

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

NEUROQUÍMICA DE LA EVOCACIÓN DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR EN LA CORTEZA INSULAR Y AMÍGDALA DE RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: Doctor en Ciencias

> PRESENTA: M en C. Daniel Osorio Gómez

Dr. Federico Bermúdez Rattoni Instituto de Fisiología Celular

Dr. Rudolf M. Buijs Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Julio Morán Andrade Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Agosto, 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.

I

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Federico Bermúdez Rattoni

El proyecto contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 250870) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM IN208616).

Durante mis estudios de doctorado fui becario del Programa de Becas Nacionales de Posgrado CONACyT, y también obtuve el apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado para asistir a congresos internacionales.

Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Israela Balderas Moreno y la asistencia en los procesos administrativos por parte de Leticia García Gutiérrez, Arleth Gómez Vásquez y Adelina González Pérez.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por su valiosa enseñanza y el apoyo académico que me otorgó desde que me incorporé a su equipo de trabajo. Admiro su gran interés en la neurobiología de la memoria y su trayectoria en el quehacer científico. Gracias por las pláticas y retos que me brindó a lo largo de mi formación académica.

Al Dr. Rudolf M. Buijs y al Dr. Julio Morán Andrade por sus asesorías y consejos durante la realización de mi doctorado.

A los doctores Clorinda Arias Álvarez, Martha L. Escobar Rodríguez, Ranier Gutiérrez Mendoza, Gabriel Roldán Roldán y Francisco Sotres Bayón por tiempo y dedicación a la mejora de esta tesis.

A la Dra. Kioko Guzmán Ramos por su invaluable amistad y fomentar el gusto por las neurociencias.

A mis amigos: Aketzali, Auraly, Azul, Carla, Consuelo, Cristina, Eduardo, Ernesto, Jorge, Julio, Katia, Lorelei, Lucía, Mónica, Paola y Susana por cada uno de los agradables momentos dentro y fuera del laboratorio.

RESUMEN

La evocación de la memoria permite la expresión conductual y la actualización del trazo de memoria. La amígdala y la corteza insular participan en la evocación del condicionamiento aversivo al sabor (CAS). Mediante microdiálisis *in vivo*, se observó un incremento en los niveles de glutamato, norepinefrina y dopamina en la amígdala y en la corteza insular durante la evocación del CAS. Además, se reportó que el bloqueo de los receptores AMPA en ambas estructuras atenúa la expresión conductual, mientras que en la corteza insular impide la actualización de la memoria. El bloqueo de los receptores NMDA no afecta la expresión conductual, pero disminuye la actualización de la memoria en ambas estructuras. El bloqueo de los receptores numbra en ambas estructuras. El bloqueo de los receptores numbra en ambas estructuras de la expresión conductual y la actualización de la memoria en ambas estructuras. El bloqueo de los receptores numbra en ambas estructuras de la expresión conductual y la actualización de la memoria en ambas estructuras de la expresión conductual y la actualización de la memoria. Además, el bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos en ambas estructuras impide la expresión conductual y la actualización de la memoria.

La amígdala y la corteza insular participan de manera conjunta en la consolidación y retención del CAS, por lo que los receptores AMPA y NMDA en la amígdala pueden modular la neurotransmisión en la corteza insular durante la evocación. Se observó que el bloqueo de los receptores AMPA en la amígdala atenúa la expresión conductual y disminuye los niveles de norepinefrina y dopamina en la corteza insular, mientras que el aumento de glutamato en la corteza insular persistió. Por otra parte, el bloqueo de los receptores NMDA en la amígdala impide el aumento de glutamato en la corteza insular persistió de glutamato en la corteza insular persistió de glutamato en la corteza insular, pero la expresión conductual y los cambios de catecolaminas en la corteza insular persistieron.

ABSTRACT

During memory retrieval, behavioral expression and memory trace reactivation occur, facilitating information update. The amygdala and the insular cortex are fundamental structures involved in conditioned taste aversion (CTA) retrieval. Using microdialysis *in vivo*, we observed an increase in glutamate, norepinephrine and dopamine in both the amygdala and the insular cortex during exposure to the conditioned taste aversive stimulus. Conjointly, we observed that AMPA receptors are necessary for behavioral expression in both structures and only in the insular cortex the AMPA receptors are involved in memory updating. NMDA receptors are not involved in behavioral expression but are necessary for memory updating in the amygdala and the insular cortex. Also, D1 receptors within the amygdala are not involved in behavioral expression but are involved in memory updating. In the insular cortex, D1 receptors are involved in both, behavioral expression and memory updating. Additionally, beta-adrenergic receptors within both structures have a key role in behavioral expression and memory updating during CTA retrieval.

It has been reported that amygdala-insular cortex interaction is involved in taste aversion memory consolidation and maintenance. Therefore, we micro-infused AMPA or NMDA receptors antagonist in the amygdala while microdialysis in the insular cortex was carried out during CTA retrieval. We observed that glutamatergic receptors in the amygdala differentially modulate extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine within the insular cortex during conditioned taste aversion memory retrieval. Blocking AMPA receptors in the amygdala hindered behavioral expression and impaired norepinephrine and dopamine augmentations in the insular cortex, glutamate increase remained intact. Otherwise, NMDA receptors blockade impaired glutamate augmentation within the insular cortex, whereas behavioral expression and catecholaminergic increase remained intact.

RECONOCIMIENTOS	II
AGRADECIMIENTOS	Ш
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
Aprendizaje y memoria	1
La consolidación de la memoria	3
Evocación de la memoria	6
Evocación y reconsolidación de la memoria	7
ANTECEDENTES	11
Memoria de reconocimiento al sabor	11
Condicionamiento aversivo al sabor (CAS)	13
Sustratos neurales del CAS	14
Amígdala	17
Corteza Insular (CI)	19
La amígdala y su relación con el CAS	20
La corteza insular y su relación con el CAS	23
El circuito amígdala-corteza insular en el CAS	24
Reconsolidación del CAS	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
OBJETIVO GENERAL	29
Objetivos particulares	29
HIPÓTESIS	30
	VI

METODOLOGÍA GENERAL	31
Animales	31
Implantación de cánulas	31
Protocolo conductual de microdiálisis durante la evocación	31
Recolección de muestras	33
Análisis de muestras	34
MEKC	34
Histología	35
Análisis estadístico	36
CAMBIOS EXTRACELULARES DE NEUROTRANSMISIÓN EN LA AMÍGDALA Y LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA EVOCACIÓN DEL CAS	37
Metodología particular Microdiálisis en la amígdala durante la evocación Manipulación farmacológica de la amígdala y la CI en la evocación del CAS Protocolo conductual: Manipulación farmacológica de la amígdala y la CI en la evocación del CAS	37 37 37 38
Resultados: Cambios extracelulares de neurotransmisión en la amígdala durante la evocación del CAS Glutamato en la amígdala durante la evocación del CAS Norepinefrina en la amígdala durante la evocación del CAS Dopamina en la amígdala durante la evocación del CAS Respuestas conductuales de aversión Manipulación farmacológica de la amígdala durante la evocación Localización de las cánulas de microdiálisis y microinyección	39 40 41 42 43 43 43
Resultados: Cambios extracelulares de neurotransmisión en la corteza insular durante la evocación Glutamato en la corteza insular durante la evocación del CAS Norepinefrina en la corteza insular durante la evocación del CAS Dopamina en la corteza insular durante la evocación del CAS Respuestas conductuales de aversión Manipulación farmacológica de la corteza insular durante la evocación Localización de las cánulas de microdiálisis y microinyección	47 48 48 49 50 52
CIRCUITO AMÍGDALA-CORTEZA INSULAR EN LA EVOCACIÓN	53
Metodología particular Manipulación farmacológica de la amígdala mientras se realiza microdiálisis in vivo en la CI	53 53
Resultados: Circuito amígdala-corteza insular en la evocación Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente los niveles glutamato en la CI durante la evocación	54 54

Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente los niveles norepinefri durante la evocación	na en la CI 55
Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente los niveles dopamina e durante la evocación	en la Cl 57
Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente las respuestas conduct aversión	tuales de 58
Localización de las cánulas de microdiálisis y microinyección	59
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	74
ANEXOS	83
Artículo publicado en Behavioural Brain Research.	83
Artículo enviado a Learning & Memory.	83

INTRODUCCIÓN

Aprendizaje y memoria

Los organismos pueden cambiar su conducta de acuerdo a las variaciones de su entorno para aumentar las probabilidades de supervivencia; dichas modificaciones en el comportamiento pueden darse a través de un proceso largo atribuible a la selección natural y a corto plazo mediante la experiencia (Anderson, 2001). A lo largo del tiempo se ha tratado de comprender cómo la experiencia modifica el sistema nervioso central para mantener la información y cambiar el repertorio conductual en función de las condiciones ambientales.

El neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal propuso que el crecimiento de contactos entre las neuronas es el mecanismo que subyace a la base anatómica por la cual, el sistema nervioso central mantiene la información provista por la experiencia; estos contactos son actualmente conocidos como sinapsis (tomado de Mackintosh, 1994). Años más tarde, Donald O. Hebb sugirió que "cuando un axón de la célula A está lo suficientemente cerca para excitar a la célula B y persistentemente toma parte en excitarla, algún proceso de crecimiento o cambio metabólico ocurre en una o ambas células, de tal manera que se incrementa la eficiencia de A para que dispare B" (Hebb, 1949). A finales de la década de los 60's, el grupo encabezado por Mark Rosenzweig estableció experimentalmente que la experiencia, producto del ambiente donde crecían las ratas, estaba relacionada con cambios significativos en el peso del cerebro, el engrosamiento cortical, algunos cambios químicos y las ramificaciones dendríticas (Bennett et al., 1964; Bennett et

al., 1969; Rosenzweig et al., 1996).

La adquisición de la información obtenida a través de la experiencia se lleva a cabo por el proceso de aprendizaje, esta información subsecuentemente modificará el repertorio conductual del organismo (Anderson, 2001). El aprendizaje puede ser clasificado en no asociativo, como los fenómenos de habituación y sensibilización; y aprendizaje asociativo, en el cual los organismos aprenden las relaciones entre estímulos, conductas y consecuencias (Dudai, 1989).

La memoria se ha definido como el resultado del proceso a través del cual se codifica, almacena y después se evoca la información adquirida (Kandel et al., 2000). Dependiendo del tipo de información que contenga, la memoria se ha clasificado en dos: la memoria declarativa o explícita, este tipo de memoria involucra a la memoria de trabajo, la cual permite mantener la información por un período breve de tiempo mientras se realizan operaciones cognitivas; la memoria semántica, la cual almacena información y conocimiento del mundo; la memoria episódica, que mantiene la experiencia personal del pasado; la memoria espacial, cuya función es mantener información sobre la relación espacial entre los objetos; y la memoria de reconocimiento, la cual permite al individuo juzgar la ocurrencia previa de un estímulo o evento particular. Por otra parte, la memoria no declarativa o implícita incluye a la memoria perceptual, que permite el reconocimiento rápido de los objetos; la memoria motora, la cual almacena la información de secuencias motoras; la memoria asociativa, que permite la asociación espacial y temporal entre estímulos; y finalmente la no asociativa donde se extrae la información de un solo

estímulo (Figura 1) (Squire y Zola; 1996; Tulving, 2000; Carlson, 2007; Morici et al., 2015).



Figura 1. Clasificación de los tipos de memoria (Squire y Zola, 1996; Tulving, 2000; Carlson 2007; Morici et al., 2015).

La consolidación de la memoria

Dependiendo de la duración y cantidad de información que contenga, se ha propuesto que existen al menos dos tipos de almacenamiento: la memoria a corto y a largo plazo. La memoria a corto plazo es un sistema de almacenamiento temporal breve que contiene una cantidad reducida de información. En cambio, la memoria a largo plazo es considerada como un depósito de conocimiento perdurable a lo largo del tiempo sin ninguna limitación aparente de capacidad (Dudai, 2004) (Figura 2).



Figura 2. Fases temporales de la memoria. Dependiendo de su duración, la memoria puede clasificarse en memoria a corto plazo, la cual requiere procesos post-traduccionales de ciertas proteínas; memoria a largo plazo que involucra la síntesis de nuevas proteínas y la memoria de larga duración (consolidación de sistemas) la cual involucra la reorganización de los circuitos neuronales involucrados en la memoria (Modificado de McGaugh, 2000).

Desde hace más de un siglo, se ha sugerido que las memorias recién adquiridas pueden ser afectadas por eventos posteriores al aprendizaje, por lo tanto se ha propuesto las memorias permanecen frágiles y requieren de tiempo para que se estabilicen (McGaugh, 2000). Las memorias recién formadas pueden ser interferidas por estímulos, lesiones, o toxinas, estas manipulaciones pierden su efectividad de interferencia con el paso del tiempo (Dudai, 2004). Es decir, se requiere de la estabilización progresiva de la información durante el período posterior a su adquisición para que la información perdure a través del tiempo, proceso conocido como consolidación de la memoria.

Hasta ahora la consolidación está planteada en dos niveles, la consolidación sináptica y la consolidación de sistemas. A nivel sináptico, se ha propuesto que la

memoria a corto plazo sólo involucra modificaciones post-traduccionales de ciertas proteínas, es decir la entrada de información desencadena la activación de vías de señalización dependientes de cinasas, entre las que destacan la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (PKA) y la proteína cinasa C (PKC). Estas cinasas modifican de manera transitoria la actividad de las proteínas ya existentes en las neuronas, como canales iónicos, receptores, enzimas, entre otras (Micheau y Riedel, 1999). En cambio, la memoria a largo plazo requiere de los procesos de transcripción y traducción que dan como resultado la síntesis de nuevas proteínas, modificando de manera duradera la morfología y fisiología de las neuronas (Dudai, 2004; Lamprecht y LeDoux 2004; Dudai et al., 2015). De manera general, la activación de segundos mensajeros a través de la adenilato ciclasa aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico, dicho incremento favorece la activación de PKA, la cual fosforila el factor de la transcripción dependiente de adenosín monofosfato cíclico (CREB), este factor también puede ser fosforilado por una cinasa dependiente de la entrada de calcio a la neurona, la calcio calmodulina cinasa II (CaMKII). La fosforilación de CREB reclutamiento coactivadores promueve el de transcripicionales que inducen la transcripción de genes de expresión inmediata y tardía. La traducción de los nuevos ARN mensajeros se lleva a cabo en los ribosomas, generando nuevas proteínas las cuales modificarán la configuración morfológica y funcional de las neuronas (Dudai, 2002). Por otro lado, la consolidación de sistemas se reorganizan los circuitos cerebrales involucrados en la memoria, en un proceso que depende del tiempo y que puede durar días o meses (Dudai, 2004; Dudai et al., 2015).

Evocación de la memoria

Actualmente, la mayoría de los estudios publicados se han enfocado en comprender los mecanismos que participan en los procesos de adquisición y consolidación de la memoria. Sin embargo, también es necesario comprender cómo funciona la recuperación de la información previamente establecida. Entender el fenómeno de la memoria requiere del estudio de la evocación de la información, debido a que una vez que la memoria se ha consolidado, ésta permanece desapercibida hasta que se recuerda; de ahí que la evocación de la memoria es la demostración de que la memoria existe.

La evocación de la memoria permite recobrar y utilizar la información previamente aprendida a través de claves internas o sensoriales (Ben-Yakov et al., 2015), por lo que el proceso de evocación involucra distintos procesos, incluyendo la selección, reactivación y reconstrucción de las representaciones mnémicas (Cammarota et al., 2004; Ben-Yakov et al., 2015). De tal manera, la evocación implica la activación inicial de redes neuronales involucradas previamente en el aprendizaje, la selección de estímulos relevantes, y la integración de estas fuentes de información en un trazo mnémico con significado (Sara, 2000). En resumen, la evocación puede ser definida como el proceso por el cual se accede, selecciona, reactiva y reconstruye a las representaciones mnémicas almacenadas (Dudai, 2002). Estas definiciones han permitido sugerir un modelo de consolidación y recuperación de la memoria, donde la evocación de una memoria previamente consolidada puede darse a lo



largo del tiempo accediendo a la información cuantas veces se requiera (Figura 3).

Figura 3. Modelo de consolidación y evocación de la memoria. Una vez que la memoria se ha consolidado, el trazo mnémico es seleccionado y reactivado para la reconstrucción de la información (Modificado de Dudai, 2004).

Hasta ahora se ha sugerido que la evocación está modulada por los diferentes sistemas de neurotransmisión, no obstante aún se desconoce mucho sobre los procesos fisiológicos partícipes en el acto de recordar.

Evocación y reconsolidación de la memoria

Como se mencionó anteriormente, la memoria es consolidada mediante procesos dependientes de síntesis de proteínas (McGaugh, 2000; Dudai, 2004). No obstante, se ha postulado que durante la evocación, las memorias previamente formadas requieren de nueva cuenta la síntesis de proteínas para mantener la información (Nader et al., 2000; Rodríguez-Ortíz y Bermúdez-Rattoni, 2007; Rodríguez-Ortíz et al., 2008; Nader y Einarsson, 2010). Por lo tanto, se sugiere que al evocar una tarea se inician procesos que permiten acceder al trazo de memoria para su ejecución y

se reactiva la información almacenada, favoreciendo posibles modificaciones en la información previamente consolidada (Brown y Silva, 2004).

Durante la evocación, las memorias pueden ser actualizadas si existe nueva información disponible que fortalezca el trazo de memoria (Rodríguez-Ortíz et al., 2005; Rodríguez-Ortíz et al., 2008) o pueden cursar un proceso de extinción si el estímulo condicionado ya no predice un estímulo incondicionado (Pavlov y Anrep, 1927; de Carvalho Myskiw et al., 2015). Por lo tanto, la exposición al estímulo condicionado, durante la evocación de la memoria, puede promover la reconsolidación de la memoria sólo si existe nueva información que fortalezca a la conducta previamente adquirida o puede inducir un nuevo aprendizaje como en la extinción de la memoria (Berman y Dudai, 2001; Pedreira y Maldonado, 2003; Rodríguez-Ortíz et al., 2005; Rodríguez-Ortíz et al., 2008; Santini et al., 2004) (Figura 4). La actualización de la memoria (García-Delatorre et al., 2014) y la extinción de la memoria (de Carvalho Myskiw et al., 2015) pueden ocurrir aún en ausencia de la expresión conductual durante la evocación, sugiriendo que la expresión conductual es un proceso independiente de la modificación del trazo mnémico durante la evocación.



Figura 4. Nuevo modelo de consolidación y evocación. La evocación es un evento dinámico que abre una ventana temporal para la actualización o extinción del trazo de memoria a través del proceso de reconsolidación (Modificado de Dudai, 2004)

El fenómeno de la reconsolidación ha sido primordialmente estudiado en animales no humanos, lo cual ha llevado a sugerir que la reconsolidación podría favorecer la modificación de la memoria en humanos, esto facilitaría el tratamiento de fobias, estrés post-traumático, adicciones y otros tipos de padecimientos relacionados con la memoria. Se ha descrito que se puede bloquear la reconsolidación de memorias motoras (Walker et al., 2003) y episódicas (Hupbach et al., 2007; 2009; Forcato et al., 2007; 2010; Strange et al., 2010) mediante el aprendizaje de nueva información; mientras que la reconsolidación de memorias emocionales puede ser bloquedada por el uso de antagonistas de los receptores beta-adrenérgicos (Brunet et al., 2008; Kindt et al., 2009; Schillet et al., 2010). Sin embargo, recientemente se ha reportado que en un intento de replicar el estudio de Walker y cols. (2003), trabajo pionero y referente en la reconsolidación en humanos, no se observó el fenómeno de reconsolidación bajo la interferencia de un nuevo aprendizaje, en este mismo estudio se utilizaron otros protocolos que no incluían secuencias motoras y se utilizó el aprendizaje de una secuencia de números o letras. Este trabajo ha puesto en duda el papel de la reconsolidación como un mecanismo adaptativo que favorece la actualización de la memoria en humanos (Hardwicke et al., 2016). Aunque el fenómeno de reconsolidación no está de todo claro en humanos, se requiere aumentar el conocimeinto delos neurotransmisores involucrados en la expresión conductual y actualización de la memoria durante la evocación en otros modelos animales que permitan aportar conocimiento sobre los neurotransmisores involucrados en la evocación de una memoria asociativa, así como la participación funcional de estos neurotransmisores en la expresión conductual y actualización de la memoria.

ANTECEDENTES

Memoria de reconocimiento al sabor

La memoria de reconocimiento puede ser definida como el resultado del proceso de almacenamiento y evocación para identificar si un evento o estímulo particular ha sido experimentado previamente (Morici et al., 2015). En el caso particular de la comida, una de las habilidades de supervivencia que los animales han desarrollado es la memoria de reconocimiento al sabor. De tal manera que, cuando un animal es expuesto a un nuevo sabor, el organismo reduce el consumo del estímulo gustativo; una respuesta llamada neofobia. Además, si el consumo del nuevo sabor no tiene consecuencias negativas para el sujeto, el organismo incrementará el consumo de dicho sabor en encuentros posteriores y comenzará a reconocer el sabor como seguro, proceso conocido como atenuación de la neofobia. Por el contrario, si el nuevo sabor la próxima vez que lo encuentre, desarrollando así una aversión de larga duración (Bermúdez-Rattoni, 2004).

De ahí que los organismos deben aprender qué alimentos son seguros para comer y cuáles no. En general, la mayoría de los alimentos se caracterizan por tener un sabor específico, así que es importante reconocer aquellos sabores que están asociados con "seguridad" o "malestar" con el fin de consumir todos los alimentos que son benéficos y evitar aquellos que son potencialmente dañinos (Welzl et al., 2001). La característica distintiva de este aprendizaje es la asociación que se forma entre la información visceral y estímulos externos (mediados por aferencias

gustativas, olfativas, visuales o somatosensoriales) (Bures, 1998).

La asociación del sabor con las consecuencias viscerales sigue las reglas del condicionamiento clásico, el cual es un tipo de aprendizaje asociativo descubierto por Iván Pavlov, quien estudió la fisiología digestiva y la asociación entre estímulos (tomado de Bermúdez-Rattoni, et al., 2001). Para el establecimiento del condicionamiento clásico requiere de al menos dos estímulos, uno de ellos debe provocar una respuesta característica; este estímulo es llamado estímulo incondicionado y la respuesta es llamada respuesta incondicionada; el término incondicionado implica que la conexión entre el estímulo que inicialmente no ocasione la respuesta incondicionada; el término condicionado indica que únicamente después de la asociación entre estímulo condicionado e incondicionado, el estímulo condicionado ahora será capaz de provocar una respuesta similar a la respuesta incondicionada; dicha respuesta es llamada respuesta condicionada (Mazur, 2006).

De manera general, durante la adquisición del condicionamiento se requiere que el estímulo condicionado sea presentado de manera conjunta con el estímulo incondicionado. En los primeros ensayos puede presentarse una ligera respuesta condicionada ante el estímulo condicionado, pero tras la repetición de la asociación la respuesta condicionada incrementará gradualmente. La parte del proceso del condicionamiento clásico en la cual el sujeto experimenta dichas asociaciones es llamada fase de adquisición (Mazur, 2006).

Condicionamiento aversivo al sabor (CAS)

Una gran variedad de organismos pueden desarrollar aversiones a la comida o a líquidos con sabores específicos en su hábitat natural (Welzl et al., 2001). En 1955, John García y colaboradores lograron desarrollar un modelo para el estudio de dicho fenómeno; su trabajo consistió en entrenar a ratas para que bebieran agua con sacarina mientras eran expuestas a radiación producida por cobalto 60, la cual genera malestar gastrointestinal. Cuando las ratas fueron expuestas a la sacarina por segunda ocasión, mostraron un menor consumo de sacarina debido a una aversión a dicho sabor (García et al., 1955). Este paradigma ahora se conoce como condicionamiento aversivo al sabor (CAS).

