1986. Trapping of an open-channel blocker at the frog neuromuscular acetylcholine channel. *Biophysical Journal*, 50: 981–986.
- Novak L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet y A. Prochiantz, 1994. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307: 460–462.
- Nusser Z., 2000. AMPA and NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution. *Current Opinion in Neurobiology*, 10: 337–341.
- Otto T., F. Schottler, U. Staubli, H. Eichenbaum y G. Lynch, 1991. Hippocampus and Olfactory Discrimination Learning: Effects of Entorhinal Cortex Lesions on Olfactory Learning and Memory in a Successive-Cue, Go–No-Go Task. *Behavioral Neuroscience*, 105(1): 111-119.
- Palmerino C., K. Rusiniak y J. Garcia, 1980. Flavor-illness aversions: The peculiar role of odor and taste in memory for poison. *Science*, 208: 753–755.
- Paoletti P., 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, 33: 1351–1365.
- Parsons C., G. Quack, I. Bresink, L. Baran, E. Przegalinski, W. Kostowski, P. Krzascik, S. Hartmann y W. Danysz, 1995. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology*, 34: 1239–1258.
- Pedreira M. y Maldonado H., 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38: 863-889.
- Pierce J. y B. Halpern, 1996. Orthonasal and retronasal odorant identification based upon vapor phase input from common substances. *Chemical Senses*, 21: 529–543.
- Quiroz A., 2006. Participación del glutamato y el óxido nítrico en el bulbo olfatorio durante el aprendizaje aversivo al olor. Tesis de maestría, Fac. Medicina UNAM, México D.F.
- Raineki C., K. Shionoya, K. Sander y R. Sullivan, 2009. Ontogeny of odor-LiCl vs. Odor-shock learning: similar behavioral but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learning & Memory*, 16(2): 114-21.
- Reilly S. y M. Bornovalova, 2005. Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 1067–1088.
- Rescorla R., 1971. Summation and retardation tests of latent inhibition. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1971(75): 77-81.
- Revusky S. y E. Bedarf, 1967. Association of illness with prior ingestion of novel foods. *Science*, 155: 219–220.
- Revusky S. y J. Garcia, 1971. Generalized associations over long delays. En Bower G. y J. Spence (Eds.), *Psychology of learning and motivation 0. Learning in research and theory: Vol. 4* (pp. 1–84). Academic Press, New York. Adv
- Revusky S., 1971. The role of interference in association over a delay. En Honig W. y H. James (Eds.), *Anim.*

- Riedel G., B. Platt y J. Micheau, 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioral Brain Research*, 140, Issues 1–2(18): 1–47.
- Robinson G. y G. Reed, 1992. Effect of MK-801 on the induction and subsequent decay of long-term potentiation in the unanesthetized rabbit hippocampal dentate gyrus. *Brain Research*, 569: 78–85.
- Robinson G., G. Crooks, P. Jr. Shinkman, y M. Gallagher, 1989. Behavioral effects of MK-801 mimic deficits associated with hippocampal damage. *Psychobiology*, 17: 156–164.
- Roman C., N. Nebieridze, A. Sastre y S. Reilly, 2006. Effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis, lateral hypothalamus, or insular cortex on conditioned taste aversion and conditioned odor aversion. *Behavioral Neuroscience*, 120: 1257–1267.
- Rosellini R., J. DeCola y R. Lashley, 1981. Overshadowing and potentiation of odor by taste: The role of stimulus saliency. Paper presented at the meeting of the Psychonomic Society, Philadelphia.
- Rozin P. y J. Kalat. 1971. Specific hungers and poison avoidance as adaptive specializations of learning. *Psychological Review*, 78: 459–486.
- Rozin P. y P. Ree, 1972. Long extension of effective CS-US interval by anesthesia between CS and US. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1972(80): 43–48.
- Rozin P., 1982. Human food selection: The Interaction of biology, culture and individual experience. En Barker L. (Ed.), *The psychobiology of human food selection* (pp. 225–254). AVI, Westport, CT.
- Rusiniak K., W. Hankins, J. Garcia y L. Brett, 1979. Flavor–illness aversions: Potentiation of odor by taste in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 25: 1–17.
- Rzóska J. 1954 (b). Stomach analysis of Brown rats poisoned in the field. En Chitty D. (Ed.). *Control of rats and mice: Vol. 2*, (pp. 395–413). Oxford, Clarendon Press, England.
- Rzóska J., 1954 (a). Bait shyness, a study in rat behavior. *British Journal of Animal Behavior*, 1: 128–135.
- Salamon E., 2002. Mechanisms of knowledge learning and acquisition. *Medical Science Monitor*, 8(7): 133–139.
- Sánchez H., 2010. Persistencia de la memoria a largo plazo en un aprendizaje aversivo al olor débil. Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias UNAM, México D.F.
- Schorge S. y D. Colquhoun, 2003. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of Neuroscience*. 23: 1151–1158.
- Sclafani A., 1997. Learned controls of ingestive behaviour. *Appetite*, 29: 153–158.
- Seligman M., 1970. On the generality of the laws of learning. *Psychological Review*, 77: 406–418.
- Sevelinges Y., B. Desgranges y G. Ferreira, 2009. The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory. *Learning & Memory*, 16: 235–242.
- Sheng M. y M. Kim, 2002. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*, 298: 776–780.

