



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA AVERSIVA DEL SABOR BAJO DIFERENTES
ESQUEMAS DE CONSUMO DE LÍQUIDOS: EFECTOS DIFERENCIALES DEL RECEPTOR
PARA HISTAMINA H₃ EN LA CORTEZA INSULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

QFB. ALEJANDRA ALCALÁ RAMÍREZ

TUTOR (A) PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. MANUEL MIRANDA ANAYA, FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)

DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Alejandra Alcalá Ramírez, cuyo título es: “La formación de la memoria aversiva del sabor bajo diferentes esquemas de consumo de líquidos: efectos diferenciales del receptor para histamina H₃ en la corteza insular” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez_____

Secretario (Tutor)

Dra. María Isabel Miranda Saucedo_____

Vocal

Dra. Yazmín Macotela Guzmán_____

Suplente

Dr. Manuel Miranda Anaya_____

Suplente

Dra. Rebeca Corona García-Cabral_____

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

Restringir el consumo de líquidos es usual en protocolos experimentales como componente motivacional para el adecuado desempeño de la conducta. Una tarea de aprendizaje, que sigue protocolos de privación, es el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) permitiendo así obtener medidas legibles de consumo, sin embargo, pocos estudios han analizado los posibles efectos de la sed y la motivación sobre la formación y evocación de la memoria del sabor. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar un protocolo de CAS sin privación de agua, para evaluar la intensidad del aprendizaje aversivo y la velocidad de extinción de la memoria, en comparación con un protocolo de CAS tradicional; además dado que el sistema histaminérgico está implicado en la conducta motivada por sed se planteó conocer la participación de los receptores histaminérgicos H₃ presentes en corteza insular (CI), durante la formación de la memoria aversiva al sabor. Para lograrlo se condicionaron ratas Wistar de ambos sexos bajo diferentes esquemas de consumo de líquidos (*ad libitum*, privado o cruzado) y se administró R- α -metilhistamina (RAMH) 10 μ M en CI 20 min antes de la adquisición del CAS. Nuestros datos indican que el grado de saciedad de líquidos afecta de manera diferencial la evocación de la memoria aversiva al sabor, pero no su formación además de que no existen diferencias debidas al sexo. La administración de RAMH en la CI debilita la formación de la memoria aversiva en el esquema privado, mientras que en el esquema *ad libitum* solo acelera el proceso de extinción.

SUMMARY

Liquid restriction protocols are common in animal research; many studies use water deprivation as a motivating component during behavioral tasks. Liquid deprivation during conditioned taste aversion (CTA) allows readable measures, however, thirst is an important motivational component that could modulate the strength of conditioning as well as the memory extinction process. Nevertheless, few studies have analyzed the water deprivation effect on CTA. Therefore, our objective was to characterize a CTA protocol without water deprivation, to evaluate the intensity of aversive learning and the speed of memory extinction, in comparison with a traditional CTA protocol; Furthermore, given that the histaminergic system is involved on thirst motivated behavior, we proposed to elucidate the participation of histamine H₃ receptors in the insular cortex (IC), during taste aversive memory formation. To achieve this, Wistar rats of both sexes were conditioned under different fluid intake schemes (*ad libitum*, deprived, or crossed) and RAMH 10 μ M was injected in IC 20 min before CTA acquisition. Our data indicate the degree of liquid satiety differentially affects taste aversive memory retrieval but not formation and there are no differences by sex. RAMH injection in IC weakens aversive memory formation in deprived conditions, while in the *ad libitum* scheme it only accelerates the extinction process.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo lo dedico a la memoria de mi madre Ma. Luisa Ramírez quién fue, es y seguirá siendo para mí una fuente de amor incondicional.

Agradezco:

A mi padre José Luis Alcalá por creer en mi potencial, ayudarme a desarrollarlo, gracias por ser para mí un ejemplo de superación, constancia y disciplina.

A mis hermanos Vane, Luis, Ana y Alex con los que he compartido las desavenencias y alegrías de la vida, gracias por enriquecerme con sus diferentes personalidades, y a mi sobrino Luisito porque desde su nacimiento ha dado luz a mi vida.

A mi pareja Irving Dasaef por compartir conmigo su entusiasmo por vivir y la pasión que siente por su profesión, gracias por brindarme apoyo y calidez en mis momentos más oscuros al lado de nuestras mascotas Bella y Nala.

Agradecimiento especial:

A la Dra. María Isabel Miranda por la confianza que me brindó para desarrollar este proyecto, por instruirme a profundidad en el método científico y hacerme ver mis errores, por la orientación y la integración en el laboratorio B-14, que se convirtió en una segunda familia para mí.

A la Dra. Wendy Portillo Martínez y al Dr. Manuel Miranda Anaya por la orientación brindada, gracias por formar parte de mi comité tutor.

A la Dra. Gabriela Vera Rivera y al Lic. Alejandro Rangel Hernández por su asistencia técnica sin dejar a un lado su esmero por hacer del ambiente del laboratorio un lugar agradable y motivante para trabajar, gracias por su enorme paciencia hasta en el más mínimo detalle, sin duda excelentes maestros, gracias por permitirse crear esos lazos de amistad.

A la Dra. María José Olvera por compartir conmigo su interés y experiencia en la ciencia a través de pláticas y observaciones, gracias por el apoyo en diversas cuestiones metodológicas del proyecto y por el compañerismo mostrado.

A Polo y a Maricruz por su amistad genuina, por contagiarme de espontaneidad y de alegría, muchas gracias por hacerme reír en los momentos más caóticos.

Agradezco además el apoyo recibido en las diferentes áreas de la institución:

A la Dra. Nuri Aranda López en todo el seguimiento y trámites realizados en la Unidad de Enseñanza.

A la Lic. Ma. Lourdes Lara en las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases.

A la Dra. Alejandra Castilla y al MVZ. Martín García Servín por su apoyo en el Bioterio.

Por último y no menos importante a las fuentes de financiamiento que permitieron mi estancia en el instituto y el desarrollo del proyecto:

Al Programa de Licencia por Beca Comisión otorgada por la Coordinación Sectorial de Desarrollo Académico (COSDAC) de la Secretaría de Educación Pública (SEP).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT 201018).

INDICE

RESUMEN.....	iii
SUMMARY	iv
INTRODUCCIÓN	I
ANTECEDENTES.....	3
1.-Percepción de los sabores.....	4
2.-Procesamiento central del gusto	5
3.-Memoria y aprendizaje	7
4.-Clasificación de la memoria.....	9
4.1 Memoria del sabor	12
5. Modelos de estudio	13
6.- Motivación	15
6.1 Motivación y aprendizaje: sed y hambre como reguladores de aprendizaje	18
7.-Diferencias debidas al sexo en el aprendizaje y la memoria	20
8.-Anatomía funcional de la corteza insular	24
9. Histamina	26
9.1 Metabolismo y distribución	26
9.2 Receptores histaminérgicos.....	28
9.3 Sistema histaminérgico: corteza insular y la memoria del sabor	31
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35
SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN	61

CONCLUSIONES72
REFERENCIAS73
LISTA DE FIGURAS87

INTRODUCCIÓN

La histamina juega un papel en muchas funciones cerebrales homeostáticas y de mayor integración, la atención y la excitación, inducidas por la novedad son de gran importancia para la adaptación a entornos cambiantes al hacer una comparación entre lo novedoso y el recuerdo de cosas pasadas. Esto es decisivo para el desarrollo del cerebro, la fisiología y la fisiopatología, el reconocimiento de peligros y la supervivencia. Específicamente se ha demostrado que los receptores para histamina tipo H₃ están implicados en funciones cerebrales superiores, como la cognición, el aprendizaje y la memoria, el sueño, el apetito y el metabolismo energético (Haas et al., 2008). Dada la relevancia de la histamina en diversos procesos fisiológicos en el presente proyecto de investigación se plantea el estudio de la función de los receptores H₃ en la corteza insular (CI), durante la formación de la memoria aversiva al sabor bajo un esquema de líquidos *ad libitum*.

El condicionamiento aversivo al sabor (CAS) es una tarea de aprendizaje asociativo en la cual las ratas adquieren una aversión fuerte y prolongada a un sabor novedoso cuando el consumo de ese sabor se asocia poco después con el malestar gástrico inducido por una inyección intraperitoneal de Cloruro de Litio (LiCl). Dentro del procedimiento del CAS se requiere que los sujetos de experimentación sean privados de líquidos para el adecuado registro de la formación de la memoria; sin embargo, Ángulo (2018) sugiere que el estado de privación podría estar proporcionando algún tipo de instrucciones para procesar los estímulos.

Además, Contreras et al. (2016) encontraron que ratas sedientas a las que se les presentó una botella de agua vacía tuvieron un aumento grande y significativo en el número de neuronas Fos-ir en el núcleo histaminérgico tuberomamilar (TMN). Por lo tanto, es posible que la privación de líquidos esté proporcionando instrucciones para procesar los estímulos y que estas estén relacionadas con la activación del sistema histaminérgico, en consecuencia, la evaluación de la función de los receptores de histamina H₃ en la formación de la memoria aversiva se plantea bajo un esquema de líquido *ad libitum* que nos permitirá evaluar los efectos de la saciedad y de la privación en dicho proceso.

Para ello, primeramente, se caracterizará un modelo CAS con dos esquemas diferentes, un esquema es de líquido *ad libitum* y el otro es de privación de líquidos, posteriormente en la evaluación de la función de los receptores para histamina H₃ se inyectará el agonista *R- α -metilhistamina* (RAMH) en la CI durante la adquisición del CAS, y se evaluará el consumo de líquidos durante las etapas del CAS.