La adquisición del CAS representa y sigue las reglas del condicionamiento clásico, siendo la sustancia inductora de malestar el estímulo incondicionado y el malestar gástrico la respuesta incondicionada. El estímulo gustativo es el estímulo condicionado (Welzl et al., 2001) y las respuestas condicionadas son: la apertura del hocico, sacudidas de cabeza, limpieza de la piel y la lengua con los miembros anteriores, dejar caer la sustancia ingerida o frotar el hocico contra el piso y las paredes (Bures, 1998). Sin embargo, la medición de dichas conductas resulta complicada, por lo que una vez que el estímulo condicionado (sabor) ha adquirido las propiedades de una señal aversiva, la medición del CAS se realiza con la cuantificación de la ingesta del estímulo condicionado durante las subsecuentes exposiciones (Yamamoto, et al., 1994).

El CAS ha sido ampliamente utilizado como un modelo conductual de aprendizaje y memoria en roedores (Welzl et al., 2001), lo cual ha permitido conocer de manera amplia las estructuras cerebrales involucradas en este aprendizaje. Además, el CAS presenta una rápida adquisición (Yamamoto et al., 1994) y puede ser inducido aun cuando exista un largo intervalo de tiempo entre el estímulo condicionado (sabor) y el estímulo incondicionado (inductor de malestar gástrico). Estas características han favorecido la comprensión de los eventos celulares y bioquímicos necesarios para el establecimiento de memorias aversivas de largo plazo (Bermúdez-Rattoni, 2004; Guzmán-Ramos et al., 2010; Guzmán-Ramos et al., 2012).

Sustratos neurales del CAS

En diversos laboratorios se han investigado los sustratos neurales del CAS, esto se ha logrado mediante el uso de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, anatómicas y de lesiones cerebrales que han resultado en la descripción de las vías neurales para los estímulos gustativos y viscerales (Figura 5). De forma simplificada, la información gustativa alcanza la parte rostral de núcleo del tracto solitario a través de los pares craneales VII, IX, y X (Bermúdez-Rattoni, 2004), las neuronas del núcleo del tracto solitario mandan sus axones ipsilateralmente hacia el núcleo parabraquial en su porción medial a través de la formación reticular (Yamamoto et al., 1994). El núcleo parabraquial proyecta fibras a la porción parvocelular del núcleo ventroposteriomedial del tálamo (Bermúdez-Rattoni y

Yamamoto, 1998), al hipotálamo lateral (Li et al., 2004), al núcleo cama de la estría terminallis, a la amígdala central y basolateral, al núcleo ventroposteriomedial del tálamo y a la corteza insular en su porción agranular (Reilly, 1999).

Existen al menos dos vías por las cuales el estímulo que provoca el malestar llega al sistema nervioso central (Bermúdez-Rattoni, 2004). Esto depende del tipo de estímulo: si éste irrita el sistema gastrointestinal, la información es enviada a través del décimo par craneal y si el malestar es a causa de toxinas en la sangre o de movimientos que causan náusea, la información proviene del área postrema (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998). La información del malestar gástrico tiene como sitio de llegada la porción caudal del núcleo del tracto solitario, de ahí se proyectan fibras a los subnúcleos laterales del núcleo parabraquial (Yamamoto, et al., 1994). El núcleo parabraquial tiene eferencias hacia la parte parvocelular de núcleo ventroposterolateral del tálamo, a la amígdala basolateral (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998).. Finalmente, la corteza insular en su porción granular recibe proyecciones de la porción visceral del tálamo (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998).



Figura 5. Esquema de los sustratos neurales involucrados en el CAS. Vías centrales gustativas y viscerales en el cerebro de rata (modificado de Yamamoto et al., 1997). Pares craneales VII, IX y X; Núcleo del Tracto Solitario (NTS); Núcleo Parabraquial (NPB); Núcleo ventroposteriomedial del tálamo (NVPM); Amígdala (Ami); Hipotálamo lateral (HL); Corteza Insular (CI).

Cabe destacar que las vías viscerales y gustativas convergen en varias estructuras cerebrales, donde el malestar y el sabor pueden ser asociados para crear el trazo de memoria (Bermúdez-Rattoni, 2004) (Figura 6). La adquisición del CAS cambia los patrones de actividad en respuesta al estímulo gustativo condicionado en el núcleo del tracto solitario, el núcleo parabraquial, la amígdala (Welzl et al., 2001) y en la corteza insular (Acolla et al., 2007).



Figura 6. Esquema de las vías principales del CAS. Núcleo de tracto solitario (NTS) Núcleo Parabraquial (NPB); Subnúcleo dorsolateral (dls); Subnúcleo exterior lateral (els); Núcleo ventroposterolateral (VPL); Núcleo ventromedial lateral (VML); Núcleo basal magnocelular (NBM); Amígdala (Ami); Amígdala basolateral (ABL); Amígdala Central (ACe) Hipotálamo lateral (HL); Corteza Insular (CI). Estímulo condicionado (EC); estímulo incondicionado (EI). Las líneas claras representan la información gustativa; las líneas oscuras representan la información visceral; y las líneas punteadas representan las proyecciones involucradas en el CAS cuyo tipo de información se desconoce (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

Tanto la amígdala como la corteza insular tienen un papel relevante en el establecimiento de tareas gustativas de aversión. De manera similar se les ha involucrado en tareas cognitivas de aprendizaje y memoria.

Amígdala

El término amígdala se origina del griego almendra, la cual describe burdamente la masa ovoide de materia gris encontrada en la porción medial del lóbulo temporal en los primates, y forma parte del conjunto de estructuras cerebrales involucradas en las emociones, conocido como el sistema límbico. Sin embargo, la amígdala de las ratas difícilmente tiene forma de almendra, aunque la mayoría de los núcleos componentes son los mismos que los encontrados en primates (Alheid et al., 1994).

Los núcleos de la amígdala se encuentran divididos en tres grupos principales (Figura 7):

- Grupo profundo o basolateral, contiene al núcleos lateral o basolateral, el accesorio o basomedial y el basal (Pitkänen et al., 2000; Papé y Paré, 2010; Sah et al., 2003).
- Grupo superficial o corticomedial, este grupo incluye a los núcleos del tracto olfatorio lateral, el núcleo del tracto accesorio olfatorio, los núcleos anteriores y posteriores corticales y la corteza periamigdaloide (Pitkänen et al., 2000; Papé y Paré, 2010; Sah et al., 2003).
- Grupo centromedial consiste en los núcleos central, medial y la porción amigdaloide del núcleo de la stria terminalis (Pitkänen et al., 2000; Papé y Paré, 2010; Sah et al., 2003).
- Y un grupo de núcleos que no entran fácilmente en estas categorías y que incluyen al área anterior de la amígdala, el área amigdalohipocampal y los núcleos intercalados (Sah et al., 2003; Papé y Paré, 2010).



Figura 7. Corte coronal de cerebro de rata y esquema donde se representan los diferentes núcleos de la amígdala de rata. Las diferentes tonalidades de gris representan los 3 grupos principales de la amígdala: grupo basolateral, grupo superficial y centromedial (Modificado de Papé y Paré, 2010).

De manera general, se describe a continuación las principales proyecciones a los núcleos de la amígdala. Las neuronas de la amígdala central y basolateral son principalmente glutamatérgicas. Sin embargo, la amígdala central también contiene una gran cantidad de neuronas GABAérgicas (Sah et al., 2003). También la amígdala basolateral y central reciben aferentes dopaminérgicas del área ventral tegmental (Brinley-Reed y McDonald, 1999). Por otra parte, las aferencias de norepinefrina del locus coeruleus han sido observadas en la amígdala basolateral y central y central (Fallon et al., 1978; Quirarte et al., 1997).

Corteza Insular (CI)

La corteza insular (CI) está delimitada dorsalmente por la corteza somatosensorial y ventralmente por el surco rinal, el nombre de CI es debida a su posición por encima del claustrum. La CI muestra una transición dorsoventral citoarquitectónica en tres regiones: granular, disgranular y agranular. La CI granular se caracteriza principalmente por una capa bien desarrollada de células granulares (capa IV) y la densidad de ésta capa es resaltada por la relativamente escasa capa V. La capa III contiene células piramidales; la capa II y II son fácilmente discernibles como entidades separadas y la CI agranular se sitúa en el labio dorsal del surco rinal, además es más delgada que la región cortical dorsal agranular y posee una banda intermedia más delgada de pequeñas células piramidales (Kosar et al., 1986) (Figura 8).



Figura 8. Corte coronal de cerebro de rata y esquema donde se representan las áreas de la corteza insular. Las diferentes tonalidades de gris representan las áreas de la CI dependiendo de su citoarquitectura: CI granular, CI disgranular, CI agranular (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2014)

Se ha demostrado que la CI recibe aferencias del núcleo basal magnocelular, las cuales liberan acetilcolina. Además recibe proyecciones glutamatérgicas provenientes de la amígdala, del núcleo dorsomedial del tálamo y de la corteza prefrontal (Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991). También la CI recibe aferencias noradrenérgicas del locus coeruleus (Saper, 1982) y dopaminérgicas del área ventral tegmental (Jasmin et al., 2004; Ohara et al., 2003).

La amígdala y su relación con el CAS

En cuanto al papel de la amígdala en el CAS, se ha descrito que la amigdalectomía bilateral en la porción medial (Kolb et al., 1977), así como la remoción de la amígdala lateral (Fitzgerald y Burton, 1983) ocasionan un déficit en la adquisición del CAS. De manera similar, existen reportes de que las lesiones hechas mediante excitotoxicidad abarcando los núcleos de la amígdala medial, central, basolateral,

cortical anterior y basomedial, disminuyen la adquisición del CAS de manera proporcional a la dimensión de la lesión (Yamamoto et al., 1995). Además de las lesiones excitotóxicas, se ha detallado que las lesiones electrolíticas, que involucran a los tres grupos de núcleos amigdalinos (Kesner et al., 1992; Schafe y Bernstein, 1996); o únicamente el basolateral (Aggleton et al, 1981; Borsini y Rolls, 1984; Fitzgerald y Burton, 1983; Rollins et al., 2001) no permiten la adquisición del CAS.

Durante la adquisición del CAS, se han reportado cambios en los niveles extracelulares de glutamato y norepinefrina en la amígdala mediante el uso de microdiálisis en libre movimiento. La presentación del estímulo gustativo novedoso induce un incremento en los niveles extracelulares de norepinefrina (Guzmán-Ramos et al., 2012); mientras que la inducción de malestar gástrico promueve el aumento de los niveles extracelulares de glutamato (Tucci et al., 1998; Miranda et al., 2002; Guzmán-Ramos et al., 2012) y norepinefrina (Guzmán-Ramos et al., 2012). Además, se reportó que la invección de glutamato en la amígdala, después de la inducción de malestar gástrico débil, favorece el fortalecimiento del CAS (Miranda et al., 2002); mientras que el bloqueo de los receptores NMDA (Tucci et al., 1998; Yasoshima et al., 2000) o de los receptores mGluR I y II (Simonyi et al., 2009) antes de la inducción del malestar gástrico impide el establecimiento del CAS. De manera similar, la infusión intra-amigdalina de un antagonista de los receptores β-adrenérgicos antes de la inducción de malestar gástrico atenúa la adquisición de la memoria gustativa de aversión (Miranda et al., 2003).

De manera interesante, aproximadamente cuarenta minutos después de la adquisición del CAS se observó un incremento concomitante de los niveles norepinefrina y glutamato en la amígdala, estos incrementos están involucrados con la consolidación del CAS, ya que el bloqueo de los receptores NMDA o β-adrenérgicos en la amígdala durante este periodo de post-adquisición impide la consolidación del CAS (Guzmán-Ramos et al., 2012).

En cuanto a la evocación del CAS, se conoce que se requiere de la integridad funcional de la amígdala, pues las lesiones electrolíticas de la amígdala basolateral (Nachman y Ashe, 1974), así como la inactivación temporal de la amígdala mediante la infusión de tetrodotoxina, disminuyen la conducta de aversión durante la evocación del CAS (Gallo et al., 1992). De manera similar, la administración de un agonista de los receptores GABA A en la amígdala basolateral atenúa la aversión mostrada durante la evocación del CAS (Yasoshima et al., 2005). Además, se ha reportado que la exposición a un estímulo gustativo previamente asociado con malestar gástrico, incrementa la respuesta neuronal en la amígdala basolateral (Yamamoto y Fujimoto, 1991). Asimismo, se ha descrito que la evocación del CAS podría estar modulada por la actividad glutamatérgica en la amígdala, ya que se reportó un aumento en los niveles extracelulares de glutamato en dicha estructura durante la evocación del CAS (Tucci et al., 1998). También se ha reportado que la inactivación de los receptores AMPA disminuye la aversión mostrada durante evocación de la aversión gustativa, mientras que los receptores NMDA están involucrados en el mantenimiento de la memoria (Yasoshima et al., 2005; Rodríguez-Ortíz et al., 2012; García-Delatorre et al., 2014).

La corteza insular y su relación con el CAS

Se conoce que la integridad funcional de la CI es necesaria para la formación y evocación del CAS (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Las lesiones hechas en la región central de la CI mediante excitotoxicidad no permiten la adquisición del CAS (Nerad et al., 1996). Por otra parte, se ha monitoreado la liberación de neurotransmisores durante la adquisición y consolidación del CAS en la CI mediante el uso de microdiálisis *in vivo*. Durante dicho monitoreo, se encontró que la presentación del estímulo gustativo novedoso ocasiona un incremento en los niveles extracelulares de acetilcolina (Miranda et al., 2000), dopamina y noradrenalina (Guzmán-Ramos et al., 2010). Además, ante la presentación del estímulo y norepinefrina en la CI (Miranda et al., 2002; Guzmán-Ramos et al., 2010).

Interesantemente, aproximadamente 42 minutos después de la adquisición del CAS se observó un incremento en las concentraciones extracelulares de glutamato y dopamina en la CI sugiriendo que dichos incrementos están involucrados en el proceso de consolidación, pues el bloqueo en la CI de los receptores NMDA o D1 durante este periodo, ocasionó un déficit en la consolidación del CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010).

De manera similar, las lesiones electrolíticas (Cubero et al., 1999), o la inactivación

temporal de la CI mediante la inyección de tetrodotoxina (Gallo et al., 1992) disminuyen la aversión gustativa en la evocación del CAS. También, se ha demostrado que la actividad de los receptores AMPA es necesaria para la evocación del CAS (Berman et al., 2000).

El circuito amígdala-corteza insular en el CAS

La amígdala forma conexiones con una gran diversidad de estructuras incluyendo la corteza, el estriado, algunos núcleos talámicos e hipotalámicos, así como núcleos del tallo cerebral (Amaral e Insausti, 1992). Como resultado, la amígdala influye en la neuromodulación de la formación de la memoria (McGaugh, 2004; McGaugh y Roozendaal, 2002).

Se ha descrito que la amígdala y la CI están altamente interconectadas y que dicha interacción tiene un papel fundamental en la formación memorias gustativas de aversión. Las proyecciones provenientes de la amígdala basolateral y de los núcleos corticales de la amígdala tienen llegada a la porción agranular de la CI. De manera inversa, la CI provee aferencias a la amígdala lateral, basal, basal medial, cortical, central y medial (Pitkänen et al., 2000).

Se ha reportado que la amígdala modula la consolidación de la memoria aversiva al sabor a través de proyecciones glutamatérgicas hacía la CI (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Los datos indican que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce potenciación a largo plazo en la CI y que la actividad de los

receptores NMDA en la CI es necesaria para dicha inducción (Escobar et al., 1998). La potenciación a largo plazo de la amígdala a la CI favorece la retención de la memoria gustativa de aversión (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). Asimismo, la interacción amígdala-CI regula el fortalecimiento del CAS, pues la inyección de glutamato en la amígdala incrementa la fortaleza del CAS mediante la actividad de los receptores NMDA en la CI (Ferreira et al., 2005). Además se ha descrito que durante el periodo post-adquisición del CAS, los cambios concomitantes de glutamato y dopamina observados en la CI se ven afectados mediante la infusión de tetrodotoxina en la amígdala, afectando también la consolidación del CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010). De manera similar, se ha demostrado que después del establecimiento del CAS, existe un incremento en la conectividad funcional entre la amígdala y la CI (Grossman et al., 2008). Además la inactivación conjunta de ambas estructuras mediante la invección de tetrodotoxina abate la evocación del CAS (Gallo et al., 1992). Dicho esto, la importancia de la conectividad amígdala-CI en la formación del CAS está ampliamente fundamentada, no obstante se ha explorado poco su participación durante la evocación del CAS.

Reconsolidación del CAS

La reconsolidación de la memoria es un proceso donde la información previamente consolidada puede ser modificada (Rodríguez-Ortíz y Bermúdez-Rattoni, 2007). En un inicio se había considerado que la evocación de la memoria era necesaria para desencadenar los mecanismos que subyacen a la reconsolidación (Nader y Einarsson, 2010; Flavell et al., 2011). No obstante, se ha sugerido que la expresión

conductual es un proceso independiente del proceso de reconsolidación (Ben Mamou et al., 2006; Rodríguez-Ortíz et al., 2012; Coccoz et al., 2013; Balderas et al., 2013; García-Delatorre et al., 2014; Santoyo-Zedillo et al., 2014; Delorenzi et al., 2014). De tal manera, se ha propuesto que la evocación de la memoria es un proceso que se lleva a cabo por mecanismos independientes involucrados en la expresión conductual y la reactivación del trazo de memoria (Flavell et al., 2011; 2013), la reactivación del trazo induce la labilidad de las memorias facilitando su modificación y subsecuente reconsolidación (Lee, 2009; Rodríguez-Ortíz et al., 2012; García-Delatorre et al., 2009).

En la reconsolidación del CAS se ha descrito que no es necesaria la síntesis de proteínas en la amígdala (Bahar et al., 2004). Sin embargo, el bloqueo de la actividad de la proteína cinasa A en la amígdala basolateral impide la reconsolidación del CAS (Koh y Bernstein, 2003). Además, la inactivación de receptores NMDA no afecta la expresión conductual del CAS pero impide la reconsolidación de la memoria; mientras que el bloqueo de los receptores AMPA impide la expresión conductual del CAS pero de la reconsolidación de la memoria; mientras que el bloqueo de los receptores AMPA impide la expresión conductual del CAS pero de reconsolidación de reconsolidación de la memoria; mientras que el bloqueo de los receptores AMPA impide la expresión conductual del CAS pero deja el proceso de reconsolidación intacto (García-Delatorre, et al., 2014).

Para el caso de la CI, se reportó que la síntesis de proteínas no es necesaria para la reconsolidación del CAS (Rodríguez-Ortíz et al., 2012). No obstante, la estimulación magnética intracraneal (Stehberg et al., 2009) o la activación de los receptores a canabinoides CB1 (Kobilo et al., 2007) bloquea la reconsolidación del trazo de memoria gustativa de aversión.
Los datos anteriores permiten proponer una importante participación de la amígdala en la reconsolidación del CAS. De manera interesante, se ha descrito que se requiere de la síntesis de nuevas proteínas en la amígdala y la CI para la reconsolidación del CAS, esto sugiere una posible interacción de ambas estructuras durante dicho proceso (Rodríguez-Ortíz et al., 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evocación es un proceso muy importante de la memoria, ya que se requiere que la información previamente almacenada pueda ser utilizada por el organismo desempeñando una conducta adaptada a su entorno. Además, durante la evocación se dan los procesos involucrados en la expresión conductual y en la reconsolidación de la memoria.

Tanto la amígdala como la CI son dos estructuras que tienen una actividad importante en la adquisición y consolidación del CAS; durante estos procesos se ha observado una sinergia entre los sistemas glutamatérgico y catecolaminérgico. Sin embargo, la información acerca del proceso de evocación del CAS es limitada, incluyendo la participación de los diferentes sistemas de neurotransmisión en cada una de las estructuras y cómo estos señalan y representan al trazo de memoria de aversión previamente formado.

Por otra parte, se sabe que la interacción entre la amígdala y la CI es muy importante para la formación, consolidación y evocación del CAS. Y aunque se sugiere la participación de la interacción amígdala-CI en la evocación del CAS, se desconoce el mecanismo neuroquímico involucrado en dicha interacción durante la evocación del CAS.

Asimismo, se conoce que la información previamente consolidada es susceptible a ser modificada mediante la incorporación de información nueva durante la

reconsolidación. No obstante, existen pocos datos sobre la participación de los receptores del sistema glutamatérgico y catecolaminérgico en la amígdala y la CI involucrados en la expresión conductual y la reconsolidación del CAS durante la evocación de la memoria.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina durante la evocación del CAS en la amígdala y la CI. Además de evaluar la participación funcional de estos neurotransmisores durante la evocación en la expresión conductual y reconsolidación mediante el uso de antagonistas específicos para los receptores NMDA, AMPA, D1 y beta-adrenérgicos durante el acto de recordar.

Asimismo, se determinará la participación de la interacción amígdala-CI durante la evocación del CAS, mediante el bloqueo de la expresión conductual y de la reconsolidación en la amígdala a través de la infusión de antagonistas de los receptores AMPA y NMDA respectivamente, teniendo como registro tanto el desempeño conductual como los posibles cambios en los niveles extracelulares de neurotransmisores en la CI.

Objetivos particulares

Monitorear en la amígdala y en la corteza insular los cambios en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina ante la presentación del estímulo condicionado durante la evocación del condicionamiento aversivo al sabor

mediante la técnica de microdiálisis in vivo.

Evaluar el papel de los receptores AMPA, NMDA, D1 y β-adrenérgicos de la amígdala y en la corteza insular durante la evocación del CAS mediante la inyección de antagonistas específicos.

Monitorear la CI, mediante microdiálisis en libre movimiento, los cambios en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina durante la evocación del CAS mientras se infunde el antagonista específico de los receptores AMPA y NMDA en la amígdala.

<u>HIPÓTESIS</u>

La evocación de la memoria gustativa de aversión se asocia con un incremento en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la amígdala y la CI.

Existe una participación diferencial de los receptores AMPA, NMDA, D1 y βadrenérgicos en la amígdala y la CI sobre la expresión conductual y la actualización de la memoria durante la evocación.

Durante la evocación, los receptores NMDA y AMPA de la amígdala modifican los cambios de niveles extracelulares de neurotransmisión observados en la CI, alterando subsecuentemente la expresión conductual y la reconsolidación del CAS.

METODOLOGÍA GENERAL

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 280 - 300 g de peso provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura de $22 \pm 1^{\circ}$ C y ciclo luz – oscuridad de 12/12 horas. Todas las manipulaciones y procedimientos experimentales se realizaron en la fase de luz. Los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*, excepto cuando se indique lo contrario.

Implantación de cánulas

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina-xilacina (100mg/kg-10mg/kg). Bajo anestesia, se les implantaron cánulas guía (CMA, Suecia) utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales. Las cánulas se fijaron mediante un soporte de dos tornillos y cemento dental acrílico. Para evitar posibles infecciones, se aplicó tópicamente na mezcla de antibiótico, antimicótico y yodo. El tiempo de recuperación post-quirúrgico fue de seis días.

Protocolo conductual de microdiálisis durante la evocación

Después de la recuperación quirúrgica, a los animales se les privó de agua por 24 horas. Durante los siguientes 5 días, los animales se habituaron a una cámara de microdiálisis (Bioanalytical System Inc., E.U.A), donde se les proporcionó 30 mL de agua durante 15 minutos a través de un bebedero. El consumo de agua se

cuantificó para establecer la línea basal de ingesta. Por la tarde, se les suministró un segundo consumo de 30 mL de agua para evitar que las ratas se deshidrataran.

El día del condicionamiento se les suministró los siguientes estímulos dependiendo del grupo:

Grupo Aversivo, 30 mL de sacarina 0.1% (Sigma – Aldrich, E.U.A) y pasados 15 minutos se inyectó i.p. LiCl 0.2 M (Baker, E.U.A) en una dosis de 7.5 mL/kg. Grupo No-Aversivo, 30 mL de sacarina 0.1% y 15 minutos después se inyectó i.p. NaCl 0.2 M en una dosis de 7.5 mL/kg (Baker, E.U.A).

Durante los dos siguientes días al condicionamiento se les proporcionó 30 mL de agua por la mañana y 30 mL de agua por la tarde.