Shepherd G., W. Chen y C. Greer, 2004. "Olfactory bulb," in *The Synaptic Organization of the Brain*. En Shepherd G. (Ed.), Oxford University Press (pp: 165–216), New York, NY.

Shionoya K. y Datiche F., 2009. Inactivation of the basolateral amygdala impairs the retrieval of recent and remote taste-potentiated odor aversion memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(4): 590–596.

Slotnick B., R. Westbrook y F. Darling, 1997. What the rat's nose tells the rat's mouth: long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of tastes by odors. *Animal Learning & Behavior*. 25: 357–369.

Small D. y J. Prescott, 2005. Odor/taste integration and the perception of flavor. *Experimental Brain Research*, 166: 345–357.

Small D., J. Gerber, Y. Mak y T. Hummel, 2005. Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron*, 47: 593–605.

Solis C., 2003. Papel de los receptores tipo NMDA en el aprendizaje olfativo. Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias. UNAM, México D.F.

Squire L., 1986. Mechanisms of memory. *Science*; 232(4758): 1612-1619.

Squire L., 1987. *Memory and brain*. Oxford University Press. New York, USA.

Staddon J., 1983. *Adaptative behavior and learning*. Cambridge: Cambridge University Press.

Summers M., S. Crowe y T. Kim, 2003. Memory retrieval in the day-old chick: a psychobiological approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27: 219-231.

Sutherkand R. y H. Lehmann, 2011. Alternative conceptions of memory consolidation and the role of the hippocampus at the systems level in rodent. *Current Opinion in Neurobiology*, 21: 1-6.

Thorndike E., 1932. *Fundamentals of learning*. New York: Bureau of Publications, Teachers College of Columbia University, 1932.

Tovar J., 2011. Participación de los distintos subtipos de receptores muscarínicos en el aprendizaje aversivo al olor. Tesis de Doctorado, Fac. Medicina. UNAM, México D.F.

Tovar-Díaz J., H. González-Sánchez y G. Roldán-Roldán, 2010. Association of stimuli at long intervals in condition odor aversion. *Physiology & Behavior*, 103: 144-147.

Traverso L., G. Ruiz y L. De la Casa, 2003. Latent inhibition disruption by MK- 801 in a conditioned taste-aversion paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80: 140-146.

Traynelis S., L. Wollmuth, C. McBain, F. Menniti, K. Vance, K. Ogden, K. Hansen, H. Yuan, S. Myers, R. Dingledine y D. Sibley, 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62: 405–496.

Ulbrich M. y E. Isacoff, 2008. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 14163–14168.

Weismann M., I. Yousry, E. Heuberger, A. Nolte, J. Ilmberger, G. Kobal, T. Yousry, B. Kettenmann y T. Naidich, 2001. Functional magnetic resonance imaging of human olfaction. *Neuroimaging Clinics of North America*, 11(2): 237 -250.

Welzl H., P. D'adamo y H. Lipp, 2001. Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125: 205–213.

Willner J., M. Gallagher, P. Graham y G. Crooks, 1992. N-methyl-D-aspartate antagonist D-APV selectively disrupts taste-potentiated odor aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2): 315-323.

Wilson D. y R. Sullivan. 1994. Neurobiology of associative learning in the neonate: Early olfactory learning. *Behavioral and Neural Biology*, 61(1): 1-18.

Wirth S. B. Ferry y G. Di Scala. 1998. Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behavioural Brain Research*. 91: 49–59.

Wittlin W. y K. Brookshire, 1968. Apomorphine-induced conditioned aversion to a novel food. *Psychonomic Science*, 12: 217-218.

Wolf N., 1998. A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology*, 55(1): 59-77.

Yamamoto T. y Y. Fujimoto, 1991. Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Research Bulletin*, 27: 403–406.

Yasoshima Y. y T. Yamamoto, 1998. Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neuroscience*, 284: 1–5.

ANEXO I

Modelos para explicar la resistencia a grandes intervalos interestímulo en el condicionamiento aversivo al sabor

Cuatro son los principales modelos que se han propuesto (Kalat y Rozin, 1973; Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1985):