ANTECEDENTES

La luz, los sonidos, el olor y el sabor, la temperatura, el dolor, el placer, entre otros, son estímulos que recibimos de los entornos externo e interno, la sensación conlleva la capacidad de transducir, codificar y, en última instancia, percibir la información generada por dichos estímulos. Aunque los sentidos básicos son diferentes entre sí, unas pocas reglas en común dirigen la forma en que el sistema nervioso trata con cada modalidad de estímulo. Los receptores sensoriales convierten la energía asociada con las ondas de luz y sonido, la presencia de moléculas odorantes o sustancias químicas ingeridas, y las fuerzas mecánicas, en señales neuronales que transmiten información al cerebro, y es aquí donde se representan los aspectos cualitativos y cuantitativos del estímulo y en algunas modalidades la ubicación del estímulo en el espacio (Miranda, 2011; Purves et al., 2018).

Percibir es la función cerebral y el primer proceso cognitivo que nos permite elaborar e interpretar la información proveniente de nuestro entorno a través de los órganos sensoriales, pero también la información proveniente de estímulos internos como los cambios de temperatura, dolor, el prurito, sensaciones musculares y viscerales, rubor, hambre, sed, falta de aire , entre otros , son estímulos que representan el estado fisiológico de todos los tejidos del cuerpo, siendo una vía aferente homeostática (Craig, 2002).

Alimentarse es una conducta que requiere una retroalimentación constante de los cambios fisiológicos internos, debido a esto el sistema interoceptivo es fundamental durante la alimentación para procesar la información homeostática y su impacto emocional (Miranda, 2012). El consumir alimentos podría parecer una tarea común que se lleva a cabo debido a la sensación de hambre o sed, cuya respuesta debería ser buscar la saciedad a dichas sensaciones, sin embargo, dentro de ésta conducta se despliega una variedad de procesos fisiológicos y cognitivos (como la memoria, la toma de decisiones, etc.), cuyo objetivo es mantener un balance de los requerimientos del organismo para tener un correcto funcionamiento (Miranda, 2012).

1.-Percepción de los sabores

El sentido del gusto otorga a los animales la capacidad de detectar, discriminar y seleccionar los alimentos que serán ingeridos con la finalidad de mantener un equilibrio energético. En los mamíferos la decisión de ingerir un alimento no solo depende del estímulo gustativo sino también de su apariencia, olor, familiaridad, textura, temperatura y lo más importante, de sus efectos postingestivos (Simon, et al., 2006).

La percepción de un sabor inicia por la activación de células gustativas cuyos receptores están entonados para responder a una modalidad o clasificación básica del sabor: dulce, salado, amargo, ácido o umami, que son modalidades detectadas gracias a la identidad molecular que las caracteriza, por ejemplo: lo dulce con carbohidratos, lo salado con iones y minerales, lo amargo con alcaloides, lo ácido con ácidos; esta interacción química tiene lugar en los receptores específicos distribuidos a lo largo de toda la lengua, el paladar y la epiglotis (Miranda, 2011).

La identidad química y la concentración de las modalidades gustativas es información que debe ser llevada hacia el sistema nervioso central a través de diferentes nervios. En el paladar y la parte anterior de la lengua los receptores gustativos están inervados por las ramas del nervio facial (VII): chorda tympani y la rama superior petrosal, respectivamente. En la epiglotis, el esófago y la parte posterior de la lengua los receptores gustativos están inervados por la rama lingual del nervio glossofaríngeo (IX) y la rama superior laryngeal del nervio vago (X), estas dos ramas median principalmente la ingestión o el rechazo de los alimentos (Simon et al., 2006; Smith & Lemon, 2007).

La percepción del sabor es entonces un proceso neural distribuido que integra información del gusto especializado, las fibras orosensoriales y las gastrointestinales para ser transmitida hacia el cerebro con la finalidad de que el organismo participe en comportamientos de alimentación adecuados (Simon et al., 2006; Miranda, 2011).

2.-Procesamiento central del gusto

El reconocimiento de los sabores va más allá de la codificación de las modalidades gustativas, la participación de neuronas que responden o entonan de forma más amplia es necesaria para la integración de la información variada que necesita ser evaluada, comparada y catalogada. Estas neuronas se ubican en las áreas cerebrales encargadas de procesar e integrar aspectos más complejos del sabor e información diversa y de compararla con información adquirida en experiencias previas (Miranda, 2011).

El estudio de las vías neuronales por las cuales se transmiten las señales del sabor, así como las señales viscerales han sido estudiadas bajo diferentes enfoques. En general las áreas con una función esencial durante la formación de la memoria del sabor son (figura 1): el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo parabraquial (NPB), el núcleo basal magnocelular (NBM), la amígdala y la corteza insular (CI), otras estructuras como el núcleo accumbens (NAcc), la corteza perirrinal (PC) y la corteza prefrontal medial (mPFC) tienen una participación importante en la formación de la memoria gustativa (Núñez-Jaramillo, 2010).

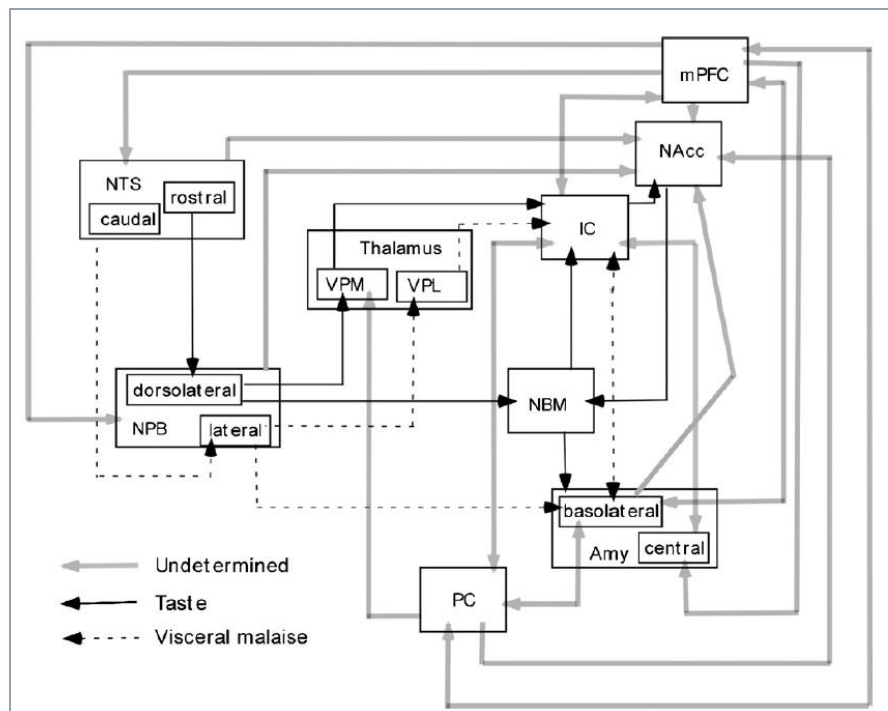


Figura 1. Vías neuronales estudiadas en diferentes modelos animales que están involucradas en el procesamiento del sabor y de estímulos viscerales durante la formación de la memoria gustativa, así como otras vías neuronales cuyo papel aún no se ha determinado pero que se piensa podrían estar participando. Amy, amígdala; PC, corteza perirrinal; NPB, núcleo parabraqueal; NBM, núcleo basal magnocelular; Thalamus, tálamo; IC, corteza insular; NAcc, núcleo accumbens; mPFC, corteza prefrontal medial; NTS, núcleo del tracto solitario (modificado de Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

Cuando las ramas de los nervios facial, glossofaríngeo y vago han sido activadas transmiten esta información a la parte rostral del núcleo del tracto solitario, el cual es el primer relevo sináptico de la información gustativa a nivel central y recibe proyecciones del núcleo central de la amígdala (CeA). Las neuronas del NTS proyectan de forma ipsilateral hacia el núcleo parabraquial del puente (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010) el cual es la segunda estación de relevo de ambas vías, la gustativa y la visceral. El subnúcleo medial del PBN recibe proyecciones del área gustativa de la parte rostral del NTS mientras que el subnúcleo lateral del PBN recibe proyecciones del área visceral de la parte caudal del NTS (Miranda, 2012).

El PBN es considerado una de las áreas de procesamiento central con un papel crucial en la asociación de estímulos durante la formación de la memoria aversiva, es decir en este relevo la memoria gustativa interactúa con las señales de malestar visceral (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010). Además tiene eferencias hacia la amígdala central y la basolateral, el hipotálamo lateral y la base del estriado, las funciones de esas áreas límbicas pueden estar relacionadas con los aspectos motivacionales y hedónicos de las conductas de alimentación y consumo de líquidos (Yamamoto, 1984).

El tálamo, que es la tercera estructura activada en la ruta del sabor, donde la codificación esencial de los cinco gustos básicos activa específicamente algunas neuronas, pero muchas otras también responden en conjunto a distintas modalidades o estímulos, como el olor, la textura, etcétera (Miranda, 2011).

La actividad colinérgica del núcleo basalis magnocelularis es requerida durante las etapas tempranas de la formación de la memoria gustativa, independientemente del componente hedónico del sabor, además modula la liberación de ACh en la CI durante el consumo de un sabor novedoso (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

La estructura implicada en el procesamiento emocional con un papel importante en la formación de memorias aversivas es la amígdala. Durante la formación de la memoria gustativa la amígdala es modulada por diversos neurotransmisores, la actividad glutamatérgica participa en la adquisición y en la consolidación de la memoria, la noradrenalina modula la actividad de la amígdala durante la codificación y la expresión de memorias emocionales. También existe abundante evidencia acerca de su participación en la formación de la memoria aversiva al sabor y su conexión con la CI (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

Por último, la CI funciona como una estructura integradora; ya que sus neuronas son capaces de procesar múltiples propiedades gustativas incluyendo las respuestas sensoriales y hedónicas, viscerales y nociceptivas, el procesamiento de lo nuevo, la ingestión, la motivación y las respuestas temporales (Miranda, 2012).