La sacarina se utilizó como estímulo gustativo novedoso y el LiCl como inductor de malestar gástrico; además se ha descrito que la inyección i.p. de NaCl no induce el CAS. La prueba se realizó 72 horas después del condicionamiento, con la presentación de 30 mL de sacarina 0.1% durante 15 minutos realizando la microdiálisis *in vivo* (Figura 9).

Evocación CAS



Figura 9. Representación esquemática del protocolo conductual para la microdiálisis *in vivo* en la evocación. Durante la adquisición del CAS. Los animales se expusieron a sacarina y 15 minutos después se le inyectó i.p. LiCl o NaCl; 72 horas después se realizó la microdiálisis mediante la inserción de las membranas de microdiálisis. Las primeras tres muestras se utilizaron como concentración basal de los neurotransmisores, a partir de la cuarta fracción, a los animales se les presentó el estímulo gustativo por 15 minutos; se recolectaron cada 4 min para la Cl y 5 minutos para la amígdala obteniendo un volumen final de muestras de 4 µL hasta obtener 10 fracciones.

Recolección de muestras

El día de la evocación del CAS, se insertaron las sondas de microdiálisis (CMA, Suecia), la cuales fueron conectadas al sistema de microinfusión (CMA, Suecia), éste perfundió solución Ringer (NaCl 118mM, KCl 4.7mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, CaCl₂ 2.5mM, NaHCO₃ 19mM, glucosa 3.3mM). Las sondas se insertaron en las cánulas guía y se descartaron los primeros 60 minutos de dializado. Se obtuvo un volumen final de 4.0 µL por muestra. Los dializados se recolectaron en tubos eppendorf de 200 µL que contenían 1.0 µL de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25mM, Na₂EDTA 0.27mM, ácido acético 0.1M). Las primeras tres muestras se utilizaron como línea basal de concentración y a partir de la cuarta fracción, los animal estuvieron expuestos a 30 mL de sacarina 0.1% (estímulo condicionado) durante 15 minutos para la evocación del CAS, al terminar los 15 minutos de exposición al estímulo condicionado se recolectaron cuatro muestras más. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20°C.

Análisis de muestras

El análisis químico de la muestras se realizó mediante electroforesis capilar micelar por detección de fluorescencia inducida por láser. De manera breve, las muestras se derivatizaron con 6 μ L FQ¹ ((3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído, Molecular Probes Invitrogen, E.U.A.) 10mM; en presencia de 2 μ L de KCN 25mM en buffer de boratos 10 mM y 1 μ L de estándar interno (O-metil-L-treonina 7.5 mM), un aminoácido que no se encuentra naturalmente en la muestra y que sirve como referencia para corregir variabilidad en la inyección de la muestra y de reacción. La derivatización se realizó en la oscuridad por 15 min a 65 °C en un baño termostático. Para la separación de las muestras se utilizó el sistema de electroforesis capilar micelar (MECK por sus siglas en ingles)

MEKC²

El amortiguador de corrida empleado para la separación de los neurotransmisores de interés contenía boratos 35 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 25 mM, β -ciclodextrinas 5 mM, 17% de metanol grado HPLC, pH final 9.6. La inyección fue hecha hidrodinámicamente aplicando 0.5 psi de presión durante 5 segundos en el contenedor de la muestra para llenar una porción del capilar (sílica fundida, 75 µm de diámetro interno y 50 cm de largo) y la separación se hizo aplicando 25 kV. Para

¹ FQ: Grupo fluorescente que reacciona específicamente con aminas primarias y que forma conjugados que pueden ser analizados por métodos electroforéticos. El FQ se excita a 480nm.
² MECK: Técnica analítica instrumental de separación la cual permite la identificación y cuantificación de los analitos; la separación se efectuó a través del uso de micelas en un amortiguador de separación.

la detección de los compuestos se empleó la detección de fluorescencia inducida por láser con un láser de ionización de argón con luz a 488 nm (Beckman Coulter P/ACE MDQ Glycoprotein system).

Cada neurotransmisor fue identificado en el electroferograma comparando el patrón de migración con otro electroferograma donde cada neurotransmisor se encontraba resaltado; los picos obtenidos se corrigieron relacionando el área bajo la curva de la muestra con el área bajo la curva del estándar interno. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Karat System Gold. Todos los resultados se muestran en porcentaje con respecto a la concentración observado durante la línea basal de muestreo (%Concentración basal= concentración muestra x 100 / promedio de concentración de las tres primeras fracciones).

Histología

Un día después de la última prueba conductual, los animales se inyectaron i.p. con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron transcardialmente con solución salina (0.9%). Los cerebros se extrajeron y se colocaron en una solución de paraformaldehido 4% en buffer fosfatos (0.15M, pH 7.5). Los cerebros se dejaron en paraformaldehido por un periodo de 24 horas y después se colocaron en un gradiente de sacarosa.

Se obtuvieron cortes coronales de 40 µm y se realizó la tinción de los tejidos con violeta de cresilo. Se verificó la correcta implantación de las cánulas de microdiálisis

y de inyección mediante el uso de un microscopio de luz.

Análisis estadístico

Para analizar los cambios en los niveles de neurotransmisión se utilizó la prueba ANOVA de medidas repetidas y la prueba *post hoc* de Bonferroni para analizar los cambios en el porcentaje de concentración con respecto al grupo y al tiempo para cada neurotransmisor.

Se utilizó la prueba t de Student no pareada para analizar las diferencias en el consumo de sacarina 0.1% durante la evocación entre los grupos Aversivo y No-Aversivo.

Para los experimentos de manipulación farmacológica, se analizó el consumo de sacarina con una ANOVA de dos vías y se utilizó el método de Tukey para las comparaciones múltiples a lo largo de los días de prueba y entre los grupos. Se consideró el valor de p<0.05 como estadísticamente significativo para todos los análisis. Todos los análisis se hicieron con Statview v4.57 (Abacus concepts Inc, E.U.A.).

CAMBIOS EXTRACELULARES DE NEUROTRANSMISIÓN EN LA AMÍGDALA Y LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA EVOCACIÓN DEL CAS

Metodología particular

Microdiálisis en la amígdala durante la evocación

Los animales se anestesiaron y se les implantó una cánula guía (CMA, Suecia) en la amígdala (AP = -2.8, L \pm 4.8, y DV= -7.5) o en la corteza insular (AP = 1.2, L \pm 5.5, y DV= -4.5) (Paxinos y Watson, 1998) mediante cirugía estereotáxica convencional

El día de la evocación del CAS, se insertó una sonde de microdiálisis con una membrana de 1 mm de largo para la amígdala (CMA, Suecia) y de 3 mm para la corteza insular (CMA, Suecia), las membranas se conectaron al sistema de microinfusión, el cual perfundió solución Ringer a una velocidad de 0.8 µL/min y de 1.0 µL/min para la amígdala y la corteza insular respectivamente.

Manipulación farmacológica de la amígdala y la CI en la evocación del CAS

A los animales se les implantó bilateralmente cánulas guía de acero inoxidable de 12 mm de largo en la amígdala (AP= -2.8, L= ±4.8, y DV= -6.5, con respecto a Bregma); y de 9 mm para la corteza insular (AP= +1.2, L= ±5.5, y DV= -3 (Paxinos y Watson, 1998), las cánulas se insertaron mediante protocolos estereotáxicos convencionales. Se insertaron estiletes para evitar la oclusión de las cánulas. Los animales tuvieron una recuperación post-quirúrgica de 6 días.

Protocolo conductual: Manipulación farmacológica de la amígdala y la CI en la evocación del CAS

Posterior a la recuperación quirúrgica, los animales se privaron de agua por 24 horas. Durante los siguientes 5 días, se les proporcionó en las cajas de acrílico un bebedero con 30 mL de agua durante 15 minutos, se registró el consumo de agua para establecer la línea basal de ingesta. Por la tarde, los animales tuvieron acceso a un segundo consumo de 30 mL de agua para evitar la deshidratación. Las ratas se manipularon diariamente durante el establecimiento de la línea basal de ingesta por tres minutos para disminuir el estrés el día de la micro-infusión.

El día de la adquisición del CAS a todas las ratas se les expuso a 30 mL de sacarina 0.1% y 15 minutos después se les inyectó i.p. LiCl 0.2M en una dosis de 7.5 mL/kg. Por la tarde se les suministró de nueva cuenta agua. Los dos días siguientes se les presentó agua por la mañana y por la tarde.

El día de la prueba se realizó una segunda adquisición del CAS, dicho protocolo (Figura 10) permite evaluar el proceso de reconsolidación y actualización del CAS (Rodríguez-Ortíz et al. 2012; García-Delatorre et al., 2014). Durante la segunda adquisición, los animales se separaron en 5 grupos contrabalanceados a partir del consumo durante la adquisición del CAS. Veinte minutos antes de la evocación se retiraron los estiletes y se insertaron los inyectores dentales con un largo de 13 mm para la amígdala, los cuales estaban conectados por medio de una tubería de polietileno a dos jeringas de microinyección de 10 µl (Hamilton Co., E.U.A.), las cuales se encontraban montadas en una bomba automática de microinfusión (Cole

– Parmer, E.U.A.). Todos los fármacos se disolvieron en solución salina 0.9% como vehículo. Se utilizaron como antagonistas: ácido amino-5-fosfonovalérico (APV 10 μ g/ μ l, Tocris, E.U.A.) para los receptores NMDA, hidrato disódico de 6-ciano-7nitroquinoxalina-2,3-diona CNQX 1 μ g/ μ l (SIgma-Aldrich, E.U.A.) para los receptores AMPA, propranolol 5 μ g/ μ l (SIgma-Aldrich, E.U.A.) para los receptores β-adrenérgicos, o SKF-38393 12 μ g/ μ l (SIgma-Aldrich, E.U.A.) para los receptores D1. Se inyectó 1 μ l por hemisferio a una velocidad de 0.5 μ l/min. Los inyectores se dejaron un minuto más para permitir la difusión del fármaco. Veinte minutos después de la inyección, a las ratas se les presentó durante 15 minutos un bebedero con 30 mL de sacarina 0.1% y 15 minutos después se realizó una inyección de LiCl 0.2M. Veinticuatro horas después, los animales fueron expuestos de nueva cuenta a 30 mL de sacarina 0.1% para una prueba de CAS.



Figura 10. Representación esquemática del protocolo conductual para la manipulación farmacológica de la amígdala durante la evocación del CAS. En la primera adquisición del CAS, los animales se expusieron a 30 mL de sacarina y 15 minutos después se les inyectó i.p. LiCl; 72 horas después se realizó la segunda adquisición del CAS (CAS 2), donde 20 minutos antes se inyectó intra-parenquimalmente solución salina (SS), antagonista de los receptores NMDA (APV), antagonista de los receptores AMPA (CNQX), antagonista de los receptores D1 (SCH) o un antagonista de los receptores β-adrenérgicos (Propranolol), después se presentó sacarina y la subsecuente inyección i.p. de LiCl. Se realizó una prueba de aversión 24 horas después de la adquisición del CAS 2.

Resultados: Cambios extracelulares de neurotransmisión en la

amígdala durante la evocación del CAS

Glutamato en la amígdala durante la evocación del CAS

El análisis estadístico indicó diferencias significativas en los niveles extracelulares de glutamato entre los grupos (Aversivo o No-Aversivo) ($F_{(1,98)}$ =10.080, p<0.01). Asimismo, se registró una interacción entre las muestras y los grupos ($F_{(7,98)}$ =2.171, p<0.05). El análisis *post hoc* indicó que el grupo expuesto a la sacarina No Aversiva permaneció sin cambios en los niveles extracelulares de glutamato en la amígdala a lo largo de la microdiálisis (NS), mientras que el grupo expuesto a la sacarina Aversiva mostró cambios significativos a lo largo del tiempo, específicamente cuando el estímulo condicionado estaba presente en la fracción cinco (p<0.01). La exposición al estímulo gustativo indujo un aumento en los niveles extracelulares de glutamato en la fracción cinco en la amígdala para el grupo Aversivo en comparación al grupo No Aversivo (p<0.05) (Figura 11).



Figura 11. Niveles extracelulares de glutamato en la amígdala durante la evocación del CAS. Se observan cambios en la concentración basal de glutamato en animales condicionados (Aversivo, n=10), mientras que los animales no condicionados (No-aversivo, n=8) no muestran cambios en los niveles extracelulares de glutamato. La gráfica está expresada como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal y # p<0.05 versus No aversivo. Cada fracción equivale a 4 min de monitoreo.

Norepinefrina en la amígdala durante la evocación del CAS

Durante la evocación del CAS, el análisis estadístico mostró diferencias significativas en los niveles extracelulares de norepinefrina en la amígdala entre los grupos ($F_{(1,63)}$ =6.611 p<0.05). Además hubo una interacción significativa entre el muestreo y los grupos ($F_{(7,63)}$ =2.121 p<0.05); mientras que no hubo cambios significativos a lo largo del muestreo ($F_{(7,63)}$ =0.811 p=NS). El análisis *post hoc* mostró que en el grupo Aversivo, hubo diferencias significativas a los largo del dializado comparado con los niveles basales de norepinefrina en la amígdala (p<0.05). El incremento de norepinefrina en las fracciones 4 y 5, donde el estímulo gustativo se encontraba presente fue estadísticamente diferente entre el grupo Aversivo (p<0.05) (Figura 12).



Figura 12. Niveles extracelulares de norepinefrina en la amígdala durante la evocación del CAS. Se observan cambios en la concentración basal de norepinefrina en animales condicionados (Aversivo, n=10), mientras que los animales no condicionados (No-aversivo, n=8) no muestran cambios en los niveles extracelulares de norepinefrina. La gráfica está expresada como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, *p< 0.05 vs concentración basal y # p<0.05 versus No aversivo. Cada fracción equivale a 4 min de monitoreo.

Dopamina en la amígdala durante la evocación del CAS

Se observaron cambios significativos en los niveles extracelulares de dopamina en la amígdala durante la evocación del CAS entre los grupos ($F_{(1,118)}=4.172 \text{ p}<0.05$). No obstante, no se registraron cambios en dopamina a lo largo del muestreo ($F_{(7,118)}=0.838 \text{ p}=\text{NS}$), y tampoco se observó una interacción entre el muestreo y el grupo ($F_{(7,118)}=1.222 \text{ p}=\text{NS}$). El análisis *post hoc* indicó que el grupo expuesto a la sacarina aversiva mostró cambios significativos a lo largo del dializado comparado con la línea basal de dopamina (p<0.01). El incremento de dopamina observado en la fracción cinco para el grupo Aversivo fue diferente en comparación al grupo No Aversivo (p<0.01) (Figura 13).



Figura 13. Niveles extracelulares de dopamina en la amígdala durante la evocación del CAS. Se observan cambios en la concentración basal de dopamina en animales condicionados (Aversivo, n=10), mientras que los animales no condicionados (No-aversivo, n=8) no muestran cambios en los niveles extracelulares de dopamina. La gráfica está expresada como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal y # p<0.05 versus No aversivo. Cada fracción equivale a 4 min de monitoreo.

Respuestas conductuales de aversión

El análisis estadístico mostró diferencias significativas (t=4.343, p<0.01) en el consumo de sacarina el día de la evocación del CAS, el grupo Aversivo tuvo una clara aversión el día de la evocación, mientras que el grupo No Aversivo ingirió más sacarina (Figura 14).



Figura 14. Respuestas conductuales de aversión. El grupo Aversivo (n=10) muestra una clara aversión durante la evocación de la memoria. La gráfica se muestra como promedio del porcentaje del consumo de sacarina durante la adquisición ± SEM. # p<0.05 versus No aversivo (n=8)

De acuerdo con estos resultados, cuando los animales son expuestos a un estímulo gustativo previamente asociado con malestar gástrico existe un incremento en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la amígdala mientras que se observa una reducción en el consumo del estímulo.

Manipulación farmacológica de la amígdala durante la evocación

Se comparó el consumo de sacarina durante los días del CAS 1, CAS 2 y la prueba de memoria (Figura 15). Se analizó el efecto de los tratamientos farmacológicos, el

día del consumo y la interacción entre el tratamiento y el día de consumo. El consumo de sacarina cambió a lo largo de los días ($F_{(2,129)}$ =107.752 p<0.01). También se observó un efecto del tratamiento farmacológico ($F_{(4,129)}$ = 3.396 p<0.05) y de la interacción del tratamiento y los días de consumo (F_(8,129)=3.079 p<0.01). El consumo de sacarina durante la adquisición del CAS 1 fue similar en todos los grupos (NS). El análisis estadístico mostró que el tratamiento farmacológico inyectado en la amígdala 20 minutos antes de la adquisición del CAS 2 tuvo efecto sobre el consumo de sacarina el día de la segunda adquisición. La inyección intraamigdalina de los antagonistas para los receptores AMPA (CNQX, p<0.01) y β adrenérgicos (propranolol, p<0.01) afectó la expresión conductual de aversión el día de la invección comparada con el grupo invectado con solución salina. Por otra parte, la infusión de los antagonistas de los receptores NMDA (APV) o de los receptores D1 (SCH) no afectó la expresión conductual (NS) de aversión durante la adquisición del CAS 2. El bloqueo de los receptores AMPA en la amígdala durante la adquisición del CAS 2 no afectó el consumo de sacarina durante la prueba de memoria, ya que el consumo de sacarina fue similar con el grupo inyectado con solución salina (NS). Por el contrario el bloqueo de los receptores NMDA (p<0.05), β -adrenérgicos (p<0.05) o los D1 (p<0.05) el día de la adquisición del CAS 2, afectó la actualización del CAS observado como un aumento en el consumo de sacarina durante el día de la prueba en comparación al grupo invectado con solución salina.



Figura 15. Participación de los receptores NMDA, AMPA, D1 y β-adrenérgicos en la evocación y actualización de la memoria. (A) El receptor NMDA no participa en la expresión conductual del CAS durante el CAS2 (APV, n=9), pero es necesario para la actualización del trazo. (B) Los receptores AMPA (CNQX, n=9) en la amígdala están involucrados en la expresión conductual del CAS mientras que no participan en la actualización del trazo. (C) Los receptores D1 de dopamina no están involucrados en la expresión conductual del CAS pero participan en la actualización de la memoria (SCH, n=11). (D) Los receptores β-adrenérgicos (PROP, n=9) en la amígdala participan en la expresión conductual y la actualización de la memoria gustativa de aversión. Las gráficas están expresada como el promedio del porcentaje del consumo de sacarina durante la adquisición del CAS 1± SEM. *p < 0.05; **p < 0.01 contra SS (n=10) La flecha indica el momento de la invección.</p>

Localización de las cánulas de microdiálisis y microinyección

Se verificó mediante un microscopio de luz la ubicación de las membranas de microdiálisis para la amígdala de los grupos expuestos con sacarina Aversiva y No-Aversiva. De manera similar se verificaron los sitios de microinyección para los diferentes grupos de farmacología en la amígdala (Figura 16). Los animales que fueron implantados de manera incorrecta fueron descartados del análisis estadístico.



Figura 16. Representación esquemática y microfotografía de la localización de cánulas y sitios de inyección. (A) Localización de las membranas para microdiálisis en la amígdala. (B) Localización de los sitios de inyección para la amígdala.

Resultados: Cambios extracelulares de neurotransmisión en la corteza insular durante la evocación

Glutamato en la corteza insular durante la evocación del CAS

El análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas en los niveles extracelulares de glutamato entre grupos ($F_{(1,120)}$ = 11.238 p< 0.01); entre el muestreo ($F_{(5,120)}$ = 2.676 p< 0.05); y además se registró una interacción entre el muestreo y los grupos ($F_{(5,120)}$ = 3.300 p< 0.01). El grupo que fue expuesto a la sacarina Aversiva mostró diferencias en los niveles de glutamato comparado con la línea basal de concentración en la fracción seis (p< 0.01) cuando el estímulo gustativo de aversión se encontraba presente, mientras que en el grupo expuesto a la sacarina No-Aversiva no mostró cambios en los niveles de glutamato a lo largo del muestreo (NS) (Figura 17).



Figura 17. Niveles extracelulares de glutamato en la corteza insular durante la evocación del CAS. Se observan cambios en la concentración basal de glutamato en animales condicionados (Aversivo, n=8), mientras que los animales no condicionados (No-aversivo, n=7) no muestran cambios en los niveles extracelulares de glutamato. La gráfica está expresada como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal y # p<0.05 versus No aversivo. Cada fracción equivale a 5 min de monitoreo.

Norepinefrina en la corteza insular durante la evocación del CAS

Durante la evocación del CAS, el análisis estadístico reveló diferencias significativas en los niveles de norepinefrina en la CI entre los grupos ($F_{(1,115)}$ = 4.343, p< 0.05) y a lo largo del muestreo ($F_{(5,115)}$ = 5.253, p< 0.01); no se observó una interacción entre los grupos y el muestreo ($F_{(5,115)}$ = 1.559, p= NS). En el grupo de sacarina Aversiva, existe un aumento en norepinefrina cuando las ratas son expuestas al estímulo gustativo de aversión en la fracción seis (p<0.01), mientras no se observaron cambios en los niveles extracelulares de norepinefrina en la CI a lo largo del muestreo en el grupo expuesto a la sacarina No-Aversiva (Figura 18).



Figura 18. Niveles extracelulares de norepinefrina en la corteza insular durante la evocación del CAS. Se observan cambios en la concentración basal de norepinefrina en animales condicionados (Aversivo, n=8), mientras que los animales no condicionados (No-aversivo, n=7) no muestran cambios en los niveles extracelulares de norepinefrina. La gráfica está expresada como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, *p< 0.05 vs concentración basal. Cada fracción equivale a 5 min de monitoreo.

Dopamina en la corteza insular durante la evocación del CAS

Con respecto a los niveles extracelulares de dopamina en la CI durante la evocación

del CAS, existen cambios significativos en dopamina entre los grupos ($F_{(1,124)}$ = 8.625 p< 0.01); el muestreo ($F_{(5,124)}$ = 4.684 p< 0.01); mientras que no se observó una interacción entre el muestreo y los grupos ($F_{(5,124)}$ = 1.890 p= NS). El grupo expuesto a la sacarina Aversiva mostró cambios en los niveles de dopamina comparados con la concentración basal en la fracción seis cuando la sacarina estaba presente (p<0.01), mientras que el grupo expuesto a sacarina No-Aversiva no mostró cambios en los niveles de dopamina a lo largo del muestreo (NS) (Figura 19).



Figura 19. Niveles extracelulares de dopamina en la corteza insular durante la evocación del CAS. Se observan cambios en la concentración basal de dopamina en animales condicionados (Aversivo, n=8), mientras que los animales no condicionados (No-aversivo, n=7) no muestran cambios en los niveles extracelulares de dopamina. La gráfica está expresada como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal. Cada fracción equivale a 5 min de monitoreo.

Respuestas conductuales de aversión

La respuesta al condicionamiento aversivo al sabor se estimó mediante el consumo

de sacarina durante la microdiálisis en la evocación del CAS (Figura 20). El análisis

estadístico indicó diferencias significativas en el consumo de sacarina entre los grupos (t= 7.135, p< 0.01). El grupo expuesto a una sacarina Aversiva tuvo una aversión clara.



Figura 20. Respuestas conductuales de aversión. El grupo Aversivo (n=8) muestra una clara aversión durante la evocación de la memoria. La gráfica se muestra como el promedio del porcentaje del consumo de sacarina durante la adquisición ±SEM. # p<0.05 versus No aversivo (n=7)

De acuerdo a estos resultados, durante la evocación del CAS, los animales expuestos a un sabor previamente asociado con malestar gástrico muestran un incremento en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la CI, estos animales también muestran una clara aversión al sabor.