- 1) Teoría del regusto, propuesta por Bitterman (1975); sugería que a pesar de que se utilizara un IIE largo entre el estímulo gustativo y el veneno, la presencia de algún rastro del sabor, el “regusto” en la cavidad oral, el estómago, la sangre o por medio de regurgitación, provocaría que la demora no fuera tan prolongada como se suponía, por lo que esta explicación negaba la posibilidad real de que los estímulos gustativos sean asociables con IIE largos. Desde hace mucho, una serie de evidencias indicaron claramente que esta interpretación era equivocada, y que no juega ningún papel (para revisiones de la evidencia ver Revusky y Garcia, 1970 y Rozin y Kalat, 1971).
- 2) Otra teoría alternativa propuesta por Revusky y Garcia (1970) y Revusky (1971) consiste en una reinterpretación del gradiente de demora normal entre el EC y EI, utilizando el principio de "pertenencia" o "preparación" (Seligman, 1970; Thorndike, 1932). Su idea se apoya en los descubrimientos de Garcia y Koelling (1966) de que los sabores se asocian fácilmente con malestar visceral pero no con descargas eléctricas, mientras que los estímulos audiovisuales se asocian fácilmente con los choques, pero no con el malestar visceral. De acuerdo con este principio, ciertos estímulos son preferentemente asociados con otros de una manera más o menos específica -en este caso el sabor con el envenenamiento- (Garcia y Koelling, 1966). Revusky postuló que el gradiente de demora EC-EI refleja el hecho de que un EI se asocia con el EC potencial más reciente; por lo general un EI es fácilmente asociable con una amplia variedad de estímulos (visuales, auditivos, propioceptivos, y otras señales). Al estar los animales constantemente bombardeados con muchos estímulos, cualquier aumento del IIE reduce la posibilidad de que el estímulo seleccionado a convertirse en EC lo haga, ya que estímulos más recientes pueden ser los que logren asociarse (Kalat y Rozin, 1971). Aunque esta teoría puede ser parcialmente cierta y tiene claras implicaciones en el fenómeno nombrado

“ensombrecimiento” en el CAS (Kwok y Boakes, 2015), parece predecir que el aprendizaje puede ocurrir con retrasos ilimitados mientras no haya interferencia por algún sabor, sin embargo esto no ocurre así (Kalat y Rozin, 1971).

- 3) Teoría del decaimiento/desintegración del trazo, propuesta por Krane y Wagner (1975) sostiene que la huella de memoria del EC se desintegra poco a poco durante el IIE, de tal manera que después de cierto tiempo es demasiado débil para ser asociable con el EI. Una posible variante de esta teoría, es que la memoria haya alcanzado suficiente grado de consolidación, por lo que es incapaz de interactuar con la señalización del EI y asociarse con él.
- 4) Teoría del aprendizaje de lo seguro, dice que durante el retraso con IIE crecientes se genera una curva de aprendizaje: entre más se incremente el IIE la rata aprende gradualmente que el sabor es seguro, por lo que más que un desvanecimiento de la huella de memoria del sabor, el efecto se debe a una reclasificación de la misma por el aprendizaje (Rozin y Kalat 1971 y Kalat y Rozin, 1973). Esta teoría explica el fenómeno de inhibición latente; una disminución en el rendimiento del aprendizaje como resultado de la preexposición segura no reforzada del estímulo a ser condicionado (Lubow y Moore, 1959).

Cabe señalar que los últimos dos modelos interpretan el gradiente de la demora como una falla en la asociabilidad de los estímulos -lo que sigue siendo una idea ampliamente aceptada-. El desacuerdo se refiere a la naturaleza del proceso que subyace al gradiente de la demora; mientras que la teoría de la “desintegración del trazo” representa un proceso de olvido, la teoría del “aprendizaje de lo seguro” representa, como su nombre lo indica, un proceso de aprendizaje, es decir, con largas demoras entre el sabor y la intoxicación estos no se asocian, no porque el animal haya olvidado el sabor, sino porque durante este tiempo ha aprendido que éste es seguro (Kalat y Rozin, 1973 y Nachman y Anddoyle, 1974).

Hay varias evidencias en favor de la “teoría de la seguridad aprendida”, como la demostración de que las ratas al ser anestesiadas durante el IIE, pueden aprender aversiones gustativas con intervalos aún mayores, lo que se puede explicar cómo una reducción del aprendizaje de seguridad (Rozin y Ree, 1972). Una segunda línea de evidencia proviene de estudios sobre el efecto de la novedad del gusto y su facilidad para generar aversiones condicionadas: Por un lado, las ratas tienen una fuerte tendencia a asociar el envenenamiento con sabores novedosos más que con los familiares, incluso si

el sabor familiar esta temporalmente más cerca de la administración del veneno (Garcia *et al.*, 1955; Maier *et al.*, 1971; McLaurin *et al.*, 1963; Revusky y Bedarf, 1967; Kalat, 1971; y Revusky y Bedarf, 1967; Wittlin y Brookshire, 1968). La interpretación que da el modelo de “seguridad aprendida” es que el sabor familiar se ha asociado con la falta de consecuencias negativas por su ingestión, es decir, se ha asociado con “la seguridad”, dicho aprendizaje de alguna manera interferiría con el nuevo aprendizaje de que es tóxico (Kalat y Rozin, 1973). Además, el que una sola exposición de un sabor sea suficiente para que sea catalogado como familiar, y que esta memoria dure más de 21 días, contraviene lo que el modelo de “desintegración” postula (Kalat y Rozin, 1973).

A pesar de que la teoría de “seguridad aprendida” explica varios fenómenos y hay evidencias que la apoyan, se debe considerar que Nachman y Anddoyle (1974) publicaron una serie de experimentos diseñados para poner a prueba la hipótesis de la seguridad aprendida y definir sus límites mediante la extinción del CAS, esta puede ser interpretada como la formación de una memoria de que el sabor es seguro. Encontraron que la aversión después de un ensayo de extinción, es inversamente proporcional al tiempo que tarda una segunda prueba de evocación, esto puede ser interpretado como una curva de aprendizaje en la que conforme transcurre el tiempo la formación de la memoria de seguridad se va consolidando y puede dar cuenta de los efectos de grandes IIE en el CAS. Sin embargo, en otro experimento, estos autores utilizaron ratas con amplia experiencia en un sabor (su “aprendizaje de seguridad” había alcanzado un nivel asintótico), y encontraron que al condicionarlas aversivamente con varios IIE (4, 15, 30, 60, 120, 240 o 480 min), la aversión seguía disminuyendo con el aumento del IIE, por lo que el modelo de “seguridad aprendida” no es suficiente para explicar completamente el gradiente de la memoria cuando se incrementa el IIE (Nachman y Anddoyle, 1974).