La CI se encuentra conectada con diferentes sistemas de neurotransmisión los cuales son capaces de liberar neurotransmisores como histamina (Haas et al., 2008), ácido gamma-aminobutírico (GABA), acetilcolina (ACh) y glutamato; tiene conexiones en ambos sentidos con la amígdala, aferencias desde el núcleo basal magnocelular y el tálamo, conexiones con el núcleo NPB y eferencias hacia el núcleo del tracto solitario. La CI es una estructura fundamental en la formación de la memoria gustativa, tanto aversiva como apetitiva, ya que algunos estudios han demostrado que su inactivación temporal o lesión afecta los procesos de adquisición y evocación durante el CAS (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

3.-Memoria y aprendizaje

La habilidad que tienen los organismos para responder a los cambios que suceden en su entorno ha evolucionado de tal forma que añadió una nueva dimensión a la capacidad de adaptación, siendo su base más flexible la evolución de la capacidad del organismo de variar sus respuestas conductuales de acuerdo a los requerimientos ambientales, es decir, de aprender (McGaugh, 1973). El aprendizaje puede hacer

rápidamente lo que la evolución solamente puede hacer de forma lenta, mientras que la adaptación a una condición ambiental puede llevar generaciones para lograrlo a través de la evolución, un organismo que puede aprender es capaz moldear su propio comportamiento para ajustarse a una variedad de condiciones ambientales (McGaugh, 1973).

Aprendizaje es definido como un cambio más o menos permanente en la conducta producido por una experiencia, y que no es debido a la maduración, fatiga, drogas y/o enfermedad (Hilgard et al., 1969), mientras que la memoria es el proceso por el cual la información derivada de una experiencia persiste a través del tiempo y es recuperada durante el desempeño de alguna acción (Kandel et al., 2013; Crowder, 2015).

Existen principios abstractos acerca de cómo debe ser analizado el proceso de aprendizaje y memoria, estos principios proveen un contexto organizado de aproximación a la teoría: etapa de análisis, codificación del análisis y análisis de la tarea. La etapa de análisis denota la separación del proceso de aprendizaje y memoria en 3 fases:

1. Adquisición: Colocar la información en el almacén de la memoria en primer lugar. Este proceso solamente puede ser estudiado a través del desempeño en una prueba de la memoria.
2. Retención: La persistencia de la memoria a través del tiempo
3. Recuperación: la extracción de la información almacenada cuando se necesita.

Tradicionalmente el término aprendizaje ha sido asignado a las operaciones experimentales que se forman principalmente en la fase de adquisición y el término memoria en la retención y recuperación de la información.

Durante la codificación se analizan los aspectos de las experiencias que son grabados en la memoria, y en el análisis de la tarea se descomponen las habilidades complejas en habilidades constitutivas más simples, en la creencia de que este subconjunto de habilidades pueden ser más manejables en teoría que la tarea global (Crowder, 2015).

4.-Clasificación de la memoria

El aprendizaje y la memoria son funciones cognitivas que abarcan una variedad de subcomponentes que pueden ser clasificados en diferentes formas, ya sea en la dimensión temporal o diferenciar los tipos de memoria en virtud de su contenido y los mecanismos de adquisición. Dado que existen muchas interacciones y traslapes entre estos subcomponentes, resulta complicado obtener una taxonomía completamente satisfactoria (Brem et al., 2013).

Por lo tanto, basándose en el tiempo que dura almacenada la información adquirida se puede hacer una clasificación en tres tipos básicos: memoria inmediata, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Purves et al., 2018).

Memoria inmediata

También llamada memoria sensorial (Goio, Federman, Navarro, Marisa, & Würschmidt, 2012), por definición es la habilidad del cerebro para mantener la experiencia en curso por un segundo o menos (Purves et al., 2018). Comprende la capacidad habitual de mantener en la mente experiencias durante fracciones de segundo. En ésta memoria se almacena la información que proviene del medio externo (sonidos, olores, imágenes, sabores, etc.) que ingresa al sistema a través de los órganos sensoriales para su reconocimiento y clasificación en base a las características físicas de los estímulos (Goio et al., 2012). La memoria sensorial a su vez se divide en memoria icónica y memoria ecoica (Wright et al., 2012). En el sistema de memoria visual (icónica), las imágenes pueden permanecer hasta medio segundo incluso si la información visual se presenta por un período de tiempo muy corto, es posible recordar ciertos aspectos de esa información, lo que sugiere que se puede utilizar el rastro de la información que queda en la memoria. La memoria ecoica (auditiva) es similar a la memoria icónica, en que el estímulo persiste durante más tiempo del que se presenta, pero con una capacidad menor debido al procesamiento secuencial (Wright et al., 2012).

Memoria a corto plazo

Es la habilidad de sostener y manipular información en la mente de segundos a minutos mientras está siendo usada para lograr cierto objetivo. Está estrechamente relacionada a un tipo especial de atención que opera en representaciones internas más que en entradas sensoriales como tales. Aunque es estudiada en el contexto de memoria declarativa, la memoria a corto plazo opera en la adquisición y almacenamiento final de información no declarativa (Purves et al., 2018).

-Memoria de trabajo. No es completamente distinta a la memoria a corto plazo y generalmente se ha visto como la combinación de múltiples componentes que trabajan juntos (Cowan, 2009). Se refiere al mantenimiento activo y temporal y a la manipulación de información necesaria para realizar tareas complejas, mientras se ignora información irrelevante (Brem, et al., 2013). Éste tipo de memoria permite realizar varias actividades de manera simultánea, seleccionando, utilizando y descartando información necesaria en un instante e inútil en el siguiente (Goio et al., 2012).

Memoria a largo plazo

Esta categoría implica la retención de información en una forma más permanente de almacenamiento por días, semanas, o incluso toda una vida. Información particularmente significativa de la memoria inmediata o a corto plazo puede ir a la de largo plazo (Purves et al., 2018). Diversos estudios han demostrado que la memoria a largo plazo puede dividirse en varias categorías, por ejemplo, en base a la forma de expresar la información adquirida cuando se recupera encontramos la memoria declarativa (o explícita) y la memoria no declarativa (Goio *et al.*, 2012). Aunque algunos investigadores están a favor de una clasificación diferente para el resto

de los animales (no humanos), estudios sugieren que procesos similares de memoria operan en todos los mamíferos y estas funciones son llevadas a cabo por circuitos neurales homólogos (Purves et al., 2018).

- **Memoria declarativa.** Corresponde a memorias explícitas que son conscientes y verbalmente transmitibles (Brem et al., 2013). Esta memoria contiene la información aprendida sobre los eventos, lugares y objetos (tiempo, lugar y circunstancia) y los conceptos, a la vez que dicha información es evocada de manera consciente (Goio et al., 2012). En esta memoria encontramos dos subdivisiones: la memoria episódica, que se refiere a la información de acontecimientos de la vida propia, permite recordar eventos puntuales, y la memoria semántica, donde se almacena la información que no requiere de un contexto espacio-temporal específico (Romero & Hernández, 2011).

- **Memoria no declarativa.** Representa un tipo de memoria implícita no verbal que se adquiere de modo subconsciente, (Brem et al., 2013) implica hábitos, habilidades y asociaciones, cabe mencionar que la gran mayoría de los modelos animales están contenidos en ésta clasificación (Goio et al., 2012).

Es necesario tener cuidado al afirmar que la memoria declarativa es adquirida de forma explícita y la no declarativa de forma implícita ya que se está haciendo una simplificación poco precisa pues algunas memorias declarativas pueden ser adquiridas subconscientemente (Ej., memorias de un evento emocional intenso), y las memorias no declarativas pueden ser adquiridas conscientemente (Ej., aprendizaje de movimientos motores al practicar deporte o el uso de algún instrumento musical) (Brem et al., 2013).

4.1 Memoria del sabor

La memoria del sabor está clasificada dentro de las memorias sensoriales ya que almacena información proveniente del medio externo para su reconocimiento y clasificación (Goio et al., 2012).

El reconocimiento de un sabor es una respuesta instintiva innata que usualmente incluye procesos de recuerdo de experiencias (Núñez-Jaramillo et al., 2010), después de una o varias exposiciones al sabor de un alimento, este puede ser memorizado, especialmente si hubo una asociación con las sensaciones placenteras o displacenteras (valor hedónico) y una vez que los atributos del estímulo han sido detectados, la memoria del sabor permite asociar los estímulos con las consecuencias postingestivas (Núñez-Jaramillo et al., 2010). Esta memoria es una función fisiológica muy importante en los organismos, especialmente en los omnívoros pues permite incluir en la dieta una variedad de alimentos basándose en sus sabores (Bermúdez-Rattoni, 2007) y permite discriminar entre los que son seguros y los que son tóxicos como mecanismo de supervivencia (Bermúdez-Rattoni, 2004).

La codificación de la memoria del sabor inicia cuando los componentes químicos del alimento hacen contacto con células gustativas de la cavidad oral, se ha demostrado que la percepción del sabor inicia aproximadamente 200 milisegundos después de la presentación de un sabor y por consiguiente inicia un proceso de transducción para este nuevo sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004). La formación de la memoria del sabor, como muchas otras memorias, requiere de la activación neuronal que induzca cambios estructurales y funcionales en los circuitos de redes neuronales. Mediante diversos estudios se ha demostrado un amplio rango de mecanismos celulares y moleculares que contribuyen a la formación de esta memoria (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

Cuando los animales se encuentran con un sabor novedoso es común observar cierto grado de indecisión para consumirlo, mostrando un consumo reducido, a esto se le conoce como respuesta neofóbica. Si el sabor no tiene consecuencias negativas se reconoce como un sabor seguro, llevando a un incremento en su consumo (atenuación

de la neofobia), pero si el sabor es asociado con malestar, el alimento será rechazado en la próxima exposición, desarrollando así una aversión duradera, y el sabor por si solo se convierte en una señal aversiva (Bermudez-Rattoni, 2014).