Manipulación farmacológica de la corteza insular durante la evocación

El análisis estadístico mostró cambios significativos en el consumo de sacarina a lo largo de los días ($F_{(2,28)}$ =97.572 p<0.01), además se registraron diferencias en el consumo de sacarina entre los grupos ($F_{(4, 56)}$ = 3.526 p<0.05) y también se mostraron cambios en los consumos de sacarina debido a la interacción grupo-día ($F_{(8,56)}$ =4.438 p<0.01). Durante la primera adquisición, no hubo cambios en el

consumo de sacarina entre los grupos (NS). Veinte minutos antes de la segunda adquisición del CAS se encontraron diferencias entre los grupos ($F_{(8,28)}$ =10.818 p< 0.01); el bloqueo en la CI de los receptores AMPA (p<0.01), D1 (p<0.01) y β-adrenérgicos (p<0.01) afectó la expresión conductual del CAS en comparación al grupo inyectado con solución salina. Por otro lado, el bloqueo de los receptores NMDA en la CI no afectó el consumo de sacarina durante la adquisición del CAS 2 (NS). Durante la prueba de memoria se observaron diferencias significativas en el consumo de sacarina entre los grupos ($F_{(4, 56)}$ = 3.574 p< 0.05). El bloqueo de los receptores AMPA (p< 0.01), NMDA (p< 0.05), β-adrenérgicos (p< 0.05) y D1 (p< 0.01) afectó el consumo de sacarina el día de la prueba en comparación al grupo inyectado con solución salina (Figura 21).



Figura 21. Participación de los receptores NMDA, AMPA, D1 y β-adrenérgicos en la evocación y actualización de la memoria. (A) Los receptores AMPA (CNQX, n=7) en la CI participan en la expresión conductual de la aversión y la actualización de la memoria. (B) Los receptores NMDA no están involucrados en la expresión conductual del CAS (APV, n=7), pero participan en la actualización del trazo. (C) Los receptores D1 de dopamina están involucrados en la expresión

conductual del CAS y en la actualización de la memoria (SCH, n=6). (D) Los receptores βadrenérgicos (PROP, n=7) en la corteza insular son necesarios para la expresión conductual y la actualización de la memoria gustativa de aversión. Las gráficas están expresadas como el promedio del porcentaje del consumo de sacarina durante la línea basal de consumo± SEM. *p < 0.05; **p < 0.01 contra SS (n=6). La flecha indica el momento de inyección.

Localización de las cánulas de microdiálisis y microinyección

Se verificó mediante un microscopio de luz la ubicación de las membranas de microdiálisis para la corteza insular de los grupos expuestos con sacarina Aversiva y No-Aversiva. De manera similar, se verificaron los sitios de microinyección para los diferentes grupos de farmacología en la corteza insular (Figura 22). Los animales que fueron implantados de manera incorrecta se descartaron el análisis estadístico.



Figura 22. Representación esquemática y microfotografía de la localización de cánulas y sitios de inyección. (A) Localización de las membranas para microdiálisis en la corteza insular. (B) Localización de los sitios de inyección para la corteza insular.

CIRCUITO AMÍGDALA-CORTEZA INSULAR EN LA EVOCACIÓN

Metodología particular

Manipulación farmacológica de la amígdala mientras se realiza microdiálisis in vivo en la Cl

Los animales se implantaron unilateralmente con una cánula de microdiálisis dirigida a la CI (AP + 1.2 mm; L +5.5 mm; DV -4.5 mm) y conjuntamente de manera bilateral con cánulas de acero inoxidable en la amígdala (AP -2.8 mm, L ± 4.8 mm, DV -6.5). Después de seis días de recuperación post-quirúrgica, los animales se habituaron por cinco días a una burbuja de microdiálisis, donde se les presentó 30mL de agua para establecer la línea basal de consumo. El día de la adquisición, se les presentó 30 mL de sacarina 0.1% y 15 minutos después se les inyectó i.p. LiCl 0.2M en una dosis de 7.5 mL/kg. El día de la prueba, los animales se separaron en 3 grupos de acuerdo al consumo de sacarina el día de la adquisición. La microdiálisis se realizó mediante la inserción de una membrana de 3 mm de largo a la cánula guía, la cual perfundió solución Ringer a una velocidad de 1.0 µL/min en la CI. Se descartaron los primeros 60 minutos de dializado y se recolectaron las muestras cada 4 minutos (4.0 µL/muestra) en tubos eppendorf de 200 µL que contenían 1.0 µL de mezcla antioxidante. Las primeras tres muestras se utilizaron como línea basal de concentración. Al finalizar la recolección de las tres primeras muestras, se removieron los estiletes y se realizaron las micro-infusiones en la amígdala. Se inyectó un volumen total de 1 µL (0.5 µL/min) por hemisferio, el invector se dejó otro minuto para permitir la difusión. Los animales fueron infundidos con solución salina (0.9%), APV (10 ug/uL) o CNQX (1 ug/uL). Veinte minutos después de la infusión intra-amigdalina, los animales se expusieron a 30 mL de sacarina y se recolectaron muestras de dializado hasta que se obtuvieran 10 muestras. El consumo de sacarina se regsitró (Figura 23).



Figura 23. Representación esquemática del protocolo conductual para la manipulación farmacológica de la amígdala mientras se monitorea la CI por microdiálisis *in vivo* durante la evocación del CAS. Durante la adquisición del CAS, los animales se expusieron a sacarina y 15 minutos después se le inyectó i.p. LiCI; 72 horas después se realizó la microdiálisis para la CI Las primeras tres muestras se utilizaron como concentración basal de los neurotransmisores, inmediatamente después se inyectó en la amígdala solución salina (SS), un antagonista de los receptores NMDA (APV) o un antagonista de los receptores AMPA (CNQX), 20 minutos después y a partir de la cuarta fracción, los animales se expusieron de nueva cuenta a sacarina por 15 minutos, se recolectaron muestras hasta obtener 10 fracciones.

Resultados: Circuito amígdala-corteza insular en la evocación

Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente los

niveles glutamato en la CI durante la evocación

El análisis estadístico indicó que los niveles extracelulares de glutamato cambiaron a lo largo del muestreo ($F_{(5,217)}$ = 5.175, p< 0.01); también se observó un efecto entre el muestreo y los grupos ($F_{(10,217)}$ = 1.928, p< 0.05). No se observaron diferencias entre los grupos (SS, CNQX, APV) ($F_{(2,217)}$ = 0.774, NS). El análisis *post hoc* reveló que las concentraciones de glutamato en la CI cambiaron a lo largo del muestreo en animales inyectados con solución salina en la amígdala ($F_{(5,81)}$ = 4.819, p< 0.01) o con CNQX ($F_{(5,68)}$ = 2.991, p< 0.05) durante la evocación del CAS, específicamente en la sexta fracción (p< 0.01). Por el contrario, los niveles extracelulares de glutamato en la CI fueron similares a lo largo del muestreo en el grupo inyectado con APV en la amígdala durante la evocación del CAS ($F_{(5,68)}$ = 1.542, NS). En la sexta fracción, el análisis *post hoc* indicó que los niveles extracelulares de glutamato fueron similares entre los grupos inyectados con SS y CNQX (NS), mientras que existen diferencias significativas entre los grupos SS y APV (p< 0.05) (Figura 24).



Figura 24. Los receptores glutamatérgicos de la amígdala afectan diferencialmente los niveles extracelulares de glutamato en la CI. La infusión intra-amigdalina de CNQX (n=9) no afecta el incremento de glutamato en la CI durante la evocación del CAS. La inyección de APV (n=8) en la amígdala afecta los cambios en glutamato en la CI durante la evocación. Las gráficas están expresadas como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal y # p<0.05 versus SS (n=9). Cada fracción equivale a 4 min de monitoreo.

Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente los

niveles norepinefrina en la CI durante la evocación

Con respecto a los niveles de norepinefrina en la CI, existen cambios significativos a lo largo del muestreo ($F_{(5,222)}$ = 5.215, p< 0.01) y se observó una interacción muestreo-grupo ($F_{(10,222)}$ = 2.274, p<0.05). No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(2,222)}$ = 1.353, NS). El análisis *post hoc* mostró que

los niveles extracelulares de norepinefrina en la CI cambiaron a lo largo del muestreo en los grupos inyectados con solución salina ($F_{(5,60)}$ = 2.274, p<0.01) o con APV ($F_{(5,68)}$ = 2.899, p<0.05) en la amígdala durante la evocación del CAS, especificamente en la sexta fracción para el grupo con solución salina (p< 0.01) y en la quinta para el grupo inyectado con APV (p< 0.05). No obstante, el análisis *post hoc* mostró que los niveles extracelulares de norepinefrina en la CI fueron similares a lo largo del muestreo para el grupo inyectado con CNQX en la amígdala ($F_{(5,74)}$ = 1.140, NS). En la quinta fracción el análisis *post hoc* indicó que la concentración de norepinefrina es diferente ente los grupos inyectados con solución salina y con APV (p<0.05), mientras que en la sexta fracción existen diferencias significativas entre los grupos inyectados con solución salina y CNQX (p< 0.05) (Figura 25).



Figura 25. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos de la amígdala afectan diferencialmente los niveles extracelulares de norepinefrina en la CI. La infusión intra-amigdalina de CNQX (n=9) impide el incremento de norepinefrina en la CI durante la evocación del CAS. La inyección de APV (n=8) en la amígdala no afecta los cambios en norepinefrina en la CI durante la evocación. Las gráficas están expresadas como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal y # p<0.05 versus SS (n=9). Cada fracción equivale a 4 min de monitoreo.

Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente los niveles dopamina en la CI durante la evocación

El análisis estadístico indicó que los niveles extracelulares de dopamina en la CI son significativamente diferentes a lo largo del muestreo ($F_{(5.220)}$ = 5.831, p< 0.01), debido al grupo (F_(2,220)= 3.468, p< 0.05), y debido a la interacción entre el muestreo y el grupo ($F_{(10,220)}$ = 2.380, p< 0.05). El análisis post hoc indicó que los niveles extracelulares de dopamina en la CI cambiaron a lo largo del muestreo en los grupos inyectados en la amígdala con solución salina ($F_{(5.77)}$ = 3.930, p< 0.01) y con APV (F_(5,70)= 3.594, p< 0.01) durante la evocación del CAS, específicamente en la sexta fracción donde el estímulo gustativo de aversión estaba presente (p< 0.01). Sin embargo, la concentración de dopamina en la CI fue similar a lo largo del muestreo en los animales inyectados con CNQX en la amígdala durante la evocación del CAS (F_(5,73)= 3.594, NS). El análisis post hoc mostró que el incremento de dopamina en la fracción seis era similar entre los grupos invectados con solución salina y con APV (NS), mientras que existen diferencias significativas entre los grupos inyectados con solución salina y con CNQX (p< 0.05). En la fracción siete hubo diferencias significativas entre el grupo inyectado con solución salina y con APV (p < 0.05) (Figura 26).



Figura 26. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos de la amígdala afectan diferencialmente los niveles extracelulares de dopamina en la CI. La infusión intra-amigdalina de CNQX (n=9) impide el incremento de dopamina en la CI durante la evocación del CAS. La inyección de APV (n=8) en la amígdala no afecta los cambios en dopamina en la CI durante la evocación. Las gráficas están expresadas como porcentaje promedio de la concentración basal ±SEM, **p< 0.01 vs concentración basal y # p<0.05 versus SS (n=9). Cada fracción equivale a 4 min de monitoreo.

Los receptores AMPA y NMDA en la amígdala modulan diferencialmente las

respuestas conductuales de aversión

El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la evocación del CAS entre los grupos ($F_{(2,22)}$ = 25.755, p< 0.01). El análisis *post hoc* mostró que los animales inyectados con CNQX en la amígdala tienen una respuesta de aversión menor comparada con los grupos inyectados con solución salina o con APV (p< 0.01), mientras que no se observaron diferencias en el consumo entre los grupos inyectados con solución salina y con APV (NS) indicando que estos dos grupos muestran una clara aversión al sabor (Figura 27).



Figura 27. Respuestas conductuales de aversión durante la manipulación farmacológica de la amígdala. La inyección de solución salina y APV (n=8) no afectó la aversión mostrada durante la evocación del CAS, mientras que la inyección de CNQX (n=9) en la amígdala afectó la respuesta de aversión. Las gráficas están expresadas como el promedio del porcentaje del consumo de sacarina durante la adquisición del CAS 1± SEM. *p < 0.05; **p < 0.01 contra SS (n=9).

Estos datos indican que el bloqueo intra-amigdalino de los receptores AMPA afecta

la expresión conductual del CAS, así como los niveles extracelulares de dopamina y norepinefrina en la CI durante la evocación del CAS; no obstante el incremento en los niveles de glutamato persistió. De forma diferente, el bloqueo de los receptores NMDA en la amígdala afectó el aumento de los niveles extracelulares de glutamato en la CI mientras que el aumento en la neurotransmisión catecolaminérgica permaneció intacto así como la expresión conductual de aversión.

Localización de las cánulas de microdiálisis y microinyección

Se verificó la ubicación de las membranas de microdiálisis para la corteza insular mediante un microscopio de luz. De manera similar se verificaron los sitios de microinyección para los diferentes grupos en la amígdala (Figura 28). Los animales implantados de manera incorrecta fueron descartados para el análisis estadístico.



Figura 26. Representación esquemática y microfotografía de la localización de cánulas y sitios de inyección. Localización de las membranas de microdiálisis en la corteza insular y de los sitios de inyección para la amígdala.

DISCUSIÓN

Aunque la evocación de la memoria es un proceso muy importante, existe poca información sobre los mecanismos fisiológicos que subyacen la selección, reactivación y reconstrucción de representaciones mnémicas almacenadas previamente (Dudai, 2002).

Durante la adquisición del CAS, cuando un animal es expuesto a un estímulo gustativo novedoso no se inducen cambios en glutamato en la CI aún cuando los animales son expuestos a un sabor naturalmente aversivo (quinina 0.005% p/v) (Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2011). Sin embargo existe un incremento en los niveles de acetilcolina (Miranda et al., 2000) y dopamina (Guzmán-Ramos et al., 2010). La subsecuente inyección de LiCI como inductor de malestar gástrico, produce un aumento en glutamato en la CI (Guzmán-Ramos et al., 2010). En la amígdala ocurren eventos similares, ya que la exposición a un estímulo novedoso no modificó las concentraciones de glutamato en la amígdala (Miranda et al., 2002; Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2011; Guzmán-Ramos et al., 2012) Sin embargo la inyección de LiCI, usado como inductor de malestar gástrico produjo un incremento en los niveles de glutamato en la amígdala (Miranda et al., 2002; Guzmán-Ramos et al., 2012).

En el presente trabajo, observamos que el consumo de sacarina previamente asociada con malestar gástrico ahora es capaz de inducir un incremento en los niveles extracelulares de glutamato tanto en la amígdala (Tucci et al. 1998), como

en la CI; este incremento es similar al aumento inducido por la inyección de LiCI durante la adquisición (Guzmán-Ramos et al., 2010; Guzmán-Ramos et al., 2012). Estos datos sugieren que durante la evocación del CAS, la ingesta de un sabor asociado con malestar gástrico induce un aumento en los niveles extracelulares de glutamato, es decir el estímulo gustativo ahora genera una respuesta condicionada conductual de aversión y una respuesta de liberación de glutamato similar al LiCI. Entonces, el glutamato probablemente esté relacionado con el carácter aversivo de los estímulos condicionados e incondicionados.

Es ampliamente conocido que la norepinefrina está involucrada en establecimiento de memorias aversivas (McGaugh et al., 2013). La presentación de estímulos estresantes induce la liberación de norepinefrina en la amígdala (McIntyre et al., 2002; Morilak et al., 2005) y en el prosencéfalo (Morilak et al., 2005), incluyendo la CI (Funk y Stewart, 1996). En la evocación del CAS, la exposición del estímulo gustativo previamente asociado con un estímulo nocivo incrementa los niveles de norepinefrina tanto en la amígdala como en la CI, probablemente a través de un mecanismo relacionado con el estrés.

Con respecto a la dopamina, los datos obtenidos aquí muestran que existe un aumento en los niveles extracelulares de este neurotransmisor en la amígdala y la CI durante la evocación del CAS. Existen trabajos que han reportado tanto un aumento como la disminución de la actividad dopaminérgica ante la exposición de un estímulo aversivo; por un lado se ha descrito la disminución de actividad dopaminérgica en neuronas del núcleo accumbens ante la presentación de un

estímulo aversivo (McCutcheon et al., 2012), de manera contraria se ha reportado que la presentación de choques eléctricos en la rata induce el aumento en la respuesta electrofisiológica fásica de neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (Brischoux et al., 2009). Además, es importante destacar que los estímulos recompensantes como la comida (Hernández y Hoebel, 1988), drogas de abuso (Lecca et al., 2007), o la conducta sexual (Damsma et al., 1992) también pueden inducir aumentos o disminuciones de la actividad dopaminérgica. El aumento o la disminución de la actividad dopaminérgica, debidas a la presentación de estímulos aversivos o recompensantes, puede ser explicado por los grupos neuronales registrados y el tipo de estímulo utilizado. Sin embargo, todos estos datos sugieren que la actividad dopaminérgica probablemente no esté asociada con el carácter positivo o negativo del estímulo, sino la relevancia de este. Los datos en el presente trabajo revelan que hay un incremento en los niveles de dopamina en la amígdala y la CI durante la evocación del CAS. De manera interesante, cuando el estímulo es familiar y No Aversivo, no se registraron cambios en los niveles de dopamina. En este aspecto, se ha descrito que la presentación previa de un sabor reduce la respuesta dopaminérgica en el núcleo accumbens cuando el sabor es expuesto de nueva cuenta (De Luca et al., 2011), probablemente debido a que la relevancia del estímulo ha disminuido. En el presente estudio se observó un incremento de dopamina en la amígdala y la CI al consumir un sabor asociado con malestar, estos resultados sugieren que estímulo es relevante para el organismo, pues debe identificar el sabor asociado con enfermedad y evitar dicho sabor la próxima vez que lo encuentre, ya que el estímulo aversivo condicionado es una información sobresaliente como resultado de la amenaza al bienestar del
sujeto. Valdría la pena demostrar que la asociación de un estímulo gustativo con una recompensa también genera aumentos en los niveles extracelulares de dopamina como resultado de la relevancia del estímulo.

En la teoría de la reconsolidación, la evocación de la memoria es un proceso importante donde la información, previamente almacenada, es susceptible a ser fortalecida o debilitada mediante la actualización de la memoria. De tal manera, la evocación de la memoria induce que las memorias previamente consolidadas se vuelven lábiles, permitiendo la incorporación de información al trazo existente (Rodríguez-Ortíz et al., 2008).

La expresión conductual de tareas aversivas ha sido asociada con la actividad de los receptores AMPA en el hipocampo (Day et al., 2003), la amígdala basolateral (Tucci et al., 1998, Yasoshima et al., 2005; Rodríguez-Ortíz et al., 2012) y la amígdala central (García-Delatorre et al., 2014); asimismo se necesita de la actividad de los receptores AMPA en la CI para las tareas no aversivas (Santoyo-Zedillo et al., 2014). Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que el bloqueo de los receptores AMPA tanto en la amígdala como en la CI atenuó la expresión conductual de la memoria. Por otro lado, el antagonista de los receptores NMDA en la amígdala y en la CI no tuvo efecto en la expresión conductual durante la evocación pero impidió la actualización de la memoria. Asimismo, la inyección de CNQX en la CI impidió la actualización de la memoria de aversión. Se conoce que la amígdala basolateral está involucrada en la asociación entre los estímulos gustativos y la información visceral (Barot et al., 2008; Dardou et al., 2010; Pape y

Paré, 2010). En general, la amígdala basolateral y central reciben información excitatoria proveniente de la información sensorial; la amígdala basolateral envía proyecciones excitatorias a las neuronas de la amígdala central (Sah et al., 2003) favoreciendo la expresión conductual de las memorias aversivas (Maren, 2005). De tal manera, que el bloqueo de los receptores AMPA en la amígdala disminuye la actividad excitatoria de la amígdala y la subsecuente expresión conductual de aversión como resultado de la disminución de la actividad de la amígdala central. Con respecto a la CI, existe poca información que ayude a dilucidar los mecanismos involucrados en la evocación del CAS; hasta ahora se sabe que el bloqueo de los receptores AMPA disminuye la expresión conductual de tareas no aversivas (Santoyo-Zedillo et al., 2014) y del CAS (Berman et al., 2000). Los resultados observados en este trabajo apoyan dicha participación.

El presente estudio mostró que el bloqueo de los receptores NMDA tanto en la amígdala como en la CI impidió la actualización de la memoria. Este efecto puede ser interpretado a través de la participación de los receptores NMDA en el establecimiento de memorias. Se sabe que durante la inducción del malestar gástrico es necesaria la actividad de los receptores NMDA en la amígdala para la formación del CAS (Tucci et al., 1998; Yasoshima et al., 2000). Además se ha descrito que los receptores NMDA en la CI participan en el fortalecimiento del CAS (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Ferreira et al., 2005). Estos resultados sugieren que el bloqueo de la actividad de los receptores NMDA en la amígdala y en la CI pudo debilitar la detección del malestar gástrico en la segunda adquisición del CAS. Otra posible explicación es que la activación de los receptores NMDA

permite la entrada de calcio, favoreciendo cascadas de señalización relacionadas la síntesis de nuevas proteínas involucradas en cambios plásticos duraderos observados durante la consolidación (Guzmán-Ramos et al., 2010), por lo tanto el bloqueo de la actividad de los receptores NMDA disminuye la consolidación y fortalecimiento del segundo CAS.

Existe amplia evidencia sobre la participación de los receptores β-adrenérgicos en la modulación de la consolidación de la memoria. Sin embargo, el papel funcional de los receptores β-adrenérgicos en la evocación y reconsolidación de la memoria ha sido poco estudiado. Hasta ahora, se ha demostrado que la infusión de antagonistas de los receptores β -adrenérgicos en el hipocampo (Barros et al., 2001; Murchison et al., 2004; Otis et al., 2014), la amígdala y las cortezas entorrinal, parietal y anterior cingulada (Barros et al., 2001) impide la expresión conductual de memorias aversivas. No obstante, otros autores han demostrado que la actividad de los receptores β-adrenérgicos no están involucrados en la evocación del condicionamiento al miedo en el hipocampo (Izquierdo et al., 1997; Qi et al., 2008), ni en la evocación del condicionamiento aversivo al olor en la amígdala (Miranda et al., 2007). En el presente trabajo se evaluó el efecto del bloqueo de los receptores β-adrenérgicos en la expresión conductual y actualización de la memoria en un protocolo de dos adquisiciones del CAS. Los datos muestran que las infusiones de propranolol en la amígdala y la CI antes de la segunda adquisición, atenúa la expresión conductual de aversión durante la evocación y disminuye la actualización de la memoria. Hasta ahora, se ha descrito que los receptores β-adrenérgicos en la amígdala basolateral son necesarios para el proceso de reconsolidación de memorias aversivas inducidas por morfina (Wu et al., 2014). Aunque la participación de los receptores β -adrenérgicos en la reconsolidación de memorias ha arrojado datos contradictorios, las diferencias en los efectos de los antagonistas pueden ser explicados por variedad en las concentraciones de fármacos, tiempos de inyección, tareas y estructuras cerebrales empleadas, es claro por los resultados presentados aquí que la norepinefrina está involucrada no solo en la consolidación de memorias estresantes (McGaugh, 2004) sino también en la expresión conductual y actualización de memorias aversivas al sabor.

De manera interesante existe una dicotomía en la participación de los receptores D1 de la amígdala y de la CI en la expresión conductual del CAS; en la amígdala su bloqueo no afecta la expresión conductual, mientras que en la CI el bloqueo disminuye la expresión conductual de aversión; no obstante ambas estructuras dependen de la actividad de los receptores D1 para la actualización de la memoria. Se sabe que la amígdala central expresa una gran cantidad de receptores D1 (Fuxe et al., 2003) y que su actividad es necesaria en la expresión de tareas aversivas (Maren, 2005). Estos resultados sugieren que la modulación de la amígdala central a través de los receptores D1 podría participar en la expresión conductual del CAS; sin embargo, la mayoría de los trabajos que han reportado la participación de los D1 en la expresión conductual de memorias aversivas han utilizado el modelo de condicionamiento al miedo y de ahí las posibles diferencias con el presente trabajo. Por otro lado se ha descrito que la dopamina en la CI es de suma importancia para la detección de estímulos relevantes por la novedad (Guzmán-Ramos et al., 2010; 2012), por lo que es posible que el bloqueo de la actividad de los receptores D1 en

la CI disminuyan la detección de la relevancia de un estímulo gustativo de aversión observado como una disminución de la aversión mostrada en la evocación del CAS. El bloqueo de la actualización de la memoria por el antagonista de los D1 puede explicarse por la actividad sinérgica entre los receptores NMDA y los D1. Hay mucha información indicativa de la modulación de los receptores NMDA por la actividad dopaminérgica; dicha modulación se da por la fosforilación de la subunidad NR1 (Tingley et al., 1997) la cual promueve un mayor flujo de calcio a las neuronas, favoreciendo la síntesis de nuevas proteínas involucradas en cambios plásticos duraderos (Guzmán-Ramos et al., 2010). Sin embargo en el caso de la CI, la explicación puede ser otra, ya que al disminuir la detección de la relevancia del estímulo gustativo de aversión, se evita la incorporación de nueva información al trazo pues el estímulo al dejar de ser relevante pudo pasar desapercibido sin generar cambios plásticos en el trazo de memoria.