Otro aspecto que se debe considerar sobre la teoría de la “seguridad aprendida”, es que Rescorla (1971) sugirió que la inhibición latente es un término inapropiado para el fenómeno que nombra, ya que el estímulo no se convierte en inhibitorio, sino que se vuelve menos relevante. Según esta idea después de un estímulo que no es seguido de consecuencias adversas, o estas están suficientemente retrasadas, la rata no aprendería que "el estímulo significa ningún choque" ya que el estímulo no se convertiría en una señal para la seguridad, más bien aprendería "este estímulo predice nada, no necesito prestar atención a él". Sin embargo Kalat y Rozin (1973) piensan que es posible que haya una diferencia fundamental entre los sabores y otros estímulos, tal vez una rata incluso sin experiencias previas, es más temerosa a nuevos sabores que a estímulos de otras modalidades, por

lo que cuando experimentan un sabor novedoso sin consecuencias aprenderían que es seguro, mientras que bajo condiciones análogas aprenderían que otros estímulos son "sin sentido". Es difícil saber cuál de estas dos posibilidades es la correcta, ya que las pruebas de Rescorla (1971) son difíciles de aplicar a los sabores, debido a la dificultad para demostrar preferencias aprendidas (Rozin y Kalat, 1971). Independientemente de si las ratas aprenden que los estímulos son seguros o que no predicen nada, Kalat y Rozin (1973) proponen que el mecanismo del gradiente con retrasos entre los estímulos se trata de un proceso de aprendizaje y no del decaimiento del trazo de memoria.

A pesar de que la teoría del aprendizaje de lo seguro explica convenientemente algunos fenómenos del CAS cuando se incrementa el IIE, se debe hacer ver que en realidad esta teoría –u otras de las mencionadas- no explican satisfactoriamente las diferencias de la resistencia a largos IIE de este condicionamiento con respecto a otros tipos de aprendizaje asociativo. Sobre estas diferencias, lo más que se atreven a sugerir Kalat y Rozin (1973) es que el gradiente característico que se forma con grandes IIE en el CAS, refleja la lentitud con la que el proceso de aprendizaje de lo “seguro” opera para el caso de los sabores, y consideran que existen mecanismos similares en otros sistemas. En este sentido, para que la teoría del “aprendizaje de lo seguro” -u otra teoría- fuese explicativa de las diferencias en los distintos aprendizajes asociativos a los IIE largos, se debe asumir que el modelo que proponen presenta variaciones dependiendo del tipo aprendizaje, sin embargo, es difícil imaginar como responsable de estas diferencias a la formación de “memorias seguras” que interfieran con las asociaciones, ya que aunque este proceso al ser lento en el caso del sabor podría explicar su gran resistencia a grandes IIE, en otros tipos de aprendizajes donde los intervalos efectivos son del orden de segundos, es imposible pensar que la formación de “memorias seguras” puedan ocurrir tan rápido.

Como se puede ver, sigue sin ser explicada hasta nuestros días la particularidad del CAS a resistir grandes IIE. Seguramente no se deben de considerar como excluyentes algunas de las teorías que se han propuesto a este respecto, sino como complementarias; en este sentido la teoría de interferencia y la teoría de la seguridad aprendida explican varios fenómenos del CAS y junto con explicaciones ya no fenomenológicas sino fisiológicas harán que entendamos esta singularidad del CAS y del CAO retronasal.

ANEXO II

Estudios neuroanatómicos del condicionamiento aversivo al olor

❖ Amígdala:

Son pocos los estudios que se han hecho con inactivaciones o lesiones extensas en el complejo de la amígdala que abarquen varios de sus núcleos: Bermúdez-Rattoni y cols. (1983a) reportaron que la administración de procaína (bloqueador de canales de sodio [3 µl 10%]) en el centro del complejo de la amígdala (incluía el núcleo BLA, basomedial, lateral y central) 30 min antes del EC impide el CAO potenciado sin afectar el CAS y produjo un déficit en el CAO ortonasal -todo evaluado a largo plazo-. Curiosamente encontraron que si la administración de procaína la hacían después del EC (2 o 27 min) se tendió a aumentar la aversión al sabor y al olor potenciado y se extinguía más lentamente⁵, además, aumentó la neofobia hacia el complejo olor-sabor. Ese mismo año Bermúdez-Rattoni y cols. (1983b) administraron fisostigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa) o escopolamina (inhibidor de los receptores muscarínicos). Encontraron que la fisostigmina inhibió el CAO potenciado sin afectar el CAS, mientras que la escopolamina no tuvo ningún efecto significativo. Posteriormente Bermúdez-Rattoni y cols. (1986) reportaron que lesiones electrolíticas amplias en la amígdala impiden el CAO ortonasal, CAO potenciado y CAS evaluado tres días después, además disminuyó la neofobia a los olores, sabores o cuando el olor y sabor se presentaban juntos. Más recientemente Inui y cols. (2006) también encontraron que lesiones excitotóxicas con ácido iboténico que abarcaban los núcleos central, basolateral y lateral de la amígdala impiden el CAO retrorrenal potenciado y el CAS cuando se evocan a largo plazo.