En resumen, la memoria del sabor incluye el reconocimiento de sabores además de diferentes características asociadas con el sabor, lo cual en términos de adaptación evolutiva es necesario para una selección adecuada de alimentos, que ayudará a determinar la probabilidad de supervivencia y reproducción (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

5. Modelos de estudio

Los modelos experimentales en animales sobre los procesos de formación de memoria han demostrado que la codificación, el almacenamiento y la recuperación de información se deben a la actividad neuronal plástica en una red distribuida que comprende muchas áreas cerebrales. Los modelos empleados para estudiar la memoria del sabor tienen la ventaja de estar fundamentados en información sustancial ya conocida sobre las estructuras neuronales y los circuitos involucrados en la ruta central activada por el gusto o la estimulación visceral (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

Son dos los modelos experimentales de formación de la memoria más utilizados en el laboratorio: el aprendizaje apetitivo o de preferencia y el aprendizaje aversivo; ambos modelos permiten estudiar por separado las etapas de adquisición y consolidación de la memoria y permiten evaluar la respuesta hedónica o de aversión hacia el estímulo (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

La respuesta hedónica natural a un sabor determinado puede analizarse fácilmente observando los movimientos orofaciales de los animales en respuesta a un nuevo sabor, y cuantificando su consumo, sin embargo, si al consumo le sigue un malestar gástrico, los movimientos orofaciales cambian y el consumo disminuye significativamente. Se ha propuesto que la conducta apetitiva y la aversiva son los

extremos de un mismo continuum (Fig 2 a,b). Varios experimentos han demostrado que se requiere un período de 2 a 4 horas en el que no haya consecuencias nocivas de la ingesta de alimentos para clasificar un estímulo gustativo como seguro o neutral (Bermúdez-Rattoni, 2004).

El CAS es un paradigma de aprendizaje en el cual un sabor novedoso (estímulo condicionado, ES) es asociado con malestar gástrico (estímulo incondicionado, EI). Después de una única presentación de los estímulos los animales aprenden y evitan consumir el sabor asociado con el malestar (Fig 2 a,b), el periodo inter estímulo puede ser de 1-4 horas y aun así generar una memoria robusta (Miranda et al., 2003).

Es frecuente que en los modelos experimentales se use sacarina en solución como estímulo novedoso y un agente farmacológico que puede ser administrado vía oral o mediante inyección intraperitoneal (i.p) para provocar malestar gástrico transitorio, comúnmente el Cloruro de Litio (i.p) cumple esta función (Bures et al., 1998).

El CAS como modelo de estudio permite evaluar por intervalos separados las diferentes etapas de la formación y la recuperación de la memoria aversiva. Adicionalmente pueden realizarse variaciones al modelo: diferente sabor novedoso; la vía de presentación del sabor puede ser en exposición a una sola botella, múltiples botellas con diversos sabores o infusiones intraorales a través de una cánula, también los tiempos de exposición e incluso el tiempo inter estímulo pueden variar según el protocolo a seguir. Es importante que al interpretar los resultados se tomen en cuenta las adaptaciones al modelo debido a que la liberación de neurotransmisores y la actividad celular puede cambiar significativamente dependiendo del método usado (Miranda, 2012).

Es relevante mencionar que los modelos de estudio previamente analizados tienen como parte de la metodología un horario de privación de consumo de líquidos que puede ser hasta de 24 horas, llevando a cambios en los estados motivacionales para la búsqueda de líquidos, y a procesos de atención relacionados a su consumo.

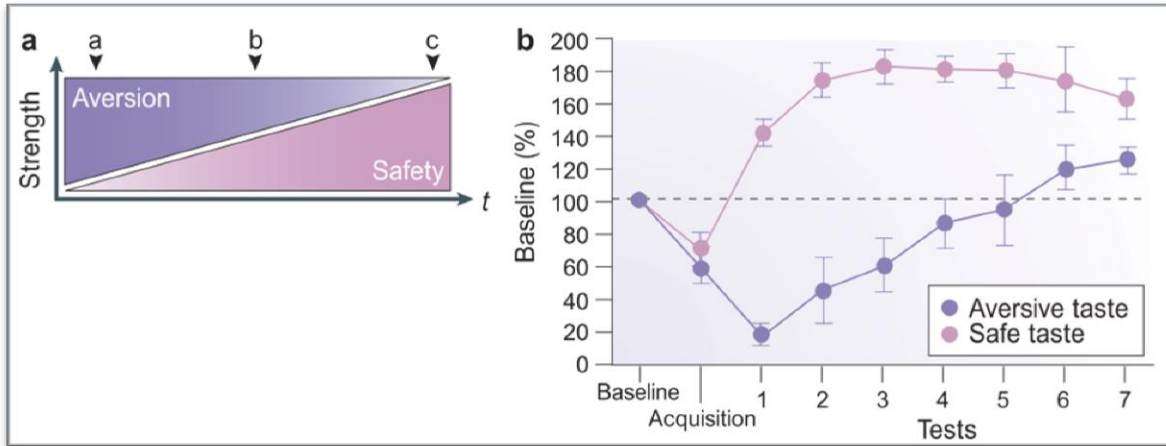


Figura 2. a. Cuando un animal ingiere una sustancia nueva que es inofensiva, gradualmente aprende que su consumo es seguro. Las flechas representan los posibles inicios del malestar, por ejemplo, si el malestar es inducido al tiempo (t) “a”, la rata desarrollará una mayor aversión que si el malestar se induce al tiempo “b”. Una vez que el periodo en el que se puede establecer la asociación aversiva termina (triángulo morado), los animales desarrollarán atenuación de la neofobia (triángulo rosa), incluso si el malestar ocurre en el tiempo “c”. **b.** Consumo de una solución de sacarina 0.25% (expresado en porcentaje de línea base de agua) consumida durante la primera presentación (adquisición) y presentaciones posteriores. Existe una disminución en el consumo (neofobia) durante la primera presentación de sacarina. Los puntos morados representan un grupo que recibió un estímulo inductor de malestar (inyección i.p. de LiCl) 15 minutos después de la primera exposición a la sacarina, desarrollando CAS. Los puntos rosas representan a un grupo que muestra atenuación de la neofobia, ya que los animales no recibieron el LiCl (modificado de Bermúdez-Rattoni *et al.*, 2004).

6.- Motivación

“Motivación” se refiere al fortalecimiento de un comportamiento y especialmente a las fuentes de esta fuerza que mantienen dominantes temporalmente a un conjunto particular de respuestas sobre otras y dan cuenta de la continuidad y dirección del comportamiento. (Hebb, 1955). Por otro lado, Escobar y Aguilar, (2002) mencionan que la motivación implica a los estados internos que dirigen al organismo hacia “metas” o fines determinados y le confieren intensidad a la conducta.

Todos los animales necesitan de motivación para satisfacer sus necesidades básicas, incluyendo alimento, agua, sexo o interacción social, necesidades que son requerimiento para la supervivencia, pero en todos los casos estos objetivos o metas

deben alcanzarse en cantidades y tiempos apropiados. Es entonces que el impulso motivacional debe ser modulado como una función tanto de los estados internos como de las condiciones ambientales externas (Simpson, 2016).

Una conducta motivada u orientada a una meta requiere que los componentes individuales se organicen en una secuencia específica, Swanson y Mogenson (1981) sugieren tres estados secuenciales que son comunes a una variedad de conductas adaptativas u orientadas a un objetivo (Escobar & Aguilar, 2002) :

Fase de iniciación: puede ser inducida por deficiencias fisiológicas, señales sensoriales exteroceptivas o información cognoscitiva.

Fase de procuración: consiste en la excitación o alertamiento general asociado con la ejecución de conductas de desplazamiento, la información sensorial exteroceptiva, la utilización de experiencias pasadas (aprendizaje) y las respuestas viscerales que regulan los procesos homeostáticos.

Fase consumatoria: incluye la realización de respuestas motoras preprogramadas (como lamer, masticar y deglutir, en la conducta de ingesta), la retroalimentación sensorial (como gusto y olfato), los mecanismos de saciedad que están involucrados en la terminación de la respuesta, al igual que de reforzamiento.

En resumen la conducta dirigida hacia una meta inicia por estímulos internos y externos e involucra conductas de desplazamiento hacia la meta, aumento del nivel de alertamiento y orientación del organismo en direcciones que lo acercan o lo alejan de metas específicas (Miñana-Solis et al., 2009).

Se ha sugerido que la motivación tiene una estructura jerárquica en el sentido de que factores como el ciclo sueño-vigilia pueden afectarla confiriéndole un orden temporal a los procesos fisiológicos y a la conducta (Escobar, 2002; Simpson, 2016).

Muchos factores influyen en la motivación, incluidos los estados fisiológicos internos del organismo, las condiciones ambientales actuales, así como las experiencias del organismo. Para que estos factores puedan influir en la motivación, la

información debe evaluarse y codificarse, y al menos que los motivos sean nuevos, la valoración y codificación se verá afectada por los procesos de aprendizaje y recuperación. En la figura 3 se describe de manera simplificada cómo se procesa e integra dicha diversidad de información para generar motivación como resultado de un análisis costo-beneficio que abarca todos los factores y procesos que pueden tener una influencia potencial (Simpson, 2016).