Durante la evocación de memorias consolidadas, se requiere de una nueva ola de síntesis de proteínas para mantener la información (Nader et al., 2000, Rodríguez-Ortíz y Bermúdez-Rattoni, 2007; Rodríguez-Ortíz et al., 2008; Nader y Einarsson, 2010). Cuando un estímulo es presentado en ausencia del estímulo incondicionado se inicia el proceso de extinción(Pavlov, 1927), el cual también requiere de síntesis de proteínas (de Carvalho Myskiw et al., 2015). Anteriormente se había considerado que la expresión conductual en la evocación de la memoria era necesaria para desencadenar mecanismos de reconsolidación (Nader y Einarsson, 2010). Sin embargo, hay amplia evidencia que la expresión conductual es un proceso independiente de la reconsolidación (Ben Mamou et al., 2006; Rodríguez-Ortíz et

al., 2012; Coccoz et al., 2013; Balderas et al., 2013; García-Delatorre et al., 2014; Santoyo-Zedillo et al., 2014; Delorenzi et al., 2014) Figura 27.



Figura 27. Modelo del proceso de evocación en el CAS. La exposición al estímulo condicionado induce un aumento en los niveles extracelulares de dopamina, noradrenalina y glutamato en la amígdala y la corteza insular. En la amígdala, los receptores AMPA participan en la expresión conductual de aversión, mientras que los receptores NMDA y D1 participan en la actualización de la memoria, los receptores beta adrenérgicos participan en ambos procesos durante la evocación. Para el caso de la CI, los receptores AMPA, beta-adrenérgicos y D1 participan en la expresión conductual y en la actualización de la memoria, mientras que los receptores NMDA sólo participan en la expresión conductual y en la actualización de la memoria, mientras que los receptores NMDA sólo participan en la actualización de la memoria. Las flechas indican un aumento en los niveles extracelulares. Proteína cinasa A (PKA), Calcio calmodulina cinasa II (CaMKII), Fosforilación (P).

En este trabajo, mediante la manipulación farmacológica de la amígdala y a través de microdiálisis en libre movimiento en la CI, pudimos observar los cambios asociados a la expresión conductual y al mantenimiento de la memoria durante la evocación del CAS. Los resultados obtenidos muestran que cuando la expresión de la memoria es atenuada a través de la inyección de un antagonista de los receptores AMPA en la amígdala, el incremento de glutamato en la CI permanece intacto, mientras que los niveles extracelulares de dopamina y norepinefrina se

vieron disminuidos al igual que la conducta de aversión. Además, el bloqueo intraamigdalino de los receptores NMDA no tuvo efecto sobre la expresión conductual del CAS ni los niveles de estas catecolaminas en la CI, pero sí disminuyó los niveles de glutamato.

Comprender los mecanismos de cómo la amígdala podría modular la liberación de norepinefrina y dopamina en la CI no es tarea fácil. Se sabe que las principales proyecciones eferentes de la amígdala son glutamatérgicas llegando al locus coeruleus (Delaville et al., 2011) y al área ventral tegmental (Phillipson, 1979). Se ha documentado que los receptores glutamatérgicos en el área ventral tegmental podrían modular la liberación de dopamina, pues el bloqueo de los receptores NMDA en el área ventral tegmental no impide la liberación de dopamina, pero de manera inversa, el bloqueo de los receptores AMPA en el área ventral tegmental impiden la liberación de dopamina. (Qi et al., 2014); un mecanismo similar podría ocurrir en el locus coeruleus, ya que la activación de los receptores AMPA en dicho núcleo favorece la liberación de norepinefrina (Singewald et al., 1999). Estos datos sugieren que la expresión conductual está dada por la modulación del locus coeruleus y el área ventral tegmental a través de la proyecciones aferentes provenientes de la amígdala, afectando los cambios en los niveles extracelulares de dopamina y norepinefrina en la CI.

Por otra parte, la interacción de la amígdala con la corteza insular a través de proyecciones glutamatérgicas puede inducir la reactivación de la memoria que favorece la actualización del trazo. Hasta ahora se sabe que la interacción

amígdala-CI tiene un papel fundamental en la formación y mantenimiento de la memoria a través de los receptores NMDA. Durante la adquisición del CAS, la estimulación tetánica en la amígdala induce potenciación a largo plazo en la CI, la cual depende de los receptores NMDA en la CI (Escobar et al., 1998). La inducción de potenciación a largo plazo en la vía amígdala-CI antes del entrenamiento del CAS promueve la retención de la memoria gustativa de aversión (Escobar y Bermúdez-Rattoni 2000). De manera similar, la invección de glutamato en la amígdala induce el fortalecimiento del trazo de memoria, el cual es blogueado por la invección de antagonistas de los receptores NMDA en la CI (Ferreira et al., 2005). De tal manera, el aumento de glutamato observado en la CI podría estar favoreciendo la activación del trazo de memoria gustativa de aversión y la subsecuente actualización de información, nuestros datos farmacológicos apoyan dicha idea, ya que el bloqueo de la actividad glutamatérgica (AMPA y NMDA) en la CI afectó notablemente la actualización de la información, impidiendo el fortalecimiento del CAS. Figura 28.



Figura 28. Modelo de interacción amígdala-corteza insular durante la evocación del CAS. La amígdala, modula la liberación de noradrenalina y dopamina a través de los receptores AMPA, dichas catecolaminas modulan la expresión conductual de aversión, mientras que los receptores NMDA modulan el aumento de los niveles extracelulares de glutamato en la corteza insular, el aumento de glutamato favorece la actualización de la memoria de aversión. Área ventral tegmetal (VTA), locus coeruleus (LC), glutamato (Glu), dopamina (Da), norepinefrina (Na), adenilato ciclasa (AC) proteína cinasa A (PKA), Calcio calmodulina cinasa II (CaMKII), Fosforilación (P) Vía de señalización de las cinasas activadas por mitógeno (MEK/ERK).

CONCLUSIONES

La exposición a un estímulo condicionado (sacarina aversiva) favorece el incremento en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la amígdala y en la corteza insular durante la evocación del condicionamiento aversivo al sabor.

La actividad de los receptores AMPA en la amígdala y en la corteza insular está involucrada en la expresión conductual de memorias gustativas de aversión y participa en la actualización de la memoria únicamente en la corteza insular.

La actividad de los receptores NMDA en la amígdala y en la corteza insular no está involucrada en la expresión conductual de memorias gustativas de aversión pero participa en la actualización del trazo de memoria.

La actividad de los receptores D1 en la amígdala no participa en la expresión conductual de memorias gustativas de aversión pero participa en la actualización del trazo de memoria. Mientras que en la corteza insular, los receptores D1 están involucrados tanto en la expresión conductual como en la actualización de memorias gustativas de aversión.

La actividad de los receptores β-adrenérgicos en la amígdala y en la corteza insular está involucrada tanto en la expresión conductual como en la actualización de memorias gustativas de aversión.

Los receptores glutamatérgicos de la amígdala modulan diferencialmente los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la corteza insular durante la evocación del condicionamiento aversivo al sabor. El bloqueo de los receptores AMPA en la amígdala impide la expresión conductual de la aversión e impide los cambios de norepinefrina y dopamina en la corteza insular; mientras que el aumento de glutamato observado en la corteza insular permanece intacto. Por otra parte, el bloqueo de los receptores NMDA en la amígdala impide el aumento de glutamato en la corteza insular, mientras que la expresión conductual de la aversión y los cambios de norepinefrina y dopamina en la corteza insular permanece insular permanece intacto.

REFERENCIAS

Acolla, R., Bathellier, B., Petersen, C.H. and Carleton, A. (2007). Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. The journal of Neuroscience. 27 (6): 1396 – 1404.

Aggleton, J.P., Petrides, M., and Iversen, S.D. (1981). Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversion learning by rats. Physiology and Behavior. 27: 397 – 400.

Alheid, G.F., Olmos, J.S., and Beltramino, C.A. (1995). Amygdala and extended amygdala. In Paxinos, G. The rat nervous system. 2nd ed. Academic Press. San Diego.

Amaral D.G., and Insausti R. (1992). Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. Exp Brain Res. 88(2):375-88.

Anderson, J.R. (2001). Aprendizaje y memoria. McGraw – Hill. México.

Balderas I., Rodriguez-Ortiz C.J., and Bermúdez-Rattoni F. (2013). Retrieval and reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the perirhinal cortex. Neuroscience 253:398-405. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.001

Bahar A. Dorfman N, and Dudai Y. (2004). Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. Eur J Neurosci. 19(4):1115-8.

Barot S.K., Kyono Y., Clark E.W., and Bernstein I.L. (2008). Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. Proc Natl Acad Sci 105:20959-20963.

Barros D.M., Mello e Souza T., De David T., Choi H., Aguzzoli A., Madche C., Ardenghi P., Medina J.H., and Izquierdo I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), betanoradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. Behav Brain Res 124:1-7.

Ben Mamou, C., Gamache, K., and Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. Nature neuroscience, 9(10), 1237–9. doi:10.1038/nn1778

Bennett, E.L., Diamond, M.C., Krech, D., and Rosenzweig, M.R. (1964). Chemical and anatomical plasticity of the brain. Science. 146: 610 – 619.

Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., and Diamond, M.C (1969). Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. Science. 163: 825 – 826.

Ben-Yakov A., Dudai Y., and Mayform M.R. (2015). Memory Retrieval in Mice and Men. Cold Spring Harb Perspect Biol. 7(12). pii: a021790. doi: 10.1101/cshperspect.a021790.

Berman D.E., Hazvi S., Neduva V., and Dudai Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. J Neurosci. 20(18):7017-23.

Berman D.E., and Dudai Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. Science 291:2417-2419.

Bermúdez-Rattoni, F. and McGaugh, J.L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. Brain Research 549(1):165-70.

Bermúdez-Rattoni, F., and Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies In Bures, J., Bermúdez – Rattoni, F., and Yamamoto, T. Conditioned taste aversion. Memory of a special kind. Oxford University Press. New York.

Bermúdez-Rattoni, F., Quirarte, G.L. y Prado - Alcalá, R.A. (2001). Pavlov y sus perros. En Bermúdez-Rattoni, F. y Prado-Alcalá, R. A. Memoria: dónde reside y cómo se forma. Trillas. México.

Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. Nat Rev Neurosci 5:209-217.

Bermúdez-Rattoni F (2014). The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. Neurobiol Learn Mem 109:207-16. doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.001.

Borsini, F., and Rolls, E.T. (1984). Role of noradrenaline and serotonin in the basolateral region of the amygdala in food preferences and learned taste aversions in the rat. Physiology and Behavior. 33: 37 - 43.

Brischoux F., Chakraborty S., Brierley D.I., and Ungless M.A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. Proc Natl Acad Sci 106:4894-4899.

Brinley-Reed M. and Mcdonald A.J. (1999). Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. Brain Research 850(1-2):127-35.

Brown R., and Silva A.J. (2004). Molecular and cellular cognition; the unraveling of memory retrieval. Cell

Brunet A., Orr S. P., Tremblay J., Robertson K., Nader K., Pitman R. K. (2008). Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. J. Psychiatr. Res. 42, 503–506

Bures, J. (1998). Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA. In Bures, J., Bermúdez – Rattoni, F., and Yamamoto, T. Conditioned taste aversion. Memory of a special kind. Oxford University Press. New York.

Cammarota, M., Barros, D.M., Vianna, M.R., Bevilaqua, L.R., Coitinho, A., Szapiro, G., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2004). The transition from memory retrieval to extinction. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 76 (3): 573 – 582.

Carlson, N.R. (2007). Physiology of behavior. 9th ed. Pearson – Allyn and Bacon. Boston.

Coccoz, V., Sandoval, A., Stehberg, J., and Delorenzi, A. (2013). The temporal dynamics of enhancing a human declarative memory during reconsolidation. Neuroscience, 246, 397–408. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.033

Cubero, I., Thiele, T.E., and Bernstein, I.L. (1999). Insular cortex lesions and taste aversion learning: effects of conditioning method and timing of lesion. Brain Research. 839(2): 323-330.

Damsma G., Pfaus J.G., Wenkstern D., Phillips A.G., and Fibiger H.C. (1992). Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. Behav Neurosci 106:181-191.

Dardou D., Datiche F., and Cattarelli M. (2010). Does the olfactory cue activate the same brain network during aging in the rat after taste potentiated odor aversion retrieval? Neurobiol Learn Mem 1:137-150

Day M., Langston R., and Morris R.G. (2003). Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. Nature 424:205-209.

Delaville C., Deurwaerdère P.D., and Benazzouz A. (2011). Noradrenaline and Parkinson's disease. Front Syst Neurosci 18;5:31. doi: 10.3389/fnsys.2011.00031.

Delorenzi, A., Maza, F., Suárez, L., Barreiro, K., Molina, V., and Stehberg, J. (2014). Memory beyond expression. Journal of Physiology-Paris. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.07.002

De Luca M.A., Bimpisidis Z., Bassareo V., Di Chiara G. (2011). Influence of morphine sensitization on the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to appetitive and aversive gustatory stimuli. Psychopharmacology (Berl)216(3):345-53. doi: 10.1007/s00213-011-2220-9.

de Carvalho Myskiw J., Furini C.R., Schmidt B., Ferreira F., and Izquierdo I. (2015). Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. Proc Natl Acad Sci 112:E230-233.

Dudai, Y. (1989). The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends. Oxford University Press. New York.

Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long – term memories: a question of persistence. Current Opinion in Neurobiology. 12: 211 – 216.

Dudai Y (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? Annu Rev Psychol 55:51-86.

Dudai Y., Karni A., and Born J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. Neuron 88(1):20-32. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.004.

Escobar, M.L., Chao, V., and Bermúdez-Rattoni, F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. Brain Research. 779: 314-319.

Escobar, M., and Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. Brain Research, 852(1), 208212. doi:10.1016/S0006-8993(99)02134-4

Fallon J.H., Koziell D.A., and Moore R.Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. J Comp Neurol. 180(3):509-32.

Ferreira, G., Miranda, M.I., De la Cruz, V., Rodríguez-Ortíz, C.J., and Bermúdez-Rattoni, F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion trough NMDA receptor activation in the insular cortex. European Journal of Neuroscience. 22: 2596 – 2604.

Fitzgerald, R.E., and Burton, M.J. (1983). Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. Physiology and Behavior. 30: 203 – 206.

Flavell C.R., Barber D.J., and Lee J.L. (2011). Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. Nat Commun 2:504. doi: 10.1038/ncomms1515.

Flavell C.R., Lambert EA, Winters BD, and Bredy TW. (2013). Mechanisms governing the reactivation-dependent destabilization of memories and their role in extinction. Front Behav Neurosci. 7:214. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00214.

Funk, D., and Stewart, J. (1996). Role of catecholamines in the frontal cortex in the modulation of basal and stress-induced autonomic output in rats. Brain Research, 741(1-2), 220–229 doi:

10.1016/S0006-8993(96)00931-6

Fuxe K., Jacobsen K.X., Höistad M., Tinner B., Jansson A., Staines W.A., and Agnati L.F. (2003). The dopamine D1 receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: relationship to the dopamine innervation. Neuroscience 119(3):733-46.

Gallo, M. Roldan, G., and Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. Behavioral Brain Research. 52: 91 – 97.

Garcia, J., Kimeldorf, D.J., and Koelling, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. Science. 122: 157 – 158.

García-DeLaTorre P., Rodriguez-Ortiz C.J., Arreguín-Martinez J.L., Cruz-Castañeda P., and Bermúdez-Rattoni F. (2009). Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. Learning and memory. 25;16(9):514-9. doi: 10.1101/lm.1356509

García-Delatorre P., Pérez-Sánchez C., Guzmán-Ramos K., and Bermúdez-Rattoni F. (2014). Role of glutamate receptors of central and basolateral amygdala nuclei on retrieval and reconsolidation of taste aversive memory. Neurobiol Learn Mem 111:35-40.

Guzmán-Ramos K., and Bermúdez-Rattoni F. (2011). Post-learning molecular reactivation underlies taste memory consolidation. Front Syst Neurosci 5:79.

Guzmán-Ramos K., Osorio-Gómez D., Moreno-Castilla P., and Bermúdez-Rattoni F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. J Neurochem 114:226-236.

Guzmán-Ramos K., Osorio-Gómez D., Moreno-Castilla P., and Bermúdez-Rattoni F. (2012). Postacquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. Learn Mem 19:231-238.

Grossman, S., Fontanini, A., Wieskopf, J., and Katz, D. (2008). Learning-Related Plasticity of Temporal Coding in Simultaneously Recorded Amygdala–Cortical Ensembles. The Journal of Neuroscience, 28(11), 2864–2873. doi:10.1523/JNEUROSCI.4063-07.2008

Forcato C., Burgos V. L., Argibay P. F., Molina V. A., Pedreira M. E., Maldonado H. (2007). Reconsolidation of declarative memory in humans. Learn Mem. 14, 295–30310.1101/lm.486107

Forcato C., Rodrìguez M. L., Pedreira M. E., Maldonado H. (2010). Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. Neurobiol. Learn. Mem. 93, 77–84

Hardwicke T.E., Taqi, M., and Shanks, D.R. (2016) Postretrieval new learning does not reliably induce human memory updating via reconsolidation Proc Natl Acad Sci 113(19) 5206-5211.

Hernandez L, Hoebel BG (1988). Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. Physiol Behav 44:599-606.

Hebb, D.O. (1949). The organization of behavior: A neuropsychological theory. J. Wiley. New York.

Hupbach A., Gomez R., Hardt O., Nadel L. (2007). Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. Learn. Mem. 14, 47–53

Hupbach A., Gomez R., Nadel L. (2009). Episodic memory reconsolidation: updating or source confusion? Memory 17, 502–51010.1080/09658210902882399

Izquierdo I., Quillfeldt J.A., Zanatta M.S., Quevedo J., Schaeffer E., Schmitz P.K., and Medina J.H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. Eur J Neurosci 9:786-793.

Jasmin L., Burkey A.R., Granato A., and Ohara P.T. (2004). Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat.J Comp Neurol. 468(3):425-40.

Kandel, E.R., Kupfermann, I., and Iversen, S. (2000). Learning and memory. In Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. Principles of neural science. 4th ed. McGraw Hill. New York.

Kesner, R.P., Berman, R.F., and Tardif, R. (1992). Place and taste aversion learning: Role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala. Brain Research Bulletin. 29: 345 – 353.

Kindt M., Soeter M., Vervliet B. (2009). Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. Nat. Neurosci. 12, 256–258

Kobilo T., Hazvi S., and Dudai Y. (2007). Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. Eur J. Neurosci 25(11):3417-21.

Koh M.T., and Bernstein I.L. (2003). Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? Neuroreport. 14(3):405-7.

Kolb, B., Nonneman, A.J., and Abplanalp. (1977). Studies on the neural mechanisms of bait- shyness in rats. In Fitzgerald, R.E., and Burton, M.J. Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. Physiology and Behavior. 30: 203 – 206.

Kosar E., Grill, H.J., and Norgren R. (1986). Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. Brain Research. 379/2): 329-341

Lamprecht R., and LeDoux J. (2004). Structural plasticity and memory. Nat Rev Neurosci 5(1):45-54.

Lecca D., Cacciapaglia F., Valentini V., Acquas E., and Di Chiara G. (2007). Differential neurochemical and behavioral adaptation to cocaine after response contingent and noncontingent exposure in the rat. Psychopharmacology (Berl) 191:653-667.

Lee J.L. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. Trends Neurosci.2(8):413-20. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.002.

Li C.S., Cho Y.K., and Smith D.V. (2005). Modulation of parabrachial taste neurons by electrical and chemical stimulation of the lateral hypothalamus and amygdala. J Neurophysiol. 93(3):1183-96.

Maren, S. (2005). Building and burying fear memories in the brain. Neuroscientist 11(1):88-99.

Mackintosh, N.J. (1994). Animal learning and cognition. 2nd ed. Academic Press. San Diego.

Mazur, J.E. (2006). Learning and behavior. 6^{th.} ed., Pearson - Prentice Hall. New Jersey.

McCutcheon J.E., Ebner S.R., Loriaux A.L., and Roitman M.F. (2012). Encoding of aversion by dopamine and the nucleus accumbens. Front Neurosci 6:137.

McGaugh J.L. (2000). Memory--a century of consolidation. Science 287:248-251.

McGaugh, J.L., and Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. Current Opinion in Neurobiology. 12: 205 – 210.

McGaugh J.L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. Annu Rev Neurosci 27:1-28.

McGaugh J.L. (2013). Making lasting memories: remembering the significant. Proc Natl Acad Sci 110 Suppl 2:10402-10407.

McIntyre C.K., Hatfield T., and McGaugh J.L. (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. Eur J Neurosci 16:1223-1226.

Micheau, J., and Riedel, G. (1999). Protein kinases: which one is the memory molecule? Cellular and Molecular Life Sciences. 55: 534 – 548.

Miranda, M.I., Ramírez-Lugo, L., and Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. Brain Research, 882(1-2), 230235. doi:10.1016/S0926-6410(00)00050-1

Miranda M.I., Ferreira G., Ramírez-Lugo L., and Bermúdez-Rattoni F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. Proc Natl Acad Sci 99:11417-11422.

Miranda, M.I., LaLumiere, R.T., Buen, T.V., Bermúdez – Rattoni, F., and McGaugh, J.L. (2003). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. European Journal of Neuroscience. 18: 2605 – 2610.

Miranda M.A., Ferry B., Ferreira G. (2007). Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. Neurobiol Learn Mem 88:260-263.

Morici J.F., Bekinschtein P., and Weisstaub N.V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. Behav Brain Res.1;292:241-51. doi: 10.1016/j.bbr.2015.06.030

Morilak D.A., Barrera G., Echevarria D.J., Garcia A.S., Hernandez A., Ma S., and Petre C.O. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29:1214-1224.

Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. Cell 117:131-143.

Nachman M., and Ashe J.H. (1974). Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. J Comp Physiol Psychol 87:622-643.

Nader K., and Einarsson E.O. (2010). Memory reconsolidation: an update. Ann N Y Acad Sci 1191:27-41.

Nader K., Schafe G.E., and Le Doux J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature 406:722-726.

Nerad L., Ramírez-Amaya V., Ormsby C.E., Bermúdez-Rattoni F. (1996). Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. Neurobiol Learn Mem. 66(1):44-50.

Ohara P.T., Granato A., Moallem T.M., Wang B.R., Tillet Y., and Jasmin L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. J Neurocytol. 32(2):131-

41.

Otis J.M., Fitzgerald M.K., and Mueller D. (2014). Inhibition of hippocampal beta-adrenergic receptors impairs retrieval but not reconsolidation of cocaine-associated memory and prevents subsequent reinstatement. Neuropsychopharmacology 39:303-310.

Pape H.C., and Paré D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. Physiol Rev 2:419-463

Pavlov I.P. (1927). Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex: Oxford University Press: Humphrey Milford.

Paxinos G., and Watson C. (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Academic Press.

Pedreira M.E., and Maldonado H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. Neuron 38:863-869.

Phillpson O.T. (1979). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. J Comp Neurol 1;187(1):117-43.

Pitkänen, A., Jolkkonen, E., and Kemppainen, S. (2000). Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. Folia Morphology 59 (1): 1 - 23.

Qi X.L., Zhu B., Zhang X.H., and Li B.M. (2008). Are beta-adrenergic receptors in the hippocampal CA1 region required for retrieval of contextual fear memory? Biochem Biophys Res Commun 368:186-191.