Estos primeros estudios sugirieron la participación del complejo amigdalino en el condicionamiento aversivo olfativo por vía ortonasal, en su potenciación por el sabor y en la neofobia. Sin embargo en el estudio ya mencionado de Bermúdez-Rattoni y cols. (1986), practicaron además lesiones electrolíticas en núcleos aislados de la amígdala, encontrando que solo las lesiones de los núcleos lateral-basolateral y no las del medial-basomedial ni central, impidieron el CAO potenciado por el sabor sin afectar el CAS, además, ninguna de las lesiones de los núcleos aislados afectó la neofobia.

⁵Ningún estudio posterior ha encontrado/buscado el efecto facilitador reportado por Bermúdez-Rattoni y cols. en 1983.

Después de los primeros estudios de la amígdala, la mayoría de los que involucran esta estructura se han hecho utilizando la vía retronasal y la PAOS y se han centrado en el núcleo basolateral (BLA), por lo que proseguiremos con este núcleo y luego con los otros.

Usando la vía ortonasal Ferry y cols. (1999) reportaron que la administración de Muscimol en la BLA [10 ng] 5 min después del olor no afectó el CAO. En este sentido todos los estudios que se han realizado por la vía retronasal han encontrado que la administración de fármacos como el propranolol (antagonista β -adrenérgico [1 μ g/0.2 μ l]), anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas [62.5 μ g/0.5 μ l] o muscimol (agonista de los receptores GABAA [0.25 μ g/ 0.25 μ l]) en la BLA, evitan el CAO cuando se evoca a largo plazo solo si son administrados antes del olor (0.01% acetato de isoamilo), y no tienen efecto si son administrados entre los dos estímulos, aunque sea inmediatamente después del EC (Miranda *et al.*, 2007; Desgranges *et al.*, 2008 y Sevelinges *et al.*, 2009). La falta de evocación a corto plazo de la mayoría de los estudios ha hecho que estas deficiencias observadas sean interpretadas como una falla en la persistencia a corto plazo del trazo de memoria del EC, como lo hacen Miranda y cols. (2007) y Sevelinges y cols. (2009). Sin embargo, Desgranges y cols. (2008) administraron anisomicina antes del EC [62.5 μ g/0.5 μ l], y encontraron aversión a corto plazo (4 h después de la adquisición), y falta de ésta a largo plazo (3 días después), lo que indica que **la anisomicina y tal vez los otros fármacos en la BLA interfieren con la consolidación, en lugar de solamente con la representación a corto plazo del EC**. Sin embargo dada la falta casi total de experimentos con evocaciones a corto plazo en los otros estudios que involucran a la BLA, a la amígdala en su conjunto -o en general a las demás estructuras-, no se puede asegurar esto, además, se debe considerar que el hecho de afectar la adquisición de los estímulos o su asociación puede hacer que se presente una MCP aparentemente buena, y que a pesar de esto no se alcance a consolidar en una MLP. El que la administración de los fármacos después del EC y antes del EI no afecte el CAO retronasal, parece indicar que **la BLA no participa –directamente- en la integración del EC con el EI** (Miranda *et al.*, 2007 y Desgranges *et al.*, 2008). Sin embargo en esta estructura converge tanto la información visceral como la olfativa y algunos autores creen que allí se lleva a cabo la asociación de los estímulos en el CAO (Ferry y Di Scala, 1997).

Por otro lado la información que ha aportado el uso del modelo de la PAOS sobre la BLA coinciden en general con lo encontrado en el CAO, ya que las lesiones electrolíticas, el daño excitotóxico por ácido iboténico o por NMDA, la administración de muscimol [10 ng/ 0.2 μ l], 6-hidroxidopamina (produce una destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas [4 μ g/0.5 μ l]) o de APV (D,L-2-

2-amino-5-fosfonovalerato, un antagonista competitivo de los receptores NMDA [0,05 o 0,50 µg/ 0.2 µl]) antes de la presentación del EC en la BLA afecta la aversión potenciada al olor sin alterar el CAS (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1986; Ferry *et al.*, 1995; Fernández-Ruiz *et al.*, 1993; Ferry y Di Scala, 2000; Hatfield y Gallagher, 1995 y Hatfield *et al.*, 1992). Sin embargo, a diferencia de Sevelinges y cols. (2009), Ferry y cols. (1995) en un CAO retronasal encontraron efecto cuando administraron el mismo fármaco; muscimol [10 ng/0.2 µl] después del EC. Dicha diferencia se puede deber a que, como se mencionó anteriormente, la presentación retronasal parece reclutar más estructuras durante la adquisición de lo que hace la ortonasal. Por otro lado, se debe considerar que no se hicieron evocaciones a corto plazo en ninguno de los experimentos de la PAOS.