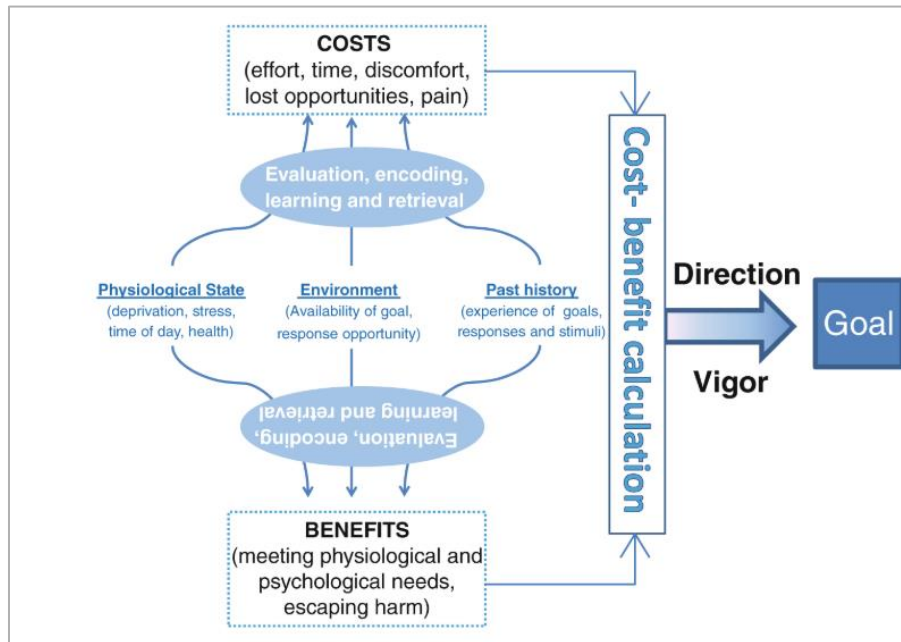


Figura 3. Diagrama simplificado de los factores y procesos involucrados en la motivación. Se coloca el análisis de costo-beneficio en el centro del concepto de motivación. Se ha demostrado que tres categorías principales de factores influyen en la motivación: el estado fisiológico del individuo, el medio ambiente y la historia. La información sobre las tres categorías de factores estará sujeta a una serie de procesos (representados dentro del óvalo azul), incluida la evaluación y la codificación. En casi todas las circunstancias, el motivo, el medio ambiente y el estado fisiológico no serán nuevos; por lo tanto, la información también se someterá a procesos de aprendizaje y recuperación. Todos los procesos combinados dan como resultado la ponderación de todos los costos y beneficios relacionados con el motivo, y la salida del cálculo de costo-beneficio impactará en la dirección y el vigor de la acción que se toma hacia la meta.

El estudio de la motivación presenta dificultades ya que no es posible observar la motivación de manera directa o aislada, esta debe ser inferida evaluando cambios en la conducta asociados con estímulos internos o externos y con procesos de aprendizaje (Hebb, 1955).

6.1 Motivación y aprendizaje: sed y hambre como reguladores de aprendizaje

El hambre y la sed son motivaciones primarias innatas que surgen a partir de una privación corporal ya que su satisfacción es esencial para la supervivencia del individuo o de la especie (Escobar & Aguilar, 2002).

Varios estudios experimentales en animales reportan que entre más sediento o hambriento esté el animal, estará más motivado para adquirir líquidos o alimentos, respectivamente (Salary, 1994). Los modelos experimentales en animales comúnmente consideran protocolos de restricción de líquidos o de alimentos durante el desempeño de diferentes tareas conductuales o de aprendizaje (Toth & Gardiner, 2000).

La conducta alimenticia debe estar coordinada con las condiciones ambientales, tales como el ciclo luz-oscuridad y la disponibilidad del alimento, así como los requerimientos fisiológicos internos, como son mantener las funciones gastrointestinales y balance energético (Poulin & Timofeeva, 2008). Cuando la disponibilidad de alimentos está restringida a un horario de pocas horas en un tiempo determinado durante el día, los animales desarrollan un ritmo circadiano de entrenamiento alimenticio y muestran un comportamiento llamado “actividad alimenticia anticipada” que se manifiesta dentro de las horas precedentes al acceso al alimento por alerta (arousal) y un incremento en la exploración y en la locomoción (Stephan, 2001). En este proceso el animal aprende a modificar sus patrones de ingestión para ajustarse a la oportunidades de disponer de alimento o líquidos a través de los días (Toth & Gardiner, 2000).

Los efectos que tiene la restricción de líquidos o de alimento en el desempeño de diferentes tareas conductuales han sido poco evaluados, las evidencias que existen indican la existencia de diferencias en la ejecución de tareas de aprendizaje cuando lo que se restringe es agua o alimento. Komaki (2004) realizó experimentos para evaluar los efectos diferenciales de hambre y la sed en la formación de la memoria. En un experimento de laberinto radial las ratas privadas de agua dominaron la tarea más

rápido que el grupo privado de alimento, llegando a la conclusión de que la sed constituye una mejor condición para la retención en el proceso aprendizaje-memoria.

Si hablamos del efecto que tiene la libre disposición de líquidos o la restricción en el aprendizaje, Ángulo (2018) sugiere que la privación conduce a un estado interno diferente para procesar los estímulos y por consecuencia los resultados en el aprendizaje podrían mostrar diferencias.

En la década de los 70's Grote & Brown (1973) demostraron la influencia que tiene el grado de saciedad de líquidos en el CAS. Ellos encontraron que la extinción de la memoria aversiva fue más rápida en ratas pardas bajo una alta privación (23 horas) del consumo de líquidos, en comparación con aquellas con un nivel bajo de privación (10 horas), llegando a la conclusión de que el consumo del sabor condicionado sin la presentación del malestar durante la extinción, podría estar dando una mayor actualización acerca de las consecuencias postingestivas de la sacarina en las ratas altamente privadas.

Estudios recientes encontraron que es posible realizar un CAS en ratas no privadas de alimento donde el estímulo condicionado es un sabor novedoso en presentación sólida y el malestar visceral es provocado por el movimiento rotatorio voluntario en una rueda para entrenamiento de roedores, señalando que estos hallazgos pueden contribuir a la investigación básica del aprendizaje y la memoria como una técnica alternativa para estudiar el CAS minimizando el malestar provocado en los animales (Nakajima, 2018).

7.-Diferencias debidas al sexo en el aprendizaje y la memoria

La decisión de plantear proyectos que incluyan ambos sexos debe estar sustentada en la respuesta a ciertas preguntas, tal como lo afirman Becker y Koob (2016). Hay que cuestionarse ¿por qué machos y hembras deberían responder de manera diferente a determinadas condiciones experimentales?, además de considerar la naturaleza del rasgo o fenómeno que queremos evaluar, preguntarse también si ¿hay algo en la historia evolutiva y/o en las estructuras sociales actuales de las especies bajo investigación, causantes de dichas diferencias?.

Al estudiar algún fenómeno en hembras existe la creencia de que necesitamos empezar por observar los efectos del ciclo estral en una función particular o conducta debido a la asunción de que las hembras son intrínsecamente más variables que los machos, observaciones que conllevan una mayor inversión de tiempo y recursos. Esta última consideración ha tenido un gran impacto en el trabajo científico dejando subrepresentado al sexo femenino dentro de los estudios con ratios machos versus hembras de 3.7-1 en estudios de fisiología y de 5:1 en estudios de farmacología y neurociencia (Beery & Zucker, 2011).

Afortunadamente, metaanálisis de estudios biomédicos y de neurociencia (Becker, Prendergast, & Liang, 2016; Prendergast, Onishi, & Zucker, 2014) encontraron que incluso cuando ratas o ratones hembra se emplean en experimentos sin considerar la fase del ciclo estral, sus datos no son más variables que aquellos obtenidos en machos, esto aplica para mediciones conductuales, electrofisiológicas, neuroquímicas e histológicas.

Antes de hablar explícitamente de las diferencias debidas al sexo en el aprendizaje y la memoria es importante considerar que existen algunas diferencias neurobiológicas que son relevantes para estas funciones y que existen en múltiples niveles de análisis, desde la neuroanatomía hasta los mecanismos moleculares que subyacen a las propiedades de los circuitos (Andreano & Cahill, 2009).

A continuación, se describen de forma puntual los resultados de diferentes tareas de aprendizaje que han sido evaluadas en ambos sexos con la observación de la posible participación de las hormonas gonadales en tales hallazgos.

Reconocimiento de objetos

El único estudio de localización de objetos que evalúa las diferencias sexuales en roedores indica que las hembras superan significativamente en esta tarea a los machos (Sutcliffe, Marshall, & Neill, 2007). Además, la aplicación exógena de las hormonas ováricas estradiol y/o progesterona, mejoraron el desempeño de esta tarea en hembras ovariectomizadas, semejante a los resultados obtenidos en ratas que se encuentran en la fase receptiva sexual (estro conductual) (Walf, Rhodes, & Frye, 2006) lo cual sugiere que existe una diferencia debida al sexo que puede ser dependiente de los efectos de las hormonas gonadales estradiol y progesterona.

Condicionamiento clásico del parpadeo

Durante este condicionamiento se observan diferencias debidas al sexo (Beylin et al., 2001; Solomon, Vander Schaaf, Thompson, & Weisz, 1986). Las hembras superan a los machos (Bangasser & Shors, 2007; Christina Dalla, Papachristos, Whetstone, & Shors, 2009; Hodes & Shors, 2005; Leuner, Mendolia-Loffredo, & Shors, 2004; Shors & Miesegaes, 2002; Wood & Shors, 1998) y comienzan a aprender a cronometrar el parpadeo más pronto que los machos y la diferencia es más evidente el primer día de tratamiento. De alguna manera ellas están aprendiendo a anticipar el inicio del estímulo incondicionado y como consecuencia pueden emitir respuestas en un mejor tiempo (Bangasser & Shors, 2007; Christina Dalla et al., 2009; Waddell, Bangasser, & Shors, 2008). Las diferencias son evidentes en todo el ciclo estral y no solamente dependen de la presencia de estrógenos (Waddell et al., 2008).

Condicionamiento al miedo

Se ha demostrado que las hembras tienden a expresar menos la respuesta de congelamiento que los machos durante la adquisición (Maren et al., 1994; Pryce et al., 1999). En general, los machos superan a las hembras en los paradigmas de condicionamiento al miedo. Las diferencias debidas al sexo en este condicionamiento son contrastantes con las observadas con la respuesta condicionada del parpadeo posiblemente debido al tipo de tarea y a la variable usada para evaluar la respuesta condicionada. En el paradigma de condicionamiento al miedo, factores no asociativos, como el miedo, podría interferir con el aprendizaje, en cambio en el paradigma de condicionamiento al parpadeo, el miedo podría estar minimizado (Shors & Servatius, 1997).