Qi J., Zhang S., Wang H.L., Wang H., de Jesus Aceves Buendia J., Hoffman A.F., Lupica C.R., Seal R.P., and Morales, M. (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. Nature Communications, 5, 5390. http://doi.org/10.1038/ncomms6390

Quirarte G.L., Roozendaal B., and McGaugh J.L. (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. Proc Natl Acad Sci 94(25):14048-53.

Reilly, S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. Brain Research bulletin. 48(3): 239 – 254.

Rodríguez-Ortíz C.J., Balderas I., García-Delatorre P., and Bermúdez-Rattoni F. (2012) Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. Neurobiol Learn Mem 98:215-219.

Rodríguez-Ortíz C.J., and Bermúdez-Rattoni F. (2007). Frontiers in Neuroscience Memory Reconsolidation or Updating Consolidation? In: Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging (Bermudez-Rattoni, F., ed) Boca Raton (FL): CRC Press Taylor & Francis Group, LLC.

Rodríguez-Ortíz C.J., De la Cruz V., Gutiérrez R., and Bermúdez-Rattoni F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. Learn Mem 12:533-537

Rodríguez-Ortíz C.J., García-Delatorre P., Benavidez E., Ballesteros M.A., and Bermúdez-Rattoni F. (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. Neurobiol Learn Mem 89:352-359.

Rollins, B.L., Stines, S.G. McGuire, H.B., and King, B.M. (2001). Effects of amygdala lesions on body weight, conditions taste aversion, and neophobia. Physiology and Behavior. 72(5): 735 – 742.

Rosenzweig, M.R., and Bennett, E.L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behavioral Brain Research. 78: 57 – 65.

Sah P., Faber E.S., López De Armentia M., and Power J. (2003). The amygdaloid comples: anatomy and physiology. Physiol Rev. 3:803-834.

Santini E, Ge H, Ren K, Pena de Ortiz S, Quirk GJ (2004). Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. J Neurosci 24:5704-5710.

Santoyo-Zedillo, M., Rodriguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermudez-Rattoni, F., and Balderas, I. (2014). Retrieval is not necessary to trigger reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. Learning & Memory. 21: 452-456. doi:10.1101/lm.035428.114

Saper C.B. (1982). J Comp Neurol. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat.210(2):163-73.

Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. Learning and Memory. 7: 73 – 84

Schafe, G.E., and Bernstein, I.L. (1996). Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. Brain Research. 741: 109 -116.

Schiller D., Monfils M. H., Raio C. M., Johnson D. C., Ledoux J. E., Phelps E. A. (2010). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. Nature 463, 49–5310.1038/nature08637

Simonyi, A., Serfozo, P., Parker, K.E., Ramsey, A.K., and Schachtman, T.R. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 in conditioned taste aversion learning. Neurobiology of Learning and Memory. 92 (3): 460 - 463.

Singewald N., Kaehler S.T., Philippu A. (1999). Noradrenaline release in the locus coeruleus of conscious rats is triggered by drugs, stress and blood pressure changes. Neuroreport 10(7):1583-7.

Squire, L.R., and Zola, S.T. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proceedings of the National Academy of Science. 93: 13515 – 13522.

Stehberg, J., Levy D., and Zangen A. (2009). Impairment of aversive memory reconsolidation by localized intracranial electrical stimulation. Eur J Neurosci (5):964-9. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06634.x.

Strange B. A., Kroes M. C. W., Fan J. E., Dolan R. J. (2010). Emotion causes targeted forgetting of established memories. Front. Behav. Neurosci. 4: 175.10.3389/fnbeh.2010.00175

Tingley W. G., Ehlers M. D., Kameyama K., Doherty C., Ptak J. B., Riley C. T. and Huganir R. L. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D- aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. J. Biol. Chem. 272, 5157–5166.

Tucci S., Rada P., and Hernandez L. (1998). Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. Brain Res 813:44-49.

Tulving, E. (2000). Introduction. In Gazzaniga, M.S. The new cognitive neurosciences. 2nd ed. MIT Press, Massachusetts.

Walker M.P., Brakefield T., Hobson J.A., Stickgold R. (2003) Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. Nature 425(6958):616–620.

Welzl, H., D'Adamo, P., and Lipp, H.P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. Behavioral Brain Research. 125: 205 – 213.

Wu Y., Li Y., Yang X., and Sui N. (2014). Differential effect of beta-adrenergic receptor antagonism in basolateral amygdala on reconsolidation of aversive and appetitive memories associated with morphine in rats. Addict Biol 1:5-15.

Yamamoto T., and Fujimoto Y. (1991). Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. Brain Res Bull 27:403-406.

Yamamoto, T., Tsuyoshi, S., Noritaka, S., Yasunobu, Y., and Nobuyaki, S. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. Behavioral Brain Research. 65: 123 – 137.

Yamamoto T., Fujimoto Y., Shimura T., and Sakai N. (1995). Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. Neurosci Res. 22(1):31-49.

Yamamoto, T., Noritaka, S., Sakai, N., and Iwafune, A. (1997). Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. Neuroscience letters. 226: 127 – 130.

Yasoshima Y., Morimoto T., and Yamamoto T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. Brain Res 869:15-24.

Yasoshima Y., Yamamoto T., and Kobayashi K. (2005). Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion. Chem Senses 30 Suppl 1:i158-159.

<u>ANEXOS</u>

Artículo publicado en Behavioural Brain Research.

Artículo enviado a Learning & Memory.

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Short communication

Differential involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala during taste aversion retrieval on memory expression and updating



Osorio-Gómez Daniel^a, Guzmán-Ramos Kioko^{a,b}, Bermúdez-Rattoni Federico^{a,*}

^a División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

^b Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma, Av. Hidalgo poniente 46 Col, La estación, 52006 Lerma de Villada, Mexico

HIGHLIGHTS

- Exposure to an aversive-conditioned stimulus during retrieval, enhances glutamate, norepinephrine and dopamine signaling within the amygdala.
- The AMPA receptors in the amygdala are involved in the behavioural expression of CTA but not in memory updating.
- Dopaminergic D1 and NMDA receptors are not involved in behavioural expression but are neccesary for CTA memory updating.
- β-adrenergic receptors subserve behavioural expression and CTA memory updating.

ARTICLE INFO

Article history: Received 20 February 2016 Received in revised form 20 March 2016 Accepted 22 March 2016 Available online 23 March 2016

Keywords: Retrieval Glutamate Dopamine Norepinephrine Memory updating Microdialysis

ABSTRACT

During memory retrieval, consolidated memories are expressed and destabilized in order to maintain or update information through a memory reconsolidation process. Despite the key role of the amygdala during memory acquistion and consolidation, the participation of neurotransmitter signals in memory retrieval is poorly understood. Hence, we used conditioned taste aversion and *in vivo* microdialysis to evaluate changes in glutamate, norepinephrine and dopamine concentrations within the amygdala during memory retrieval. We observed that exposure to an aversive-conditioned stimulus induced an augmentation in glutamate, norepinephrine and dopamine levels within the amygdala, while exposure to a familiar and safe stimulus did not induce changes in these neurotransmitters levels. Also, we evaluated the amygdalar blockade of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), β -adrenergic and dopamine D1 receptors in memory retrieval and updating. Results showed that during retrieval, behavioural expression was impaired by intra-amygdalar blockade of AMPA and β -adrenergic receptors, whereas NMDA, D1 and β -adrenergic receptors blockade hindered memory updating. In summary, during conditioned taste aversion retrieval there was an increase in the extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine within the amygdala, and their receptors activity were differentially involved in the behavioural expression and memory updating during retrieval.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

In conditioned taste aversion (CTA), animals associate a novel taste with gastric malaise; this association produces taste aversion measured as a decrease in the consumption of the taste in further presentations [3]. The amygdala is highly involved in the

acquisition, consolidation and retrieval of CTA (see Ref. [18]. We have demonstrated that during the acquisition of CTA, exposure to a novel taste stimulus induces an increase in the extracellular levels of norepinephrine (Guzmán-Ramos et al. [9], whereas induction of gastric malaise promotes an augmentation of extracellular levels of glutamate and norepinephrine within the amygdala [22,13,9]. Although, there is scarce information about amygdala neurotrasmitters relase during CTA retrieval, it has been shown that exposure to aversive-conditioned saccharin induces an augmentation of glutamate within the amygdala [22]. However, it remains



^{*} Corresponding author at: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, División de Neurociencias, Laboratory BL-201, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico.

E-mail addresses: fbermude@ifc.unam.mx, bermudez@unam.mx (B.-R. Federico).

unknown whether catecholamines could follow similar extracellular augmentations as glutamate during memory retrieval.

Memory is consolidated over time through a protein synthesisdependent process. Furthermore, during memory retrieval, consolidated memories become labile and require similar proteinsynthesis processes to maintain or update memories, a process named memory reconsolidation [16,5]. However, it has been shown that inhibition of protein synthesis in the amygdala has no effect on CTA memory reconsolidation when a single acquisition trial is used [1]. Thus, we have proposed that multi-trials protocol induces strong CTA memory and its extinction is delayed on subsequent presentations, facilitating the observation of memory reconsolidation process and updating [20,5]. Using this model, we have demostrated that AMPA receptor antagonists impair behavioural expression during retrieval without affecting memory reconsolidation [20,6]. Whereas infusions of protein synthesis inhibitors or an NMDA receptor antagonist in the amygdala disrupt CTA memory reconsolidation without affecting behavioural expression on retrieval [20,6]. In regard of catecholaminergic activity within the amygdala, there is scarce information about memory retrieval. Nevertheless it has been demonstrated that norepinephrine antagonists impaired reconsolidation of aversive memories induced by morphine [23], and dopaminergic activity seems to be required for taste-rewarded memory reconsolidation [12].

In this study, we used *in vivo* microdialysis in order to evaluate changes in glutamate, norepinephrine and dopamine levels within the amygdala during memory retrieval. Moreover, to analyse the functional role of NMDA, AMPA, β -adrenergic and D1 receptors in CTA memory retrieval and updating, we used selective antagonists in the amygdala before a second CTA acquistion trial.

Adult male Wistar rats from the Instituto de Fisiología Celular were anesthetized with a ketamine-xylazine mixture (100-10 mg/kg) and a unilateral guide cannula (CMA Microdialysis. Stockholm, SE) aiming at the amygdala was implanted using standard stereotaxic procedures, right an left hemispheres were counterbalanced. The guide cannula was implanted with coordinates from Bregma (AP-2.8 mm; L 4.8 mm; DV-7.5 mm) [17], and was fixed to the skull using two screws and dental acrylic cement. All procedures were approved by the institutional committee for the care and use of laboratory animals of the Instituto de Fisiología Celular (FBR25-14) which is based on National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Behavioural scheme began 6 days after surgery allowing the animals to recover. Rats were then water-deprived 24 h prior behavioural scheme. Animals were habituated in a microdialysis chamber once a day for 1 h and were allowed to drink 30 mL of tap water from a graded bottle during 15 min, water baseline consumption intake was established over 6 days. A second drinking session in the afternoon served to prevent dehydration. On the seventh day, rats were separated in two groups, an aversively conditioned group (Aversive, n = 10), which was exposed for 15 min to 30 mL of a 0.1% (wt/vol) sodium saccharin solution (Sigma-Aldrich, Missouri, US) and fifteen minutes later rats received an i.p. LiCl (Baker. New Jersey, US) injection (0.2 M, 7.5 mL/kg, this concentration induces a robust CTA, see Ref. [19]. In the control group (Non-Aversive, n=8), rats drank the same saccharin solution, paired with an i.p. NaCl (Sigma-Aldrich. Missouri, US) injection (0.2 M, 7.5 mL/kg). NaCl does not cause gastric malaise and therefore no taste aversion would be developed. Three days after training, microdialysis procedure was performed in both groups by the insertion of 1 mm length membrane dialysis probe (CMA 12 MD Probe, CMA Microdialysis. Stockholm, SE) connected to the micro-infusion pump system. (CMA Microdialysis. Stockholm, SE). The pump perfused the probe continuously at a rate of 0.8 µL/min with Ringer solution (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, NaH₂PO₄H₂O 1.2 mM, MgSO₄7H₂O 1.2 mM, NaHCO₃ 19 mM, CaCl₂ 2.5 mM, glucose 3.3 mM). After probe insertion, the first hour of sampling was discarded due to fluid stabilization; samples were collected every 5 min (4 μ L/sample) in vials containing 1 μ L of antioxidant mixture (0.25 mM ascorbic acid, Na₂EDTA 0.27 mM, 0.1 M acetic acid). The first three samples were used to calculate the basal concentration of extracellular neurotransmitters; afterwards, a graded bottle with 0.1% (wt/vol) sodium saccharin solution was placed in the microdialysis chamber for 15 min and consumption intake was measured.

Neurotransmitter concentrations were determined by capillary electrophoresis as described in Ref. [8]. Capillary electrophoresisbased separations with laser induced fluorescence detection were used for the analysis (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System). In order to identify glutamate, norepinephrine and dopamine, we matched the obtained electropherograms with a spiked sample. Samples were corrected by relating the area under the curve of the unknown sample with the area under the curve of the internal standard. Analyses were performed with the Karat System Gold software (Beckman Coulter. California, US). Results are expressed as percentage of baseline concentration (% Baseline concentration = analyte concentration \times 100/mean of the three first samples).

A repeated measures ANOVA indicated a significant interaction between time and group ($F_{(7,98)} = 2.171 \text{ p} < 0.05$) in the extracellular levels of glutamate. The Non-aversive group remained without changes among time in glutamate levels within the amygdala (p = NS), whereas the Aversive group showed significant differences when the conditioned stimulus was present at the 25 min fraction (p < 0.01). Exposure to the aversive-conditioned gustatory stimulus induced a significant augmentation of glutamate within the amygdala at the 25 min fraction between Aversive and Non-Aversive group (p < 0.05).

During CTA retrieval, a repeated measures ANOVA showed a significant interaction between time and group ($F_{(7,63)} = 2.121 \text{ p} < 0.05$) in the concentration of norepinephrine (Fig. 1B) within the amygdala. *Post hoc* tests indicated that in the Aversive group, there were differences in norepinephrine levels compared to baseline extracellular levels (p < 0.05) and also there were differences between groups (p < 0.05) at minutes 20 and 25 when the conditioned stimulus is present.

We also observed a significant main effect of the group on the extracellular levels of dopamine (Fig. 1C) within the amygdala during CTA retrieval ($F_{(1118)} = 4.172 \text{ p} < 0.05$). Furthermore, we did not observe changes in extracellular levels of dopamine between time ($F_{(7118)} = 0.838 \text{ p} = \text{NS}$), neither a time-group interaction ($F_{(7118)} = 1.222 \text{ p} = \text{NS}$). The *post hoc* test revealed that the Aversive group showed changes in dopamine levels compared to baseline concentration (p<0.01) and also compared to Non-Aversive groups at minute 25. Student's non-paired statistical analysis showed that the Aversive group produced a significant and clear taste aversion, while the Non-Aversive group failed to elicit reliable CTA (t = 4.343, p<0.01; Fig. 1D).

According to these results, when animals are exposed to saccharin previously paired with gastric malaise, there is a reduction in saccharin consumption and there is an augmentation in the extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine in the amygdala compared to Non-Aversive group animals.

In order to evaluate the functional role of NMDA, AMPA, β -adrenergic or D1 receptors in the behavioural expression and memory updating during CTA memory retrieval, rats were implanted bilaterally with 12 mm long stainless-steel guide cannulae (23 gauges) directed to the amygdala (AP–2.8 mm, L±4.8 mm, DV–6.5 mm relative to Bregma). Animals were deprived of water for 24 h and baseline water consumption intake was established over 6 days. Animals were handled for 3 min a day until the infusion day to diminish handling-associated stress. During CTA acquisition, rats were exposed to a 0.1% (wt/vol) saccharin solu-



Fig. 1. Behavioural CTA response and extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine within the amygdala during CTA retrieval. (A) Changes in glutamate levels in Aversive and Non-aversive groups during memory retrieval. (B) Norepinephrine extracellular levels in Non-aversive and Aversive groups during CTA retrieval. (C) Dopamine monitoring during CTA memory retrieval (D) Consumption intake during CTA memory retrieval in the Aversive and Non-aversive groups. Values in graphs (A–C) are expressed as mean of % baseline concentration \pm SEM and (D) as % of mean baseline consumption intake \pm SEM. #p < 0.05 and ##p < 0.01 versus Non-Aversive; *p < 0.05; **p < 0.01 versus baseline concentration.

tion for 15 min, and 15 min later they received a 0.2 M LiCl i.p. injection (7.5 mL/kg). Seventy-two hours after training, rats were divided in 5 groups counterbalanced according to their average saccharin consumption intake during CTA acquisition. All drugs were dissolved in saline solution (0.9% wt/vol). A volume of 1 μ L (0.5 μ L/min) was injected per hemisphere in the amygdala; the injector was left for another minute to allow diffusion into the tissue. All microinjections were given 20 min before a second CTA acquisition trial. Memory was tested 24 h after the second CTA

acquisition, in the test probe the animals were allowed to drink 30 mL of 0.1% (wt/vol) saccharin solution and the consumption intake was measured. Experimental groups according to drugs infusions were separated as follows: saline solution (SS, n = 10); pL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV 10 μ g/ μ L, n = 9); 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt hydrate (CNQX 1 μ g/ μ L, n = 9); Propranolol (PROP 5 μ g/ μ L, n = 9); and SCH-23390 (SCH 2 μ g/ μ L, n = 11). Saccharin consumption intake during first CTA acquisition; second CTA acquisition and memory test are reported as percentage of mean consumption intake during the first CTA acquisition (% CTA 1 = saccharin solution intake × 100/mean saccharin intake during first CTA acquisition).

A repeated measures ANOVA was conducted to compare saccharin consumption intake. There was a significant interaction between days and treatment ($F_{(8129)}$ =3.079 p<0.01). Saccharin consumption intake during the first CTA acquisition trial was similar in all groups (p=NS). Pharmacological treatments given 20 min before CTA2 acquisition trial, showed that blockade of AMPA (Fig. 2B; p<0.01), and β-adrenergic (Fig. 2D; p<0.01) receptors in the amygdala, hindered behavioural expression during retrieval compared to SS group. Conversely, infusions of APV (Fig. 2A) or SCH (Fig. 2C) within the amygdala did not affect behavioural expression in CTA2 (p=NS). During memory test, the CNQX group showed a reliable CTA similar to the SS group (p=NS). Contrarily, blockade of NMDA (p<0.05, Fig. 2A), β-adrenergic (p<0.05, Fig. 2D) or dopamine D1 receptors (p<0.05, Fig. 2C) impaired memory updating.

After experiments, all animals were sacrificed and brains were removed. Coronal sections $(40 \,\mu\text{m})$ were obtained and stained with cresyl violet. We observed the placement of the microdialysis probes for the Aversive group and the Non-Aversive group in the amygdala region (Fig. 3A). Location sites for the injector tips were verified (Fig. 3B); despite the fact that in some cases the injection tip is located only in the central or basolateral amygdala, the volume of drug infused (1 μ L) is sufficient to reach both nuclei.

These data support the idea that AMPA receptors in the amygdala play a key role on behavioural expression but are independent of memory updating [20,6]. Also, NMDA and dopamine D1 receptors are not necessary for behavioural expression but are involved in memory updating. Meanwhile, β -adrenergic receptors play a key role in the behavioural expression and CTA memory updating during retrieval.

According to the reconsolidation theory, memory retrieval has been considered an important process where stored information is susceptible to be strengthened in a multi trial protocol by information updating [5]. The exposure to a novel taste stimulus does not modify glutamate concentrations within the amygdala [13,7,9], even when the animals are exposed to a naturally aversive taste stimulus (quinine 0.005% w/v) [7]. In this work, exposure to an aversive-learned stimulus, elicits an augmentation in the extracellular levels of glutamate in the amygdala, similar to a previous report [22]. Thus, glutamate might be associated to the aversive learned value of the stimulus not observed during acquisition where the stimulus is only perceived as novel.

The behavioural expression of aversive tasks during retrieval has been associated with AMPA receptors activity in the amygdala [24,6], whereas NMDA receptors seem to be involved in memory consolidation and reconsolidation [8,6]. Accordingly, we observe that blockade of AMPA receptors within amygdala reduces the aversion displayed in retrieval while memory updating remains intact. On the other hand, an antagonist of NMDA receptors has no effect on behavioural expression but interrupts memory updating. In accordance, the AMPA antagonist disrupt behavioural expression without affecting updating, as previously reported García-Delatorre et al. [6]. However, we did not observe NMDA effects in memory reconsolidation as described by García-Delatorre



Fig. 2. Effects of NMDA, AMPA, D1 and β -adrenergic receptors antagonists in the amygdala on retrieval and memory updating. (A) NMDA receptor activity is not necessary for behavioural expression of aversive gustatory memory in CTA2 (APV) but its functional integrity is necessary for memory updating. (B) Blockade of AMPA receptors (CNQX) in the amygdala impairs aversive taste behavioural expression, whereas memory updating remains intact. (C) Dopamine D1 receptors (SCH) are not involved in CTA behavioural expression in spite of memory updating. (D) β -adrenergic receptors (PROP) within the amygdala are responsible for CTA behavioural expression and updating during retrieval. (E) Schematic representation of infusions and two-trials CTA protocol. Values in graphs are expressed as% of CTA 1 ± SEM. *p < 0.05; **p < 0.01 versus saline solution group (SS).

and coworkers but in the consolidation of the second CTA acquistion (updating) instead. These differences could be explained due to the fact that the microinjections were done between central and basolateral nuclei of the amygdala, affecting both nuclei. Blockade of NMDA receptors in the central [6] and basolateral [21] amygdala had a strong effect in the updating of a second trial acquisition. As reported, when NMDA antagonists were infused in the basolateral amygdala a disruption of reconsolidation was observed, while the same manipulation in the central amygdala only hindered memory updating [6]

Exposure to a novel taste stimulus induces an augmentation of norepinephrine within the amygdala [9]. Here during CTA retrieval, there is an increase of norepinephrine within the amygdala only when animals are exposed to an aversive-conditioned stimulus. It is known that aversive stimuli elicit norepinephrine release in the amygdala [11,14]. In CTA retrieval, exposure to the aversivestimulus is a stressful event because taste has been previously associated with a threat to the organism's health, a fact that is consistent with our observation of increased norepinephrine concentration within the amygdala.

Involvement of β -adrenergic receptors in memory retrieval and reconsolidation has remained poorly understood. Already it has been demonstrated that infusions of β -adrenergic receptors antagonists hindered expression of fear memories in, amygdala, entorhinal, parietal and anterior cingulate cortices [2]. Here, our data show that infusions of propranolol in the amygdala before a second CTA acquisition impairs behavioural expression of CTA during retrieval and hinders memory updating. Similarly, involvement of β -adrenergic receptors of the basolateral amygdala has been demonstrated during reconsolidation of aversive memories induced by morphine [23]. It is clear from the results presented herein that norepinephrine is involved in the behavioural expression and updating of taste aversive memories. In this regard, new and aversively gustatory stimuli are signaled by norepinephrine within the amygdala [9] and it would be possible that blockade of β -adrenergic activity impedes taste recognition affecting retrieval and a subsequent memory strengthening.

During retrieval of an aversive stimulus, we observe that there is an increase in dopamine extracellular levels within the amygdala. Interestingly, when the stimulus is familiar and non-aversive, we do not observe changes in dopamine levels. In this regard, previous exposure to a flavor decreases dopamine changes in the nucleus accumbens when the flavor is re-exposed [4], suggesting that salience has diminished. Our data suggest that presentation of an aversive stimulus is very salient information as a result of life-threatening situations increasing dopamine levels within the amygdala.