En cuanto a la participación de la BLA en la evocación del CAO, los datos que se han reportado son contradictorios, ya que la administración de propranolol [1 µg/0.2 µl] no afectó la evocación del CAO retronasal (Miranda *et al.*, 2007), ni la administración de muscimol [10ng/ 0.2 µl] o APV [0,05 o 0,50 µg/ 0.2 µl] afectaron la evocación del CAO potenciado por un sabor (Ferry *et al.*, 1995, Ferry y Di Scala, 2000, Hatfield y Gallagher, 1995). Mientras que, contrario a esto, se encontró efecto con la administración de muscimol [0.25 µg/ 0.25 µl] en la evocación del CAO retronasal (Sevelinges *et al.*, 2009) y con lidocaina (un bloqueador de los canales de sodio [4%]) en el CAO potenciado (Shionoya y Datiche, 2009).

Aunque no queda claro si la BLA juega un papel en la evocación del CAO por los reportes contradictorios, se debe considerar que de ser el caso, esta estructura podría tener dos papeles diferentes: que intervenga en la recuperación de la memoria del CAO o que almacene parte del engrama. La primera se refiere a que sea una estructura que comunique o regule durante la evocación la actividad de otras que almacenan directamente el engrama del CAO, mientras que la segunda implicaría que la codificación del EC y/o EI y/o su asociación estén almacenados, al menos en parte, en la BLA propiamente. Actualmente es difícil descartar alguna de estas posibilidades.

En resumen parece ser que **uno de los papeles más importante y consistentes de la BLA en el CAO es la consolidación de la memoria**. Un estudio que apoya este papel es el de Ferry y Di Scala (1997), quienes investigaron el efecto de la microinyecciones de metioduro de bicuculina (antagonista de los receptores GABAA [39 o 59 pmol/0.2 µl]) en esta estructura 5 min después de la presentación del estímulo condicionado (aroma de almendras ortonasal), el cual fue seguido 30 minutos más tarde, por una toxicosis inducida por LiCl. Considerando que en estas condiciones experimentales las ratas control y con 39 pmol de bicuculina no desarrollaron condicionamiento

aversivo al olor, y que las ratas tratadas con 59 pmol si lo hicieron, esto sugiere que el bloqueo de los receptores GABA_A facilitó el aprendizaje dependiendo de la concentración, ya que la administración de bicuculina (59 pmol) no funcionó como EI *per sé*. Estos autores sugieren que el bloqueo de los receptores GABA_A puede prolongar la duración del trazo olfativo, por lo que se volvería accesible a la asociación con la toxicosis retardada, y que en combinación con resultados anteriores se apoyaría la hipótesis de que el sistema GABAérgico de la BLA ejerce control sobre la duración de corto plazo del trazo de memoria del olor en el paradigma del CAO –aunque como se menciona en la introducción esta hipótesis se tiene que replantear-.

Los últimos datos parecen indicar que durante el condicionamiento aversivo, la inhibición de la BLA (por ej. por medio de la transmisión gabaérgica) daña el aprendizaje, principalmente la consolidación -puede ser desde la adquisición-, y que su activación potencia el condicionamiento aversivo. La actividad diferencial de la BLA en los distintos tipos de condicionamiento aversivo alimenticio pueden explicar, al menos en parte, las resistencias dispares que estos tienen frente a los IIE largos. Así, el CAS que resiste los mayores IIE podría desplegar una mayor actividad de la BLA, seguido del CAO retronasal y por último el CAO ortonasal, que induciría la menor actividad - o mayor inhibición- de la BLA.

En cuanto a los otros núcleos de la amígdala; se ha reportado que el núcleo central (lesiones con Ac. iboténico y electrolíticas) y el medial-basomedial (lesiones electrolíticas) no participan en el CAO potenciado por un sabor ni en el CAS (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1986; Hatfield *et al.*, 1992). Además Hatfield y cols. (1992) no encontraron participación del núcleo central en una prueba de discriminación aversiva olfativa (Ac. iboténico), sin embargo, en el estudio de Desgranges y cols. (2008) en el que encontraron efecto con la administración de anisomicina en la BLA, marcaron Fos y encontraron que su protocolo inhibió además de la BLA, al núcleo central, por lo que es posible que este núcleo también participe en la consolidación del CAO.

❖ Corteza insular

Se han utilizado para el estudio de esta estructura en el CAO y CAO potenciado por el sabor una gran variedad de estrategias como lesiones electrolíticas (Lasiter *et al.*, 1985), aspirativas (Kiefer *et al.*, 1982), excitotóxicas con ácido iboténico (Inui *et al.*, 2006) o con NMDA (Roman *et al.*, 2006 y Lin *et al.*, 2009), o mediante la administración de fármacos como 6-hidroxidopamina [4 µg/0.5 µl] (Fernández-Ruiz *et al.*, 1993) y anisomicina [100 µg /1 µl] (Desgranges *et al.*, 2009). La mayoría de estos estudios no han encontrado efecto de estas manipulaciones realizadas antes de la adquisición

en el CAO orthonasal y retronasal, ni en el CAO potenciado por el sabor o a lo mucho un leve efecto, tampoco han encontrado efectos cuando la manipulación es previa a la evocación. Sin embargo, cuando las manipulaciones se realizaron antes del condicionamiento o previo a la evocación, han encontrado un gran deterioro o falta total del CAS al ser condicionado usando el sabor solo o cuando este estuvo acompañado por un olor, además se ha reportado pérdida o atenuación de la neofobia al gusto.