Condicionamiento operante

En la tarea de evitación unidireccional y en la bidireccional las hembras escapan más pronto que los machos durante los primeros ensayos (Christina Dalla, Edgecomb, Whetstone, & Shors, 2008; Shors et al., 2007). Las hembras también superan a los machos en otro tipo de condicionamiento operante, en el cual necesitan evitar un choque presionando una palanca (Heinsbroek, van Oyen, van de Poll, & Boer, 1983; Van Oyen, Walg, & Van De Poll, 1981). La remoción de los ovarios no previene las diferencias debidas al sexo (Beatty & Beatty, 1970; Christina Dalla et al., 2008; Levine & Broadhurst, 1963; Van Oyen et al., 1981).

La testosterona ha sido propuesta por tener propiedades ansiolíticas lo cual puede contribuir a la estrategia pasiva que las ratas macho eligen en respuesta al choque eléctrico (Toufexis, Myers, & Davis, 2006).

En otra tarea los machos ejecutan mejor que las hembras al presionar una palanca para recibir un estímulo positivo (van Haaren, van Hest, & Heinsbroek, 1990), se ha observado que las hembras se enganchan en otras actividades que no son presionar la palanca.

Parece ser que, en tareas de evitación activa, la testosterona juega un papel más importante que los estrógenos en la emergencia de diferencias debidas al sexo,

mientras que en los condicionamientos de parpadeo y al miedo, el estradiol y la progesterona en hembras son más importantes. Estas tareas de aprendizaje difieren en el hecho de emitir una respuesta voluntaria con respecto a los paradigmas de condicionamiento clásico en los que se emite una respuesta incondicionada obligatoria ante el estímulo que no depende de la voluntad. Entonces los dos tipos de entrenamiento son bastante diferentes en términos de la actividad volitiva y de los procesos de aprendizaje implicados (Christina Dalla & Shors, 2009).

Condicionamiento aversivo al sabor

Las diferencias debidas al sexo durante la adquisición del CAS no son aparentes, es decir la adquisición es conservada y persistente, pero si existen diferencias durante la extinción (Bethus, Lemaire, Lhomme, & Goodall, 2005; Rinker, Busse, & Riley, 2008).

Las hembras típicamente extinguen más rápido que los machos; consumirán la solución dulce en menos tiempo y lo harán en cantidades grandes, además, está reportado que la castración de machos acelera la extinción, mientras que la ovariectomía no tiene consecuencias (Chambers & Sengstake, 1976; Chambers, Sengstake, Yoder, & Thornton, 1981; Randall-Thompson & Riley, 2003).

Al administrar testosterona se incrementa la duración de la extinción en ambos sexos, sugiriendo un rol activacional en esta tarea (Chambers & Bolles, 1976; Chambers et al., 1981). Cuando el estradiol se administra en ratas hembra ovariectomizadas antes de los estudios de extinción, se acelera la extinción de la aversión (Chambers & Sengstake, 1976; Yuan & Chambers, 1999a, 1999b). Entonces el efecto activacional de las hormonas parece influenciar la extinción de la respuesta aprendida dentro del paradigma de CAS. El desempeño de esta tarea está influenciado por las diferencias debidas al sexo en la preferencia por sabores dulces y las propiedades aversivas o de recompensa en los componentes usados (Bethus et al., 2005; Busse, Freeman, & Riley, 2005; Clarke & Ossenkopp, 1998; C. Dalla et al., 2005).

La reactividad al sabor, las propiedades recompensantes y las respuestas aversivas son influenciadas por las hormonas sexuales (Clarke & Ossenkopp, 1998) y

como resultado, es difícil estudiar las diferencias debidas al sexo en el CAS, aunque existan. Complicando más la situación se tiene que la administración exógena de hormonas sexuales como el estradiol presenta propiedades inductoras de malestar, las cuales en turno pueden influenciar el CAS (Yuan & Chambers, 1999a). Como resultado, es difícil estudiar las diferencias debidas al sexo. Lo anterior nos lleva a la conclusión de cuán importante es considerar el tipo de aprendizaje, porque en este caso representa una manera en que el animal aprende a seleccionar una dieta disponible y adecuada en su ambiente (Choleris et al., 2000), lo cual tiene un valor adaptativo, independiente del sexo.

Para finalizar no se puede esperar una dependencia total de los procesos de aprendizaje en una o en unas cuantas hormonas, porque el valor adaptativo del aprendizaje es muy grande. Machos y hembras de todas las especies se someten a cambios drásticos en la disponibilidad de las hormonas a lo largo de la vida, entonces este no puede verse masivamente influenciado por los niveles de hormonas (Hyde, Lindberg, Linn, Ellis, & Williams, 2008).

8.-Anatomía funcional de la corteza insular

La CI también llamada isla de Reil está expuesta en la superficie lateral de los hemisferios, por encima de la fisura rinal en especies lisencefálicas como en los ratones y las ratas. Los límites anatómicos de la CI abarcan desde la corteza frontal lateral hasta la corteza perirrinal en dirección rostrocaudal y desde el borde ventral de la corteza somatomotora y la corteza piriforme en dirección dorso ventral (Bermudez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017).

En el modelo de rata las coordenadas son: antero-posterior +1.7 mm, +1.00 y -0.40 mm respectivamente con respecto de Bregma (Paxinos, 2013).

La CI a su vez ha sido dividida en tres áreas principales que difieren en su citoarquitectura y cuya terminología alude a la pérdida progresiva de la capa granular: el

área granular dorsal con una estructura de 6 capas, el área disgranular medial constituida por 4 capas y el área agranular ventral de estructura trilaminar (Figura 4 A y B). Las tres subdivisiones están interconectadas a lo largo de los ejes dorsoventral y rostrocaudal (Bermudez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017).

El área granular está relacionada con las áreas corticales que procesan los estímulos viscerales, el área disgranular corresponde a la integración de las modalidades gustativas y finalmente se ha relacionado al área agranular con la integración multimodal autonómica y límbica; en ratas la corteza principal de percepción gustativa se encuentra en el área disgranular (Bermudez-Rattoni, 2014).

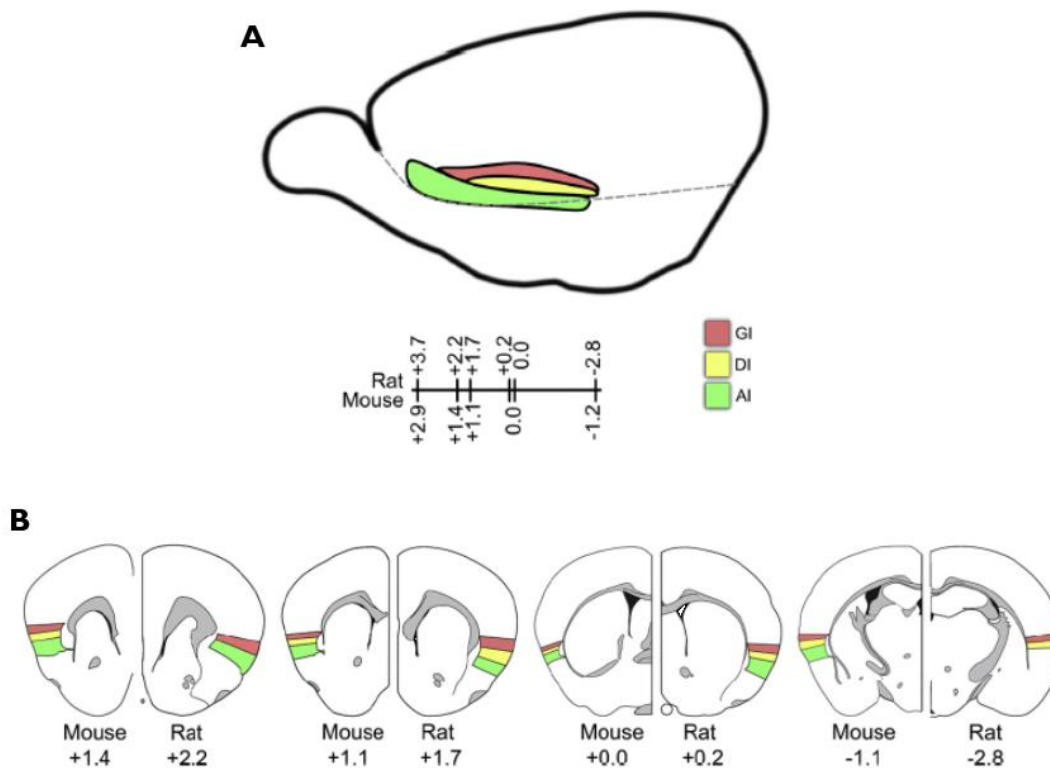


Figura 4. A Representación esquemática de la corteza insular de ratones y ratas a lo largo del surco rinal mostrando la CI granular, la disgranular y la agranular. B Representación de secciones coronales de ratón (izquierda) y rata (derecha) en diferentes cortes anteroposterior desde Bregma tomada como cero. En color rojo área granular; amarillo, área disgranular y verde área agranular (modificado de Bermúdez-Rattoni, 2014).

La conectividad de la CI involucra varios sistemas de neurotransmisión, neuronas o terminales neuronales que son capaces de liberar GABA, ACh y glutamato, entre

otros; tiene conexiones en ambos sentidos con la amígdala, aferencias desde el NBM y el tálamo, conexiones con el NPB y eferencias hacia el NTS (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

Las múltiples conexiones anatómicas de la CI hacen que tenga un papel importante en la mediación de reacciones viscerales debido a las distintas modalidades de información que recibe (Bermudez-Rattoni, 2014).