In this study, intra-amygdalar infusions of a dopamine D1 receptor antagonist do not impair behavioural expression during memory retrieval. However, it has been reported that D1 [10] and D2 [15] receptors are involved in the retrieval of fear memories. These differences could be explained by different drug concentrations and the behavioural task used. Although behavioural expression of CTA remains intact, D1 receptors are necessary for memory updating. There is plenty evidence indicating that D1 receptors potentiate the memory stablishment processes in con-



B) Needle



Fig. 3. A schematic depiction of microdialysis cannula locations implanted in the amygdala and representative photomicrographs of the amygdala with cannulae traces. (A) Representation of injector tips in the region of basolateral and central amygdala (B).

junction with NMDA receptors (see, Ref. [8]. In this work we observed that NMDA and D1 were involved only in CTA memory updating, suggesting a possible NMDA-D1 synergism during memory updating.

Memory retrieval is an important and dynamic process where behavioural expression takes place, increasing the probabiliy of survival by modifying the behaviour according to the situation. Moreover, during retrieval, memory updating could happen, changing or strengthening the information previously stored, facilitating coping in future events. In this study, we evaluated changes in neurotransmitter levels within the amygdala during CTA retrieval. The presentation of an aversively conditioned stimulus induces an augmentation in glutamate, norepinephrine and dopamine extracellular levels. These changes in neurotransmitter levels subserve different mnemonic processes during retrieval though their specific receptors. Thus, AMPA receptor activity modulates behavioural expression, whereas NMDA and dopamine D1 receptor activity seem to be involved in memory updating. Interestingly β adrenergic receptors integrity is necessary for both, the behavioural expression and CTA memory updating during retrieval. All this data suggest the idea that during memory retrieval, there are independent signals involved for the behavioural expression, whereas others have a key role in memory updating.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Authors and contributors

Designed the study: DO, KG and FB. Performed the experiments: DO and KG. Analyzed the data: DO and FB. Wrote the paper: DO, KG and FB. All of the authors discussed the data and manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT (250870) and DGAPA PAPIIT-UNAM (IN208616) grants. This study was performed as a partial requirement for obtainment of the PhD degree by DO enrolled in the Biochemistry Graduate Program at UNAM with a fellowship provided by CONACyT. We thank Dr. Israela Balderas, Perla Moreno Castilla and Francisco Pérez for technical assistance and Dr. Jean-Pascal Morin for carefully revising the manuscript.

References

- A. Bahar, N. Dorfman, Y. Dudai, Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation, Eur. J. Neurosci. 19 (4) (2004) 1115–1118.
- [2] D.M. Barros, T. Mello e Souza, T. De David, H. Choi, A. Aguzzoli, C. Madche, P. Ardenghi, J.H. Medina, I. Izquierdo, Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat, Behav. Brain Res. 124 (2001) 1–7.
- [3] F. Bermúdez-Rattoni, Molecular mechanisms of taste-recognition memory, Nat. Rev. Neurosci. 5 (2004) 209–217.
- [4] M.A. De Luca, Z. Bimpisidis, V. Bassareo, G. Di Chiara, Influence of morphine sensitization on the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to appetitive and aversive gustatory stimuli, Psychopharmacology (Berl.) 216 (2011) 345–353.
- [5] P. García-Delatorre, C.J. Rodríguez-Ortíz, J.L. Arreguín-Martínez, P. Cruz-Castañeda, F. Bernúdez-Rattoni, Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated, Learn. Mem. 16 (9) (2009) 514–519, http://dx. doi.org/10.1101/lm.1356509.
- [6] P. García-Delatorre, C. Pérez-Sánchez, K. Guzmán-Ramos, F. Bermúdez-Rattoni, Role of glutamate receptors of central and basolateral amygdala nuclei on retrieval and reconsolidation of taste aversive memory, Neurobiol. Learn. Mem. 111 (2014) 35–40.
- [7] K. Guzmán-Ramos, F. Bermúdez-Rattoni, Post-learning molecular reactivation underlies taste memory consolidation, Front. Syst. Neurosci. 5 (2011) 79.
- [8] K. Guzmán-Ramos, D. Osorio-Gómez, P. Moreno-Castilla, F. Bermúdez-Rattoni, Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation, J. Neurochem. 114 (2010) 226–236.
- [9] K. Guzmán-Ramos, D. Osorio-Gómez, P. Moreno-Castilla, F. Bermúdez-Rattoni, Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation, Learn. Mem. 19 (2012) 231–238.
- [10] E.W. Lamont, L. Kokkinidis, Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm, Brain Res. 795 (1998) 128–136.
- [11] C.K. McIntyre, T. Hatfield, J.L. McGaugh, Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats, Eur. J. Neurosci. 16 (2002) 1223–1226.
- [12] E. Merlo, P. Ratano, E.C. Ilioi, M.A. Robbins, B.J. Everitt, A.L. Milton, Amygdala dopamine receptors are equired for the destabilization of a reconsolidating appetitive memory, eNeuro (2015), 0024-14.2015.
- [13] M.I. Miranda, G. Ferreira, L. Ramirez-Lugo, F. Bermúdez-Rattoni, Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 11417–11422.
- [14] D.A. Morilak, G. Barrera, D.J. Echevarria, A.S. Garcia, A. Hernandez, S. Ma, C.O. Petre, Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29 (2005) 1214–1224.
- [15] K. Nader, J.E. LeDoux, Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations, Behav. Neurosci. 113 (1999) 891–901.
- [16] K. Nader, G.E. Schafe, J.E. Le Doux, Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval, Nature 406 (2000) 722–726.
- [17] G. Paxinos, C. Watson, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, 1998.
- [18] S. Reilly, M.A. Bornovalova, Conditioned taste aversion and amygdala lesionsin the rat: a critical review, Neurosci. Biohehav. Rev. 7 (2005) 1067–1088.
- [19] C.J. Rodriguez-Ortiz, V. De la Cruz, R. Gutiérrez, F. Bermudez-Rattoni, Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained, Learn. Mem. 12 (5) (2005) 533–537.

- [20] C.J. Rodríguez-Ortíz, I. Balderas, P. García-DeLaTorre, F. Bermúdez-Rattoni, Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval, Neurobiol. Learn. Mem. 98 (2012) 215–219.
- [21] R. Roesler, M.R. Vianna, F. De-Paris, J. Quevedo, R. Walz, M. Bianchin, Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance, Braz. J. Med. Biol. Res. 33 (7) (2000) 829–834.[22] S. Tucci, P. Rada, L. Hernandez, Role of glutamate in the amygdala and lateral
- hypothalamus in conditioned taste aversion, Brain Res. 813 (1998) 44-49.
- [23] Y. Wu, Y. Li, X. Yang, N. Sui, Differential effect of beta-adrenergic receptor antagonism in basolateral amygdala on reconsolidation of aversive and appetitive memories associated with morphine in rats, Addict. Biol. 1 (2014) 5–15.
- [24] Y. Yasoshima, T. Yamamoto, K. Kobayashi, Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion, Chem. Senses 30 (Suppl. 1) (2005) i158-i159.

Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are 1 differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity: Interaction 2

between amygdala and insular cortex. 3

- 4
- Daniel Osorio-Gómez^a, Kioko Guzmán-Ramos^{a,b} and Federico Bermúdez-Rattoni^a 5
- 6
- 7 ^aDivisión de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional
- Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México 8 9
- City, México
- ^bDepartamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad 10
- Lerma. Av. Hidalgo poniente 46 Col. La estación, 52006 Lerma de Villada, México 11
- 12

13 **Corresponding author:**

- 14 Dr. Federico Bermúdez Rattoni
- Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México 15
- División de Neurociencias 16
- 17 Laboratory BL-201
- 18 Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria
- Coyoacán, 04510 Mexico City, México 19
- 20 fbermude@ifc.unam.mx

21 Abstract

22 The functional integrity of the insular cortex (IC) is necessary to retrieve conditioned 23 taste aversion (CTA). However, it remains unknown whether cortical 24 neurotransmitter levels are modified upon CTA retrieval. Using in vivo microdialysis, we evaluated extracellular changes of glutamate, norepinephrine and dopamine 25 26 within the IC during CTA retrieval. Results showed that during CTA retrieval, there 27 were clear elevations in glutamate, norepinephrine and dopamine levels within the IC. It has been reported that the amygdala-IC interaction is involved in the 28 29 consolidation and retention of CTA. Therefore, we evaluated how glutamatergic activity within the amygdala modulates neurotransmitter modifications in the IC 30 31 during CTA retrieval. To achieve this, we microinjected AMPA or NMDA receptor 32 antagonists in the amygdala during CTA retrieval, while microdialysis in vivo in the 33 IC was carried out. Inactivation of amygdalar NMDA receptors impaired glutamate 34 augmentation within the IC, whereas dopamine and norepinephrine levels 35 augmentation persisted, and a reliable CTA retrieval was observed. Conversely, 36 blockade of AMPA receptors in the amygdala impaired retrieval, as well as norepinephrine and dopamine augmentations in the IC. Interestingly, AMPA 37 blockade did not affect extracellular levels increase of glutamate. These results 38 39 suggest that glutamatergic amygdalar modulation differentially affects 40 neurotransmission within the IC during CTA retrieval.

41 Introduction

42 Memory retrieval has been defined as the access, selection, reactivation or 43 reconstruction of previously stored information (Dudai, 2002). It has been suggested 44 that memory retrieval is a dynamic process in which memory strength could be 45 modified and updated through post-retrieval plasticity processes (Rodríguez-Ortíz et 46 al., 2008, Flavell and Lee, 2013, García-Delatorre et al., 2014). Conditioned taste 47 aversion (CTA) is a well-known associative learning paradigm suitable to the study of neurobiological processes involved in the acquisition, consolidation and retrieval 48 49 of memory. In CTA, animals associate a novel taste with gastric malaise; this 50 association produces a decrease in the consumption of the gustatory stimulus in 51 further presentations (García et al., 1955; Bermúdez-Rattoni, 2004).

52

53 The insular cortex (IC) is part of the temporal neocortex and has been associated 54 with viscerosomatic information. The IC has been also involved in several cognitive 55 functions like memory formation of aversively and non-aversively motivated tasks, 56 like CTA and object recognition memory (for review Bermúdez-Rattoni, 2014). In 57 CTA learning, the IC has a key role in the brain circuitry involved in the acquisition, 58 consolidation, and retrieval (Bermúdez-Rattoni and McGaugh, 1991; Guzmán-59 Ramos et al., 2010; Desgranges et al., 2009). During CTA acquisition, the exposure 60 to a novel gustatory stimulus is related to an increase in acetylcholine (Miranda et al., 2000) and dopamine (Guzmán-Ramos et al., 2010) extracellular levels within the 61 62 IC. Induction of gastric malaise by an intraperitoneal injection of LiCl causes an augmentation in glutamate and norepinephrine concentrations within the IC 63 64 (Guzmán-Ramos et al., 2010). Interestingly, during CTA post-acquisition there is a 65 concomitant increase in dopamine and glutamate within the IC; moreover, these offline extracellular augmentations of glutamate and dopamine have a key role in 66 consolidation of taste aversion memory (Guzmán-Ramos et al., 2010). 67

68

It has been suggested that the functional integrity of the IC is necessary to retrieve
taste aversion. For instance, temporal IC inactivation by tetrodotoxin infusions (Gallo
et al., 1992) or electrolytic lesion of the IC (Cubero et al., 1999) impairs taste aversion

72 expression during retrieval. Additionally, it has been shown that in a multiple choice 73 test, AMPA receptors activity within the IC is necessary to retrieve CTA (Berman et 74 al., 2000). Moreover, it has been demonstrated that glutamatergic receptors activity has a fundamental participation in retrieval and memory updating (Rodríguez-Ortíz 75 et al., 2012; García-Delatorre et al., 2014; Osorio-Gómez et al., 2016). Altogether, 76 77 these results suggest that glutamatergic activity within the IC is necessary for CTA 78 retrieval. However, there is scarce information about changes in other 79 neurotransmitters levels during CTA retrieval.

80

81 The IC and the amygdala are highly interconnected and this interaction has a key 82 role in CTA memory formation. For instance, tetanic stimulation of the basolateral 83 amygdala induces long-term potentiation in the IC, and NMDA receptors in the IC 84 are necessary for this induction (Escobar et al., 1998). This long-term potentiation 85 induction enhances the retention of taste aversion memory (Escobar and Bermúdez-86 Rattoni, 2000). During CTA acquisition, amygdala-IC interactions regulate the 87 strength of CTA memory through the activity of NMDA receptors in the IC (Ferreira et al., 2005). Also, it has been demonstrated that during CTA post-acquisition phase, 88 concomitant changes in dopamine and glutamate extracellular levels within the IC 89 90 are hampered when tetrodotoxin is administered bilaterally into the amygdala, 91 causing impairment of CTA consolidation (Guzmán-Ramos et al., 2010). Moreover, it has been shown that after CTA learning, there is an increase in the functional 92 93 connectivity between amygdala and IC (Grossman et al., 2008). Although the importance of amygdala-IC connectivity in the formation of taste aversive memory is 94 recognized, it is relevant to determine the participation of the amygdala 95 96 communication with the IC during memory retrieval.

97

In the first part of this study, we measured the extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine within the IC during CTA retrieval. In addition, to test the hypothesis that neurotransmission in the IC could be modulated by the activity of glutamatergic receptors in the amygdala; we injected AMPA and NMDA receptor antagonists in the amygdala during CTA retrieval while performing microdialysis

103 within the IC.

104

105 Results

In order to evaluate changes in the extracellular levels of glutamate, norepinephrine, 106 107 and dopamine within the IC during CTA retrieval, we used in vivo microdialysis 108 during exposure to the conditioned stimulus in the following groups of animals. The 109 Aversive saccharin group (Aversive, n = 8), which was previously exposed to 30 mL of a 0.1% (wt/vol) sodium saccharin solution, followed by an i.p. LiCl injection (0.2 110 111 M, 7.5 mL/kg), and the Non-Aversive saccharin group (Non-Aversive, n=7), which was previously exposed to the same saccharin solution, but afterwards it received 112 113 an i.p. NaCl injection (0.2 M, 7.5 mL/kg), that does not cause taste aversion. Microdialysis were carried out in both groups during CTA retrieval during exposure 114 115 to 0.1% sodium saccharin solution.

116

117 Extracellular levels of glutamate within IC during CTA retrieval

Statistical analysis indicated significant differences in extracellular levels of 118 glutamate between groups ($F_{(1,120)}$ = 11.238 p< 0.01); among fractions ($F_{(5,120)}$ = 2.676 119 p< 0.05); and a group-fractions interaction effect ($F_{(5,120)}$ = 3.300 p< 0.01). The 120 121 Aversive saccharin group showed differences in glutamate levels compared to basal 122 concentration at the sixth fraction (p < 0.01), where the aversive stimulus was present, whereas the Non-Aversive saccharin group revealed no significant 123 124 differences in glutamate levels regarding presentation of saccharin. Figure 1B shows changes in extracellular levels of glutamate in the IC during CTA retrieval. 125

126

127 Extracellular levels of norepinephrine within IC during CTA retrieval

During CTA retrieval, statistical analysis revealed differences in the extracellular levels of norepinephrine within the IC between groups ($F_{(1,115)}$ = 4.343, p< 0.05) and among fractions ($F_{(5,115)}$ = 5.253, p< 0.01), whereas no interaction group-fraction effect was observed ($F_{(5,115)}$ = 1.559, p= NS). In the Aversive saccharin group, there was an augmentation in norepinephrine when the rats were exposed to the aversivestimulus at sixth fraction (p<0.01); while no significant changes between fractions in the Non-aversive saccharin group were observed. Figure 1C displays changes in noradrenergic extracellular levels within IC upon CTA retrieval. This data showed that in conditioned animals, there was an increment in norepinephrine concentration within IC when the conditioned stimulus was present, presentation of saccharin that was not associated with gastric malaise did not induce changes in noradrenergic signaling within IC.

140

141 Extracellular levels of dopamine within IC during CTA retrieval

142 Regarding the extracellular levels of dopamine within IC, there were significant changes between groups ($F_{(1,124)}$ = 8.625 p< 0.01); fractions ($F_{(5,124)}$ = 4.684 p< 0.01); 143 144 and no interaction group-fraction effect was observed ($F_{(5.124)}$ = 1.890 p= NS). The Aversive saccharin group showed changes in dopamine levels compared to basal 145 146 concentration at the sixth fraction when saccharin was presented (p<0.01), while in 147 the Non-Aversive saccharin group, exposure to saccharin did not alter the levels of 148 dopamine within the IC. Figure 1D exhibits modifications in extracellular levels of 149 dopamine when the conditioned stimulus was present.

150

151 Behavioral CTA retrieval results

152 Conditioned taste aversion response was estimated by measuring consumption of 153 saccharin during microdialysis. Non-paired Student's t-test showed that the Aversive 154 saccharin group displayed a significant and clear taste aversion, whereas the Non-155 Aversive saccharin group failed to elicit reliable CTA (t= 7.135, p< 0.01) (Figure 1E). 156

According to these results, during CTA retrieval when animals were exposed to saccharin previously paired with gastric malaise, the animals exhibited a clear taste aversion and there was an increase in extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine within the IC.





163 Figure 1. Behavioral CTA responses and extracellular levels of glutamate, norepinephrine and dopamine within the insular cortex during CTA retrieval. A) 164 Schematic representation of the microdialysis protocol used. Changes in glutamate 165 (B) norepinephrine (C) and dopamine (D) levels in conditioned animals (Aversive, 166 n= 8) and non-conditioned animals (Non-Aversive, n= 7) during CTA retrieval. The 167 conditioned stimulus elicits glutamatergic, noradrenergic and dopaminergic 168 increments in the Aversive saccharin group upon CTA retrieval. E) The Aversive 169 saccharin group displays a reliable taste aversion during memory retrieval. Graphics 170 are expressed as means of % basal concentration ± SEM. **p< 0.01 and *p < 0.05 171 versus basal concentration. Behavioral response graph is expressed as mean of % 172 173 saccharin consumption intake during CTA acquisition ± SEM. ##p < 0.01 versus Non-aversive saccharin group. 174

- 175
- 176
- 177

Microdialysis results indicated that there was an augmentation of glutamate, norepinephrine and dopamine within the IC during CTA retrieval. Therefore, to test the hypothesis that neurotransmission within the IC could be modulated by the activity of glutamate receptors in the amygdala, we injected AMPA (CNQX 1mg/mL, n= 9), NMDA (APV 10 mg/mL, n= 8) receptor antagonists or saline solution (SS, n=9) in the amygdala before exposure to the aversive-conditioned saccharin while performing microdialysis within the IC during CTA retrieval.

185

186 Differential effects of AMPA and NMDA activity in the amygdala over 187 neurotransmitter levels within the IC during retrieval

188 Statistical analysis indicated that extracellular levels of glutamate changed among fractions ($F_{(5,217)}$ = 5.175, p< 0.01) and a group-fraction interaction effect was 189 190 observed ($F_{(10,217)}$ = 1.928, p< 0.05). No differences were observed among groups (SS, CNQX, APV) ($F_{(2,217)}$ = 0.774, p= NS). Post hoc analysis revealed that glutamate 191 192 concentrations within the IC changed among fractions in animals injected in the amygdala with SS ($F_{(5.81)}$ = 4.819, p< 0.01) or CNQX ($F_{(5.68)}$ = 2.991, p< 0.05) during 193 CTA retrieval, specifically at the sixth fraction (p< 0.01). Conversely, the extracellular 194 levels of glutamate within the IC were similar among fractions in the APV group upon 195 196 CTA retrieval ($F_{(5.68)}$ = 1.542, p= NS) (Figure 2B and 2C).

197

In regard to norepinephrine within the IC, extracellular levels varied among fractions 198 199 $(F_{(5,222)} = 5.215, p < 0.01)$ and group-interaction effect was observed $(F_{(10,222)} = 2.274, p < 0.01)$ p<0.05). No differences were observed among groups ($F_{(2,222)}$ = 1.353, p= NS). Post 200 201 hoc analysis showed that extracellular levels of norepinephrine within the IC varied 202 among fractions in the groups injected in the amygdala with SS ($F_{(5.80)}$ = 2.274, 203 p<0.01) or APV ($F_{(5.68)}$ = 2.899, p<0.05) during CTA retrieval, specifically at the sixth fraction for the SS group (p < 0.01) and at the fifth fraction in the APV group (p < 0.05). 204 205 On the other hand, post hoc analysis showed that extracellular levels of 206 norepinephrine within the IC were similar among fractions in the group injected with CNQX in the amygdala ($F_{(5,74)}$ = 1.140, p= NS) (Figure 2D and 2E). 207

209 The statistical analysis indicated that extracellular levels of dopamine in the IC were 210 different among fractions ($F_{(5,220)}$ = 5.831, p< 0.01), among groups ($F_{(2,220)}$ = 3.468, p< 211 0.05), and a group-fraction interaction effect was observed ($F_{(10,220)}$ = 2.380, p< 0.05). 212 Post hoc analysis revealed that extracellular levels of dopamine within the IC changed among fractions in both the SS ($F_{(5.77)}$ = 3.930, p< 0.01) and APV 213 $(F_{(5.70)} = 3.594, p < 0.01)$ groups during CTA retrieval, when the aversive stimulus was 214 215 present at the sixth fraction (p< 0.01). Conversely, dopamine concentrations within the IC were similar among fractions in the animals injected with CNQX in the 216 217 amygdala during CTA retrieval ($F_{(5,73)}$ = 3.594, p= NS) (Figure 2F and 2G).

218

219 Differential effects of AMPA and NMDA activity in the amygdala on CTA retrieval 220 response

Statistical analysis revealed that there were significant differences in saccharin consumption during CTA retrieval among groups ($F_{(2,22)}$ = 25.755, p< 0.01). *Post hoc* analysis showed that animals injected with CNQX in the amygdala displayed a reduced aversion response compared to SS or APV groups (p< 0.01), meanwhile no differences were observed between SS and APV groups (p= NS) indicating that both groups elicited a reliable CTA expression (Figure 3).

227

These data indicate that blockade of AMPA receptors in the amygdala hindered CTA expression, as well as changes in norepinephrine and dopamine extracellular levels within the IC during CTA retrieval; however, extracellular augmentation of glutamate persisted. Otherwise, the blockade of NMDA receptors in the amygdala disrupted changes in glutamate extracellular levels within the IC while catecholaminergic augmentation and CTA expression remained intact.


Figure 2. Glutamate receptors in the amygdala differentially affect neurotransmitter 235 levels increase within insular cortex. (A) Schematic representation of the 236 microdialysis and intra-amygdalar infusion protocol used. (B) Intra-amygdalar 237 infusion of CNQX does not affect glutamate increase within the IC during CTA 238 retrieval (CNQX, n= 9). (C) APV infusion in the amygdala impaired glutamate 239 changes in the IC during CTA retrieval (APV, n= 8). (D) Norepinephrine extracellular 240 levels in the IC during CTA retrieval are hindered by CNQX in the amygdala. (E) 241 Amygdalar APV injection does not affect norepinephrine increase within IC when 242

aversive stimulus is present. (F) Extracellular levels of dopamine within the IC during CTA retrieval are diminished due to CNQX injection in the amygdala. (G) Microinfusion of APV in the amygdala does not have effect on dopamine increase within IC when aversive stimulus is present. Graphics are expressed as means of % basal concentration \pm SEM. *p < 0.05 and **p< 0.01 versus basal concentration.



Figure 3. Behavioral CTA responses during retrieval. The amygdalar injection of
saline solution and APV does not hindered a reliable aversion during CTA memory
retrieval, whereas injection of CNQX in the amygdala impairs tCTA response.
Graphics are expressed as % of acquisition consumption ± SEM. **p < 0.01 versus
saline solution group.

254

255 Verification of cannula placement

Coronal sections (40 μ m) were cut and stained with cresyl violet. The placement of the microdialysis probes for the Aversive saccharin group and the Non-Aversive saccharin group were observed in the insular cortex region (Figure 4). In the amygdala-IC interaction experiment, the location sites for the injector tips were between the central and the basolateral amygdala, the volume of drug infused (1 μ L) is sufficient to reach both nuclei. Animals with misplaced cannulas were not included in further analyses.

A) Microdialysis probes



263

Figure 4. Schematic representations of microdialysis cannula locations implanted in the IC and injector tips in the amygdala region. (A) Representative photomicrography of the IC with cannula trace and representation of probes location area. (B) Representative microphotographs of the amygdala with injector tip and microdialysis cannula trace location within the IC; and representation of probes and injector tips location areas.