En contraste Roman y cols. (2006) no encontraron efectos en el CAO retronasal mediante lesiones excitotóxicas con NMDA en la corteza insular practicadas antes de la adquisición –como otros estudios-, sin embargo tampoco encontraron efectos en el CAS. Además Lasiter y cols. (1985) quienes realizaron lesiones electrolíticas, encontraron que los animales lesionados en la corteza insular posterior adquirieron aversiones gustativas y CAO potenciado normales, pero las lesiones en la parte anterior de esta estructura impidieron el CAS y el CAO potenciado. Asimismo, se debe mencionar que aunque dos estudios reportan que hay expresión normal del CAO potenciado, los animales con lesiones excitotóxicas antes de la adquisición (Inui *et al.*, 2006), o por aspiración post adquisición (Kiefer *et al.*, 1982) en la corteza insular, extinguieron el CAO más rápido que sus controles, lo que podría indicar que es necesaria esta estructura para obtener un CAO óptimo.

Es destacable el que numerosos autores han encontrado que a pesar de la falta de CAS por manipulaciones de la corteza insular -evaluado a largo plazo-, el sabor logra potenciar al olor (por ej. Fernández-Ruiz *et al.*, 1993; Inui *et al.*, 2006 y Kiefer *et al.*, 1982). Parece entonces, que la integridad de la corteza gustativa no es una condición necesaria para la adquisición y retención del CAO potenciado. Esto puede parecer paradójico, como lo explica Kiefer y cols. (1982): Este patrón puede estar relacionado con la disociación entre la detección y la realización de funciones primarias como algunos comportamientos simples y reflejos, con la relevancia asociativa de los estímulos gustativos, por lo que después de la ablación de la corteza insular los umbrales de detección y funciones básicas de preferencia-aversión para el gustos son normales, pero no son salientes como señales asociativas con el malestar. Por lo que, al parecer, los aspectos funcionales del sabor como potenciador de las señales olfativas en el sistema emético están neurológicamente separados o son independiente de los mecanismos corticales responsables de las aversiones gustativas que se consiguen con los sistemas subcorticales intactos. Adicionalmente Inui y cols. (2006) señalan que existe la posibilidad de que el mecanismo neural subyacente a la PAOS sea bastante simple; un subconjunto de neuronas amigdalinas recibe entradas convergentes del sistema gustativo y olfativo, las entradas del sabor mejoran la capacidad de respuesta a las entradas del olor, y esta respuesta

potenciada del olor asociada con las entradas viscerales conduce a la formación del CAO potenciado por el sabor.

❖ Corteza entorrinal

Aunque algunos estudios han encontrado que la ablación por aspiración de la corteza entorrinal no afecta el CAO potenciado por el sabor ni el CAS (Ferry *et al.*, 1995) y que la lesión con NMDA tampoco afecta el CAO orthonasal con IIE cortos (5min) (Ferry *et al.*, 2006), en 1996 Ferry y cols. reportaron que cuando se evalúa tres días después del condicionamiento, la lesión de esta estructura facilita el CAO orthonasal con IIE largos (30-120 min), los cuales normalmente son demasiado largos para generar una buena aversión. Asimismo, esta lesión no afectó el CAS aún después de incrementar el IIE. Posteriormente, Ferry y cols. (1999) replicaron estos resultados y reportaron que esta facilitación puede ser revertida si se administra muscimol en la BLA 5 minutos después del EC [10 ng]. Esta administración no produce efecto sobre el CAO orthonasal ni retrorinal con intervalo de 5 min (Ferry *et al.*, 1999 y Sevelinges *et al.*, 2009), pero si afecta al CAO facilitado por el sabor (Ferry *et al.*, 1995).

Más recientemente, Ferry y cols. (2006) ampliaron estos resultados al examinar si la parte medial, lateral o el conjunto de la corteza entorrinal eran las responsables de esta facilitación del CAO orthonasal mediante lesiones excitotóxicas producidas con NMDA. Encontraron que la lesión de la parte medial no produce la facilitación, mientras que las lesiones extensas o solo de su parte lateral favorecen el CAO orthonasal con intervalos largos (120 min). Una de las cosas que parecen indicar este experimento y los anteriores, es que la corteza entorrinal a pesar de recibir inervación directa del BO no almacena parte de la memoria del CAO, sino que su función general sería regular a otras estructuras durante su aprendizaje, dicha regulación parece ser negativa ya que su desactivación favorece el CAO.

Además de la facilitación observada en el CAO, también se ha visto que la ablación de la corteza entorrinal produce una mejora en el rendimiento en una prueba de reconocimiento olfativo, ya que produce que retengan la memoria hasta los 120 min, lapso en el que ratas control ya no la presentan (Wirth *et al.*, 1998). En este estudio encontraron que la lesión de esta estructura produce un brote de fibras colinérgicas septohipocampales en los dos tercios exteriores de la capa molecular del giro dentado, sin embargo su papel no queda claro en la potenciación observada. Además, se ha reportado que las lesiones electrolíticas de la corteza entorrinal produce que ratas aprendan a

discriminar los olores en una tarea operante significativamente más rápido (aunque el entrenamiento sea limitado), dicha memoria sigue presente aun después de dos meses (Otto *et al.*, 1991).