9. Histamina

La histamina es un mediador de diversos procesos fisiológicos y patológicos dentro y fuera del sistema nervioso y cuya existencia se conoce desde hace aproximadamente 50 años. Tiene un papel como estimulante endógeno de la secreción gástrica, asimismo la liberación de histamina está involucrada en la patogénesis de varias reacciones inflamatorias y en la regulación de la respuesta inmune al ser liberada por los mastocitos y basófilos, los cuales son las principales reservas celulares de histamina en los tejidos periféricos. El estudio de la participación de la histamina en las funciones cerebrales tiene relativamente poco tiempo, ahora está claro que se produce y se libera dentro del sistema nervioso central y que tiene varias funciones reguladoras (Siegel, 2006).

9.1 Metabolismo y distribución

Las neuronas histaminérgicas en el cerebro de mamíferos están localizadas exclusivamente en el TMN en el hipotálamo posterior y proyecta sus axones por todo el sistema nervioso central (Haas et al., 2008). La biosíntesis de histamina en el cerebro (Figura 5) comprende dos pasos básicos: el transporte dentro de las células del precursor L-histidina y su procesamiento por la enzima histidina descarboxilasa; posteriormente la histamina que es sintetizada en el interior de las neuronas es

transportada a vesículas por el transportador vesicular de monoaminas y liberada en las terminaciones sinápticas de las neuronas histaminérgicas (Arrang, 2007).

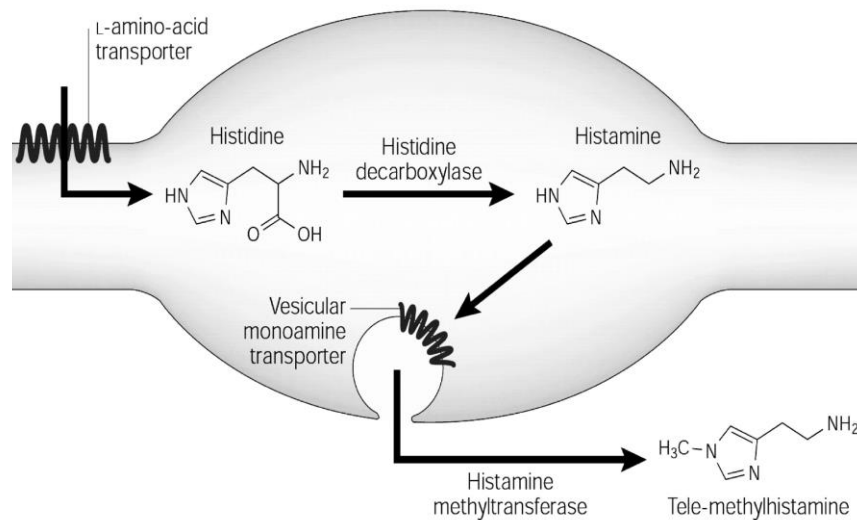


Figura 5. Síntesis y metabolismo de la histamina. La histamina es capturada en una terminal nerviosa y es descarboxilada; posteriormente es transportada en una vesícula para su liberación y metilación (modificado de Haas et al., 2008).

La inactivación de la histamina en el espacio extracelular en el sistema nervioso central es llevada a cabo a través de una metilación por la enzima Histamina N-metiltransferasa (HNMT), bloqueadores de esta enzima reducen el nivel de tele-metilhistamina e incrementan los niveles de histamina en el cerebro. La histamina muy difícilmente pasa la barrera hematoencefálica, pero HNMT también se encuentra en las paredes de los vasos sanguíneos donde la histamina contenida en la sangre y la histamina liberada por los mastocitos es metilada e inactivada. Además, un transporte en ambas direcciones desde el cerebro hacia los vasos sanguíneos puede ayudar a drenar la histamina neuronal después de una concentración excesiva. La Tele-metilhistamina en el cerebro pasa a una desaminación oxidativa a través de la monoaminoxidasa B, convirtiéndola en ácido t-metil-imidazoleacético.

9.2 Receptores histaminérgicos

Se han encontrado cuatro subtipos de receptores a histamina: H₁, H₂, H₃ y H₄; sin embargo, sólo los 3 primeros se consideran participes en la actividad cerebral (Figura 6), ya que el cuarto receptor tiende a mostrar niveles muy bajos o nulos en el cerebro de mamíferos (Arrang, 2007; Beghdadi et al., 2009). Todos pertenecen a la superfamilia de receptores tipo rodopsina acoplados a proteína G (Figura 7), cada receptor consiste en 7 dominios transmembranales con dominios prototípicos que determinan: la unión y activación específica con agonistas, el acoplamiento a las proteínas G, las modificaciones covalentes (Ej. fosforilación por proteincinasas) la homodimerización y heterodimerización, el anclaje a la membrana así como la sensibilización y desensibilización de receptores (Haas et al., 2008).

- **Receptor H₁.** Media respuestas excitatorias en el cerebro como despolarización de la membrana y/o un incremento en la frecuencia de disparo de muchas neuronas. También actúa como mediador en la mayoría de los efectos proinflamatorios de histamina (Arrang, 2007). La transducción de señales es típica de los receptores acoplados a la proteína G_{αq/11}, esto incluye la activación de la fosfolipasa C (PLC) que promueve la liberación de Ca⁺² de fosas intracelulares dependiente de inositol trifosfato (IP3); también a través del diacilglicerol (DAG) induce la activación de la proteína cinasa C (PKC), la cual facilita la entrada capacitiva de Ca⁺² a través de canales de calcio voltaje dependientes, y de la familia de los receptores canal de potencial transitorio (TRPC) (Haas et al., 2008).
- **Receptor H₂.** Está presente en la activación de la adenilatociclasa y por ende el subsecuente incremento en el AMPc y la activación de la proteína cinasa A, similar al receptor H₁ usualmente media la respuesta excitatoria en las neuronas. De igual forma el receptor H₂ interviene en procesos como la inhibición de quimiotaxis en neutrófilos polimorfonucleares, la secreción de IL-12 por

monocitos y la inducción de producción de IL-10 (Arrang, 2007; Beghdadi et al., 2009).

- **Receptor H₃.** Se encuentra expresado principalmente en neuronas del sistema nervioso central y periférico. Estudios en cerebros de ratas y humanos han demostrado que los receptores H₃ presinápticos localizados en terminaciones nerviosas histaminérgicas actúan como un autorreceptor para controlar la síntesis, la liberación de histamina y a su vez, actúan como heterorreceptor que influencia la liberación de otros neurotransmisores como dopamina, GABA, noradrenalina, ACh, y serotonina (Arrang, 2007). Acoplado a proteínas Gi/o sensibles a la toxina pertusis regula negativamente a los canales de Ca⁺² tipo N y P y a la adenilatociclasa. A través de comunicación cruzada con otros receptores acoplados a proteínas G pueden activar la señalización Gq/11 y activar las vías PLA2, Akt/GSK3 y de las MAP cinasas, las cuales tienen un papel importante en la plasticidad sináptica axonal y en una variedad de desórdenes cerebrales (Haas et al., 2008).
- **Receptor H₄.** Es expresado predominantemente en células hematopoyéticas, y los agonistas a éste receptor han mostrado inducir quimiotaxis de mastocitos y eosinófilos, al igual que la producción de IL-16 por las células T (Beghdadi et al., 2009). Recientemente se encontró que exhibe una homología molecular y farmacológica similar a los receptores H₃ (Haas et al., 2008).

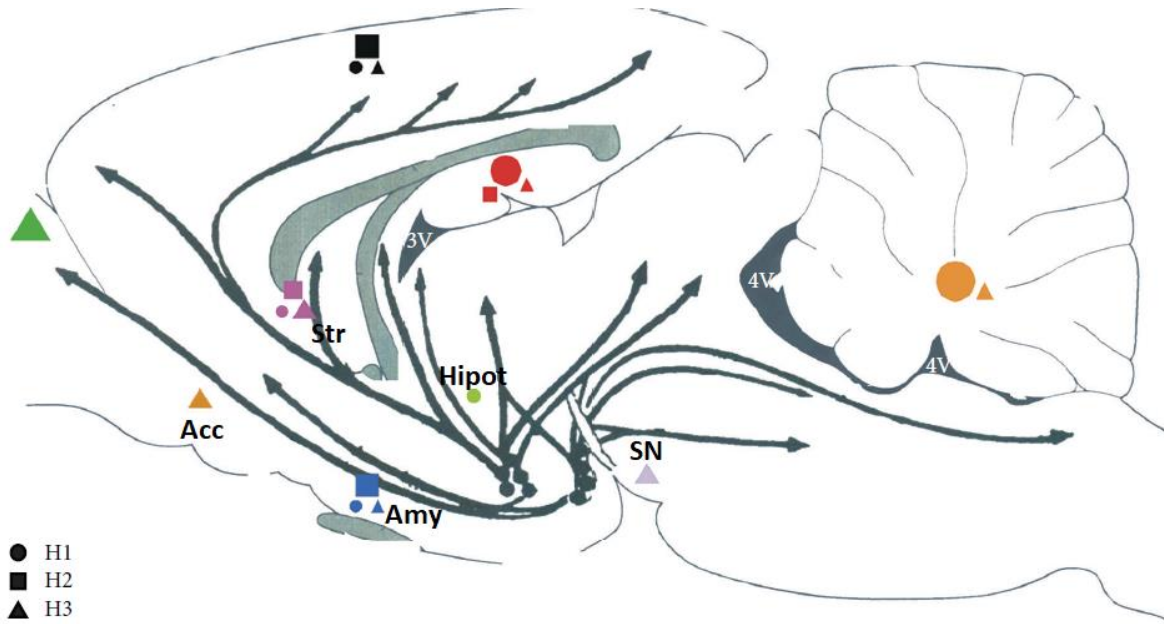


Figura 6. Principales proyecciones histaminérgicas y distribución de los receptores a histamina en el cerebro de ratona. Las figuras marcadas muestran los principales sitios donde se localiza cada subtipo de receptor. En áreas que tienen más de un subtipo la figura con mayor tamaño indica cuál subtipo predomina. Acc, núcleo accumbens; Amy, amígdala; Hipot, hipotálamo; Str, cuerpo estriado; SN, sustancia nigra (modificado de Köhler et al., 2011).