270

271 Discussion

272 Although memory retrieval is a very important process, there is scarce information 273 about the physiological mechanisms that subserve selection, reactivation and 274 reconstruction of stored internal representations (Dudai, 2002). The microdialysis 275 technique is a powerful tool to determine neurotransmitter levels in mnemonic 276 processes. During CTA acquisition, presentation of a novel taste stimulus does not 277 induce cortical glutamatergic changes. However, the exposure to a novel taste 278 stimulus induces a significant increment of acetylcholine (Miranda et al., 2000) and dopamine (Guzman-Ramos et al., 2010) release. The presentation of LiCl, used as 279 280 unconditioned stimulus, produces an augmentation in glutamate levels within IC (Guzman-Ramos et al., 2010). In this study, we showed that presentation of a 281 282 conditioned aversive-saccharin, previously associated with gastric malaise now elicits an increment in extracellular levels of glutamate in the IC, similar to the 283 284 glutamate augmentation induced by LiCl observed during CTA acquisition (Guzmán285 Ramos et al., 2010).

286

287 It is widely known that norepinephrine is involved in the establishment of aversive 288 memories (McGaugh et al., 2013). Presentation of stressful stimuli elicits 289 norepinephrine release in the forebrain (Morilak et al., 2005), including the IC (Funk 290 and Stewart, 1996). In CTA, exposure to the conditioned taste stimulus is a stressful 291 event because saccharin was associated with a threat to the homeostasis and well-292 being of an organism. In agreement with this, our data show that the presentation of 293 an aversive gustatory stimulus induced norepinephrine levels augmentation within IC probably through a stress-related mechanism. 294

295

296 Data shown in this study exhibits an increase in dopamine extracellular levels within 297 IC during CTA retrieval when an aversive stimulus was present. In this regard, there 298 is information about a phasic excitation of dopaminergic neurons induced by an 299 aversive stimulus such as foot-shock (Brischoux et al., 2009). Furthermore, 300 exposure to the non-aversive saccharin does not induce an augmentation in 301 dopamine extracellular levels, this effect has been observed previously, where exposure to a flavor impairs dopamine changes in the nucleus accumbens when the 302 303 flavor is re-exposed (Luca et al., 2011), suggesting that salience has diminished. 304 Therefore, an aversive stimulus induces an increment in dopamine levels within the IC, proposing that exposure to an aversive taste stimulus is a very salient 305 306 information, whereas the presentation of a non-aversive stimulus evokes a minor 307 increase of dopamine as a result of lack of salience. Our results suggest that 308 dopamine probably does not signal the valence (aversive or non-aversive) of the 309 stimulus, but it indicates its salience instead.

310

Berman and coworkers (2000; 2001) suggest that CTA behavioral expression during retrieval is independent of NMDA, dopaminergic D1, and beta-adrenergic receptors activity; whereas AMPA receptors activity within the IC is necessary to retrieve taste aversive memory. Nevertheless, our results suggest that exposure to the aversive gustatory stimulus induces an elevation of glutamate, dopamine and norepinephrine

within the IC. Differences in neurotransmission signaling can be explained by 316 differences in behavioral protocols used; during CTA retrieval we presented one 317 318 bottle with saccharin while they performed a multiple choice test presenting three bottles with saccharin and three bottles with water, promoting a preference or 319 320 avoidance phenomenon. Therefore, we observed the effect of the consumption of 321 the aversive solution that induces changes in neurotransmission and not a possible 322 effect of taste preference or avoidance. Another possible explanation is that CTA retrieval depends on different dopaminergic and noradrenergic receptors. However, 323 324 a possible functional involvement of neurotransmission within the IC is explained below. 325

326

327 Memory reconsolidation is a process where previously consolidated information 328 could be modified (Rodríguez-Ortíz and Bermúdez-Rattoni, 2007). Moreover, it has 329 been considered that memory retrieval is necessary to trigger mechanisms of 330 memory reconsolidation (Nader and Einarsson, 2010; Flavell et al., 2011). 331 Nevertheless, it has been suggested that behavioral expression is an independent process of memory reactivation that undergoes reconsolidation (Ben Mamou et al., 332 2006; Rodríguez-Ortíz et al., 2012; Coccoz et al., 2013; Balderas et al., 2013; 333 334 García-Delatorre et al., 2014; Santoyo-Zedillo et al., 2014; Delorenzi et al., 2014). 335 Furthermore, these studies have shown that memory retrieval is a process composed by independent mechanisms necessary for behavioral expression and 336 337 memory trace reactivation (Flavell et al., 2011; 2013). It is probable that memory trace reactivation induces destabilization of memories facilitating memory updating 338 (Lee 2009; Rodríguez-Ortíz et al., 2012; García-Delatorre et al., 2009). In this 339 340 regard, we have demonstrated that memory reconsolidation takes place even in the 341 absence of behavioral expression during retrieval under the effects of AMPA antagonists in the amygdala in aversive tasks (Rodríguez-Ortíz et al., 2012; García-342 343 Delatorre et al., 2014; Osorio-Gómez et al, 2016). Interestingly, infusion of a NMDA receptor blocker in the amygdala disrupts CTA memory reconsolidation without 344 345 affecting behavioral expression (García-Delatorre et al., 2014). These differential 346 effects have also been observed in non-aversive tasks and different brain structures.

In object recognition memory, the infusion of an AMPA receptor antagonist in the perirhinal cortex impedes preference for the novel object during retrieval but did not affect object memory reconsolidation, whereas NMDA receptor antagonist infusions disrupted reconsolidation whether or not novel object memory recognition was blocked during retrieval (Santoyo-Zedillo et al., 2014). All in all, during retrieval it is possible to separate behavioral expression from memory trace reactivation, which its integrity is necessary for memory reconsolidation.

354

355 In this study, when behavioral expression was impaired through injection of an AMPA antagonist in the amygdala, norepinephrine and dopamine extracellular levels 356 357 in the IC were also impaired. These results suggest that AMPA receptors in the 358 amygdala are modulating the CTA expression and catecholaminergic extracellular 359 levels within the IC. Interestingly, AMPA receptors blockade in the amygdala did not 360 disrupt glutamatergic changes in the IC during CTA retrieval; this glutamatergic 361 augmentation could be responsible for the integrity of the memory trace reactivation 362 and subsequent memory reconsolidation processes (García-Delatorre et al., 2014). Conversely, intra-amygdalar blockade of NMDA activity did not disrupt CTA 363 364 behavioral response, and norepinephrine and dopamine changes in the extracellular 365 levels within the IC persisted. However, injection of an NMDA antagonist in the 366 amygdala hindered changes in the glutamatergic extracellular levels in the IC, therefore causing a disruption of memory trace integrity reactivation in the IC 367 368 impeding ulterior memory reconsolidation (García-Delatorre et al., 2014). In this regard, it has been demonstrated that the amygdala-IC interaction has a key role in 369 the formation and maintenance of CTA memory trace through NMDA receptors 370 371 activity within the IC. During CTA acquisition, amygdala-IC interactions regulate CTA 372 memory strength. Tetanic stimulation in the amygdala induces long-term potentiation 373 in the IC that depends on NMDA receptors in the IC (Escobar et al., 1998). The 374 induction of this long-term potentiation in the amygdala-IC projection before CTA training enhances CTA memory retention (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000). 375 376 Likewise, CTA enhancement through glutamate injections in the amygdala is 377 blocked by injection of NMDA receptor antagonists in the IC, providing evidence that NMDA receptor activation in the IC is essential to enable CTA enhancement through
amygdala glutamatergic activity (Ferreira et al., 2005).

380

All these results suggest that amygdalar interaction with the IC through glutamatergic communication could be involved in the memory trace reactivation facilitating memory reconsolidation during retrieval. Finally, this study proposes that behavioral expression during memory retrieval could be regulated by norepinephrine and dopamine in the IC throughout glutamatergic modulation by the amygdala.

386

387 Materials and methods

388 Animals

Adult male Wistar rats weighing 260 - 280 g were used in this study. The animals were obtained from the Instituto de Fisiología Celular and were housed individually at 22 °C in a 12 h light/12 h dark cycle starting at 7 am, all procedures were performed during the light cycle and were approved by the animal care and ethics committee of the Instituto de Fisiología Celular (FBR 30-14). Water and food were *ad libitum* except during behavioral protocols.

395

396 Guide cannula implantation

Rats were implanted with a unilateral guide cannula (CMA Microdialysis, Stockholm,
SE) aiming to the IC using standard stereotaxic procedures. The cannula was
implanted with coordinates from Bregma (AP + 1.2 mm; L +5.5 mm; DV -4.5 mm)
(Paxinos and Watson, 1998), and was fixed to the skull using two screws with dental
acrylic cement. Right and left hemispheres were counterbalanced.

402

403 Microdialysis protocol

After six days of recovery, animals were water-deprived 24 h prior to behavioral procedures, and then they were habituated in a microdialysis chamber once a day for 1 hour. Rats were allowed to drink 30 mL of tap water from a graded bottle during 15 min and baseline consumption was established over six days. On the seventh day, rats were separated in two groups, an aversion group (Aversive saccharin, n = 409 8), which was exposed during 15 min to 30 mL of a 0.1% (wt/vol) sodium saccharin 410 (Sigma-Aldrich, Missouri, US) solution (SAC) and followed by i.p. LiCl (Baker, New 411 Jersey, US) injection (0.2 M, 7.5 mL/kg) 15 min after SAC consumption. A control 412 group (Non-aversive saccharin, n = 7), where rats were exposed to SAC, but afterwards they received an i.p. NaCl (Sigma-Aldrich, Missouri, US) injection (0.2 M, 413 414 7.5 mL/kg) that would not cause gastric malaise and therefore no taste aversion 415 would be developed. Three days after training, animals were tested and both groups underwent microdialysated. Dialysis was performed inserting a dialysis probe with a 416 417 3 mm length membrane (CMA 12 MD Probe, CMA Microdialysis, Stockholm, SE) connected to the micro-infusion pump system (CMA Microdialysis, Stockholm, SE) 418 419 which perfused the probe continuously at a rate of 1 µl/min with Ringer solution (NaCl 118 mM, KCI 4.7 mM, NaH2PO4H2O 1.2 mM, MgSO47H2O 1.2 mM, NaHCO3 19 420 421 mM, CaCl₂ 2.5 mM, glucose 3.3 mM). After probe insertion, the first sampling hour was discarded due to fluid stabilization; samples were collected every 4 min (4 422 µl/sample) in vials containing 1 µl of antioxidant mixture (0.25 mM ascorbic acid, 423 424 Na2EDTA 0.27 mM, 0.1 M acetic acid). Samples were immediately frozen at -80°C. The first three samples were used to calculate as basal concentration, afterwards a 425 426 graded bottle with SAC was placed in the microdialysis chamber for 15 min and 427 consumption intake was measured. Microdialysis sampling extended until ten 428 fractions were collected.

429

430 Analysis of microdialysate samples

431 Neurotransmitter concentrations were determined by capillary electrophoresis. 432 Briefly, samples were derivatizated with 6 µL of 16.67 mM 3-(2-furoyl)quinoline-2carboxaldehyde (FQ, Molecular Probes, Invitrogen, Massachussetts, US) in the 433 434 presence of 2 mL of KCN 25 mM in 10 mM borate buffer (pH 9.2) and 1 µL of internal 435 standard (0.075 mM O-methyl-L-threonine, Sigma-Aldrich, Missouri, US). 436 Derivatization reactions were carried out in the dark at 65°C for 15 min. Capillary 437 electrophoresis-based separations with laser induced fluorescence detection were 438 used for analysis (Beckman-Coulter PACE/ MDQ, Glycoprotein System, California, 439 US). Mixture separation was based on micellar electrokinetic chromatography buffer

440 system. Glutamate, norepinephrine and dopamine peaks were identified by 441 matching electropherograms with a spiked sample. Samples were corrected by 442 relating the area under the curve of the unknown sample with the area under the 443 curve of the internal standard. Analyses were performed with the Karat System Gold 444 software (Beckman Coulter, California, US). Results are expressed as percentage 445 of basal concentration (% Basal concentration= (analyte concentration X 100/ mean 446 of the three first samples).

447

Pharmacological manipulation of the amygdala during CTA retrieval while monitoring neurotransmitter changes within the IC

450 Unilateral microdialysis cannula aiming the IC (AP + 1.2 mm; L +5.5 mm; DV -4.5 451 mm) and bilateral steel cannulas aiming the amygdala (AP -2.8 mm, L ± 4.8 mm, DV 452 -6.5; Guzmán-Ramos et al., 2010) were implanted using standard stereotaxic 453 protocols. Behavioral scheme was performed as described above. During CTA 454 acquisition all animals were exposed during 15 minutes to 30 mL of SAC in a graded 455 bottle and 15 minutes afterwards they received an i.p. LiCl injection (0.2 M, 7.5 456 mL/kg). CTA retrieval was carried out 72 hours after acquisition. Rats were divided in three groups counterbalanced according to their acquisition mean consumption. 457 458 Microdialysis started by inserting a dialysis probe with a 3 mm length membrane in 459 the IC, connected to the micro-infusion pump system, which perfused ringer solution at a rate of 1 µl/min. The first sampling hour was discarded and samples were 460 461 collected every 4 min (4 µl/sample) in vials containing 1 µl of antioxidant mixture. 462 After three samples were collected, an injector was inserted into each guide cannula 463 aiming to the amygdala extending 1 mm below the tip, injection needles were connected via polyethylene tubing into 10 µL Hamilton syringes, driven by an 464 465 automated micro-infusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, SE). A volume of 1 μ L (0.5 μ L/min) was injected per hemisphere in the amygdala; the injectors were 466 467 left for another minute to allow diffusion into the tissue. All drugs were dissolved in saline solution (0.9% wt/vol). Experimental groups according to drugs infusions were 468 separated as follow: saline solution (SS, n= 9); DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid 469 470 (APV 10 mg/mL, n= 8) (Tocris Bioscience; Bristol, UK); or 6-cyano-7471 nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt hydrate (CNQX 1mg/mL, n= 9) (Sigma 472 Aldrich, Missouri, US). Twenty minutes after micro-infusion, all groups had access 473 to 30 mL of a 0.1% (wt/vol) sodium saccharin for CTA memory retrieval during 15 474 minutes. Saccharin consumption over CTA retrieval was measured and microdialysis was carried out until ten fractions were collected. Saccharin intake 475 476 during CTA retrieval is reported as percentage of consumption of saccharin during 477 the CTA acquisition (% Acquisition consumption = saccharin solution intake during 478 retrieval × 100/mean saccharin intake during acquisition). Microdialysate samples 479 were analyzed as described above.

480

481 Histology

482 Cannulae placement was verified at the end of behavioral procedures, animals were 483 sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital and transcardially perfused with 484 physiological saline solution. Brains were removed and stored in paraformaldehyde 485 (4% solution in phosphate buffered saline) for 24 h. After a sucrose gradient 486 treatment, coronal sections of 40 µm were cut and stained with cresyl violet. Samples 487 were then examined under a light microscope to corroborate the correct placement 488 of cannulae.

489

490 *Statistics*

491 Statistical analysis of the changes in the extracellular levels of neurotransmitters 492 within IC were done using repeated measures ANOVA or Two-Way ANOVA where 493 appropriate with Bonferroni's post-hoc test. A non-paired Student's t-test was used to determine aversion on the CTA test. A multi-factorial ANOVA with Bonferroni's 494 495 post-hoc test were used to analyze changes in the extracellular levels of 496 neurotransmitters within IC during pharmacological manipulations of the amygdala 497 upon CTA retrieval. Saccharin consumption between groups during retrieval was 498 analyzed with one-way ANOVA. Value of p<0.05 was considered statistically 499 significant. Prism 6 (GraphPad software) was used to perform analysis and plots.

500

501 Acknowledgments

502 This work was supported by CONACyT (250870) and DGAPA PAPIIT-UNAM

(IN208616) grants. This study was performed in partial fulfillment of D.O. requirements
 for a PhD degree in the Biochemistry Graduate Program at UNAM with a fellowship
 provided by CONACyT. We thank Dr. Israela Balderas, Perla Moreno Castilla and
 Rodrigo Pérez Ortega for technical assistance.

508 References

Ben Mamou, C., Gamache, K., and Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical
for unleashing consolidated auditory fear memories. Nature neuroscience, 9(10),
1237–9. doi:10.1038/nn1778

512

513 Berman D.E. Hazvi S. Neduva V. and Dudai Y (2000). The role of identified 514 neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: 515 activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. Journal of Neuroscience 516 20(18):7017-23.

- 517
 518 Berman D.E. and Dudai Y (2001). Memory extinction, learning the anew, and
 519 learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in the cortex.
 520 Science 291, 2417 DOI: 10.1126/science.1058165
- 521

522 Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C., and Bermudez-Rattoni, F. (2013). Retrieval and 523 reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the 524 perirhinal cortex. Neuroscience, 253, 398–405. doi:10.1016/j.neuroscience. 525 2013.09.001

526

529

Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory.
Nature reviews. Neuroscience, 5(3), 209–17. doi:10.1038/nrn1344

- 530 Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D., and Ungless, M. (2009). Phasic 531 excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. Proceedings of 532 the National Academy of Sciences, 106(12), 4894–4899. 533 doi:10.1073/pnas.0811507106
- 534

Coccoz, V., Sandoval, A., Stehberg, J., and Delorenzi, A. (2013). The temporal
dynamics of enhancing a human declarative memory during reconsolidation.
Neuroscience, 246, 397–408. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.033

- 538
 539 Cubero I., Thiele T.E. and Bernstein I.L. (1999). Insular cortex lesions and taste
 540 aversion learning: effects of conditioning method and timing of lesion. Behavioural
 541 Brain Research, 839(2):323-30
- 542

543 Delorenzi, A., Maza, F., Suárez, L., Barreiro, K., Molina, V., and Stehberg, J. (2014).
544 Memory beyond expression. Journal of Physiology-Paris.
545 doi:10.1016/j.jphysparis.2014.07.002

546

547 Desgranges, B., Bertrand, D., Sevelinges, Y., Yannick, S., Bonnefond, M., Mathilde,
548 B., Frédéric, L., Nadine, R., and Ferreira G. (2009). Critical role of insular cortex in
549 taste but not odour aversion memory. The European journal of neuroscience, 29(8),
550 1654–62. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06711.x

551

552 Dudai, Y. (2002). Memory from A to Z, keywords, concepts and beyond. Oxford: 553 Oxford University Press. ISBN 0-19-850267-2 554 555 Escobar, M., Chao, V. and Bermúdez-Rattoni, F. (1998). In vivo long-term 556 potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. Brain Research, 557 779(1-2):314-9. doi:10.1016/S0006-8993(97)01175-X 558 559 Escobar, M., and Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. Brain Research, 852(1), 560 208212. doi:10.1016/S0006-8993(99)02134-4 561 562 563 Ferreira, G., Miranda, M.I., De la Cruz, V., Rodríguez-Ortiz, C.J., Bermúdez-Rattoni 564 F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion 565 through NMDA receptor activation in the insular cortex. European journal of 566 neuroscience 22(10):2596-604. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04440.x 567 568 Flavell, C. R., Barber, D.J. and Lee, J. L. (2011). Behavioural memory 569 reconsolidation of food and fear memories. Nature communications 2:504. doi: 10.1038/ncomms1515. 570 571 572 Flavell, C. R., and Lee, J. L. (2013). Reconsolidation and extinction of an appetitive 573 pavlovian memory. Neurobiology of learning and memory, 104, 25-31. doi:10.1016/j.nlm.2013.04.009 574 575 576 Funk, D., and Stewart, J. (1996). Role of catecholamines in the frontal cortex in the 577 modulation of basal and stress-induced autonomic output in rats. Brain Research, 578 741(1-2), 220–229 doi: 10.1016/S0006-8993(96)00931-6 579 García, J., Kimeldorf, D.J., and Koelling, R.A. (1955) Conditioned aversion to 580 581 saccharin resulting from exposure to gamma radiation. Science. 122(3160):157-8. 582 583 García-Delatorre P., Rodríguez-Ortíz C.J., Arreguín-Martínez J.L., Cruz-Castañeda P., Bermúdez-Rattoni F. (2009) Simultaneous but not independent anisomycin infusions in 584 insular cortex and amvodala hinder stabilization of taste memory when updated. Learn 585 Mem 16(9):514-9. doi: 10.1101/lm.1356509 586 Garcia-Delatorre, P., Pérez-Sánchez, C., Guzmán-Ramos, K., and Bermúdez-587 Rattoni, F. (2014). Role of glutamate receptors of central and basolateral amygdala 588 nuclei on retrieval and reconsolidation of taste aversive memory. Neurobiology of 589 590 learning and memory, 111, 35–40. doi:10.1016/j.nlm.2014.03.003 591 592 Grossman, S., Fontanini, A., Wieskopf, J., and Katz, D. (2008). Learning-Related Plasticity of Temporal Coding in Simultaneously Recorded Amygdala-Cortical 593 594 Ensembles. The Journal of Neuroscience, 28(11), 2864-2873. doi:10.1523/JNEUROSCI.4063-07.2008 595 596 597 Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., and Bermúdez-Rattoni, 598 F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in 599 taste memory consolidation. Journal of Neurochemistry, 114(1), 226-236.

- 600 doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x
- 601

Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., and Bermúdez-Rattoni,
 F. (2012). Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala
 is involved in taste-aversion memory consolidation. Learning and Memory,
 19(6):231-8. doi: 10.1101/lm.024703.111.

606

Lee, J.L (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance Trends in neurosciences 32(8):413-20. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.002.

609

Luca, M. (2014). Habituation of the responsiveness of mesolimbic and mesocortical
dopamine transmission to taste stimuli. Frontiers in Integrative Neuroscience, 8.
doi:10.3389/fnint.2014.00021

613

McGaugh, J. (2013). Making lasting memories: Remembering the significant.
Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(0), 10402–10407.
doi:10.1073/pnas.1301209110

Miranda, M., Ramírez-Lugo, L., and Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Cortical
cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. Brain Research, 882(12), 230235. doi:10.1016/S0926-6410(00)00050-1

621

Miranda, M., Ortiz-Godina, F., and García, D. (2009). Differential involvement of cholinergic and beta-adrenergic systems during acquisition, consolidation, and retrieval of long-term memory of social and neutral odors. Behavioural brain research, 202(1), 19–25. doi:10.1016/j.bbr.2009.03.008

626

Morilak, D., Barrera, G., Echevarria, D., Garcia, A., Hernandez, A., Ma, S., and
Petre, C. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress.
Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 29(8),
12141224. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.007

631

Nader, K., and Einarsson, E. O. (2010). Memory reconsolidation: an update. Annals
of the New York Academy of Sciences, 1191, 27–41. doi:10.1111/j.17496632.2010.05443.x

635

Osorio-Gómez D., Guzmán-Ramos K., and Bermúdez-Rattoni F. (2016). Differential
involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala
during taste aversion retrieval on memory expression and updating. Behavioural
Brain Research 307:120-125. doi: 10.1016/j.bbr.2016.03.038.

Paxinos, G., and Watson , C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. (4thed.). San Diego, CA: Academic Press.

642

Rodríguez-Ortíz C.J. and Bermúdez-Rattoni F. Memory Reconsolidation or Updating
Consolidation? In Bermúdez-Rattoni F. ed. (2007) Neural Plasticity and Memory:
From Genes to Brain Imaging. CRC Press. Boca Raton.

646

Rodriguez-Ortiz, C. J., Garcia-Delatorre, P., Benavidez, E., Ballesteros M.A., and
Bermudez-Rattoni, F. (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt
previously consolidated spatial memory only when memory is updated.
Neurobiology of learning and memory, 89(3):352-9.

651

Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., Garcia-DeLaTorre, P., and Bermudez-Rattoni,

- 653 F. (2012). Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval.
- 654 Neurobiology of learning and memory, 98(3), 215–9. doi:10.1016/j.nlm.2012.08.002
- 655
- 656 Santoyo-Zedillo, M., Rodriguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermudez-657 Rattoni, F., and Balderas, I. (2014). Retrieval is not necessary to trigger 658 reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. Learning and 659 Memory. 21: 452-456. doi:10.1101/lm.035428.114