❖ Hipocampo

Miller y cols. en 1986 realizaron lesiones electrolíticas en el hipocampo encontrando que éstas interrumpían de manera importante el CAO retronasal, y en cierto grado el CAO retronasal presentado junto con un sabor, sin embargo, cuando se evocaba únicamente con el sabor solo había un ligero déficit en la aversión. Por otro lado, encontraron que la respuesta neofóbica estaba disminuida tanto para el olor retronasal, como para el compuesto olor-sabor. Posteriormente Bermúdez-Rattoni y cols. (1987) incrementaron la actividad colinérgica del hipocampo dorsal con fisostigmina (inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) provocando una marcada atenuación del CAO ortonasal y CAO potenciado, mientras que la aversión al sabor permaneció intacta. Además, cuando la actividad colinérgica del hipocampo se redujo por la microinyección de escopolamina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no produjo ningún efecto en la potenciación del olor en el primer día de prueba, pero la extinción de este grupo se redujo significativamente el segundo día, mientras que el CAO ortonasal y el CAS permanecieron igual. Estos resultados sugieren que la actividad colinérgica del hipocampo participa en la adquisición del CAO.

❖ Otras estructuras

Antes de mencionar los estudios que se han realizado en otras estructuras relacionadas con el CAO, queremos recalcar la falta total de estudios de la corteza piriforme, a pesar de que durante mucho tiempo fue considerada la corteza olfativa primaria.

Lasiter y cols. (1985) reportaron que animales con lesiones electrolíticas en la neocorteza orbitofrontal y la corteza insular posterior adquirieron aversiones gustativas y CAO potenciado por el sabor normales, por lo que las regiones neocorticales situadas inmediatamente rostral, dorsal o caudal a la corteza gustativa insular anterior juegan un papel relativamente menor en el aprendizaje de la PAOS.

Además Desgranges y Ferreira (observación no publicada en Desgranges *et al.*, 2009) encontraron que la corteza orbitofrontal no es necesaria para el CAO, ya que su inactivación transitoria no afectó la adquisición ni recuperación. Además, en otra región cortical estudiada, la corteza fronto-parietal, las microinyecciones de escopolamina o fisostigmina antes del EC no tuvieron ningún efecto en el CAO potenciado o en el CAS Bermúdez-Rattoni y cols. (1987).

Inui y cols. (2006) encontraron que lesiones excitotóxicas de la parte parvicelular del núcleo talámico ventroposteromedial impiden el CAS durante la PAOS sin impedir el CAO retronasal potenciado, sin embargo este último extingue más rápido. Además estas mismas lesiones no tienen ningún efecto en el CAO retronasal o su extinción.

Las lesiones excitotóxicas con NMDA en el hipotálamo lateral o electrolíticas en el núcleo de la estría terminal no afectan el CAO retronasal ni el CAS (Roman *et al.*, 2006).

En cuanto al estriado se ha reportado que las lesiones excitotóxicas por ácido iboténico del núcleo caudado putamen no afectan el CAO potenciado por el sabor ni el CAS (Ferry *et al.*, 1995). Igualmente, Bermúdez-Rattoni y cols. (1989) reportaron que la administración de procaína o las lesiones electrolíticas en el neostriado dorsal o ventral no afectan el CAO potenciado ni el CAS.

ANEXO III

El MK-801

También conocido como dizocilpina (Dravid *et al.*, 2007), es el antagonista no competitivo específico de los receptores NMDA más utilizado en experimentación (Riedel *et al.*, 2003), bloquea todas las subunidades del receptor de NMDA en una forma no selectiva (Dravid *et al.*, 2007). Se le considera un bloqueador de canal abierto, ya que requiere que el poro del receptor esté abierto para acceder a su sitio de unión y causar un bloqueo de la actividad del receptor, debido a este requisito, la aparición de la inhibición es dependiente del uso y aumenta al aumentar la probabilidad de apertura del canal (Neely y Lingle, 1986; Huettner y Bean, 1988). Tras el cierre del canal, este antagonista se puede quedar atrapado en el poro, por lo que es considerado además, un “bloqueador de captura o atrapado”. El bloqueo reversible que produce este antagonista y otros de su tipo, es lento de revertir y requiere la reactivación del canal por los agonistas antes de que el bloqueador se pueda disociar (Brackley *et al.*, 1993; Parsons *et al.*, 1995; Blanpied *et al.*, 1997).

El MK-801 –y otros antagonistas de los receptores NMDA- al ser administrados sistémicamente, producen una reducción del tono muscular, descoordinación motora (ataxia), hiperactividad, movimientos lado a lado, comportamiento de dar vueltas y efectos bifásicos en la actividad ambulatoria aumentando en dosis bajas y disminuyendo en dosis altas (Jackson y Sanger, 1989; Murata y Kawasaki, 1993; Traverso *et al.*, 2003).