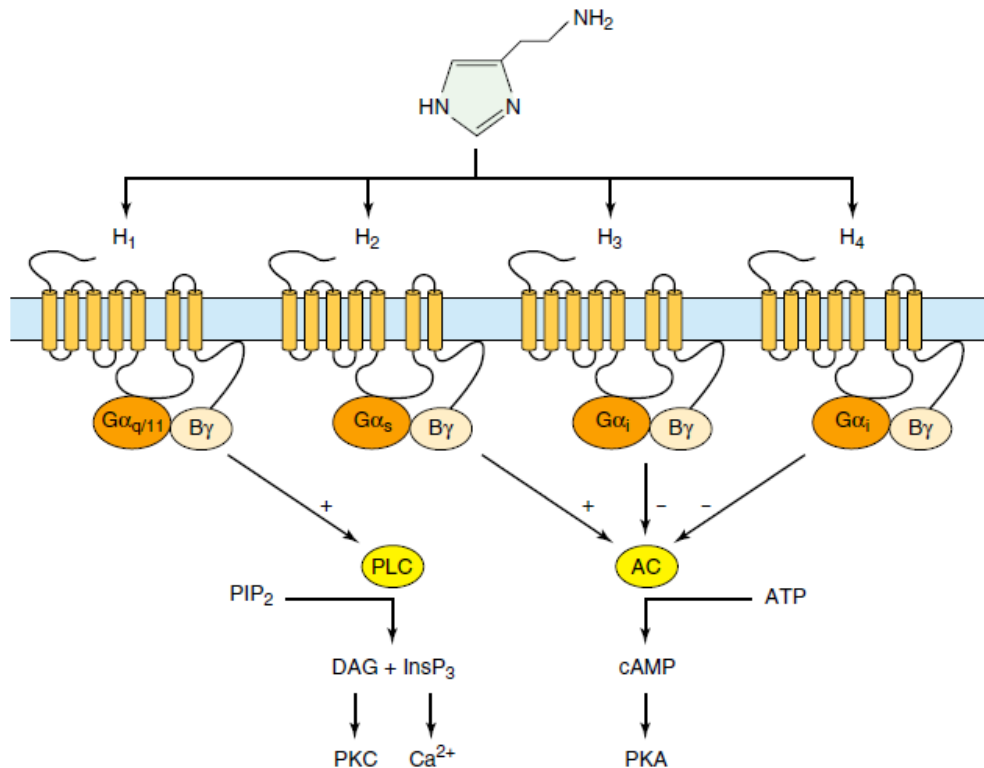


Figura 7. Principales vías de señalización de los receptores de histamina. Se observa la unión de la histamina a los cuatro receptores acoplados a proteína G y la variedad de vías de señalización intracelular. El receptor H₁ activa el metabolismo del fosfatidilinositol mientras que

los otros receptores ya sea positiva (receptor H₂) o negativamente (receptores H₃ y H₄) regulan la actividad de la adenilato ciclasa. Cabe mencionar que existen vías de señalización adicionales que se han descrito pero que no se muestran en la figura. PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLC, fosfolipasa C; AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosin trifosfato; AMPc, AMP cíclico; PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa A (modificado de Siegel, 2006).

9.3 Sistema histaminérgico: corteza insular y la memoria del sabor

El sistema histaminérgico desempeña un papel crítico en las funciones fisiológicas del cerebro, como la regulación del sueño y vigilia, la termogénesis, el aprendizaje y la memoria (Haas & Panula, 2003). Se ha demostrado que la histamina actúa en diferentes sitios del cerebro como importante regulador de la consolidación y recuperación de la memoria en varios paradigmas de aprendizaje (Almeida & Izquierdo, 1986; Flood et al., 1998; Fox et al., 2002; Komater et al., 2003). En cuanto a la memoria de reconocimiento, la participación del sistema histaminérgico en la formación de la memoria para eventos emocionalmente salientes se ha estudiado utilizando ligandos específicos de los receptores para histamina H₁, H₂ y H₃, además de utilizar animales genética y farmacológicamente manipulados en el contenido de histamina (Provensi et al., 2018).

Los receptores de histamina H₃ regulan la liberación de histamina de las terminales neuronales histaminérgicas. La corteza cerebral, incluida la CI, expresa abundantes receptores H₃; Sin embargo, las funciones y mecanismos de los receptores H₃ siguen siendo poco conocidos (Takei et al., 2017).

La CI desempeña un papel muy importante en el procesamiento de información gustativa y visceral durante la formación de la memoria del sabor (Yamamoto, 1984). Particularmente se ha demostrado que la inyección intracerebral del agonista del receptor H₃, RAMH, interrumpe la formación de la memoria aversiva al sabor (Purón-Sierra et al., 2010). Este resultado corrobora los hallazgos anatómicos de que la CI recibe proyecciones histaminérgicas del TMN (Haas et al., 2008) y expresa abundantes

receptores H₃ en todas las capas (Cumming et al., 1994; Pillot et al., 2002; Pollard, et al., 1993).

La evidencia indica que inyecciones en el septum con antagonistas de H₃ o dimaprita incrementa la liberación de ACh del hipocampo en ratas, mientras que RAMH, un agonista de H₃, produce el efecto opuesto (Bacciottini et al., 2002), sugiriendo la hipótesis acerca del papel que pudiera tener la histamina en ejercer un efecto a través de la regulación de la liberación de ACh en el hipocampo. En este sentido, se ha propuesto que la histamina participa en diferentes tareas de aprendizaje asociativo, principalmente mediante la regulación de la liberación de neurotransmisores como ACh, dopamina y GABA (Passani et al., 2017).

Específicamente, la disminución de la liberación cortical de ACh provocada por la histamina también tiene un impacto significativo en la formación de memoria aversiva del sabor, ya que una inyección de RAMH en la CI deterioró el CAS y disminuyó simultáneamente la liberación de ACh en la CI. Este daño puede ser explicado por la presencia de receptores histaminérgicos H₃ en células gabaérgicas de la CI, sugiriendo una posible interacción GABA/ACh durante la formación de la memoria del sabor que es regulada por la actividad histaminérgica (Purón-Sierra & Miranda, 2014).

Por otro lado, la actividad histaminérgica muestra un ritmo circadiano claro con niveles altos durante el período activo en varias especies, incluidos peces, roedores (de noche), monos y humanos (durante el día) y niveles bajos durante el período de sueño (Haas et al., 2008). Esta actividad también está involucrada en comportamientos emocionalmente "apetitivos". El sistema histaminérgico es importante para el comportamiento apetitivo relacionado con la alimentación (Valdés et al., 2010) y otros comportamientos dirigidos a los objetivos, como se observa en ratas motivadas para obtener sexo, anfetamina o agua (Contreras et al., 2016).

El esquema de consumo de líquidos utilizado durante los experimentos que brindan evidencias de la participación de la histamina, podría sugerir que también la histamina tiene una función durante la ingesta motivada por sed o hambre, ya que la administración de histamina en el hipotálamo lateral aumenta la ingesta de agua en ratas saciadas con agua (Fryer Leibowitz, 1973). Así mismo, antagonistas de los

receptores H₁ o H₂ de la histamina microinyectados en el núcleo hipotalámico ventromedial reducen la ingesta de agua (Magrani et al., 2004), mientras que su administración en los ventrículos no tiene efecto (Magrani et al., 2005). Sin embargo, las lesiones restringidas a cualquiera de las subdivisiones de TMN E1-E4 inducen una polidipsia persistente (Mahía & Puerto, 2006).

Con los antecedentes ya expuestos se ha demostrado que la histamina tiene influencia en el proceso de memoria del CAS. En esta investigación se tiene el interés de encontrar la función de la histamina durante el consumo libre o bajo la privación de líquidos en la formación de la memoria aversiva del sabor; asimismo investigar la relación entre la motivación y la sed durante la formación del CAS, así como su dependencia con la actividad de los receptores histaminérgicos H₃ en la CI. Esta idea se sustenta con evidencia previa obtenida en un modelo de condicionamiento aversivo al olor (CAO) donde se encontró que la liberación de orexina A, inducida por el ayuno, influye en el aprendizaje del CAO al aumentar no solo la sensibilidad olfativa, sino también los procesos de memoria que subyacen a la asociación olor-malestar, introduciendo así un nuevo mecanismo por el cual el sistema hipotálamo lateral-orexina puede influir en los procesos que permiten a los animales aprender a seleccionar alimentos disponibles en el medio ambiente y adaptar su comportamiento a la experiencia previa (Ferry & Duchamp-Viret, 2014) .

El papel de la histamina en la atención inducida por la novedad de los estímulos es de gran importancia para la adaptación a los entornos cambiantes al comparar las noticias con el recuerdo de cosas pasadas. Esto es decisivo para el reconocimiento de peligros y la supervivencia (Haas et al., 2008).

JUSTIFICACIÓN

Los modelos experimentales implementados en el estudio de la formación de la memoria del sabor tienen en su protocolo un horario de privación de consumo de líquidos que puede ser hasta de 24 horas, en particular este procedimiento es aplicado durante todas las fases del CAS (Purón-Sierra & Miranda, 2014; Purón-Sierra et al., 2010).

La privación induce un estado de sed en el que las ratas reciben exposición a estímulos con valor motivacional. Por lo tanto, es importante conocer si la exposición a estímulos asociados durante el CAS depende del estado motivado por sed, ya que es posible que el estado de privación de agua modifique el estado interno del animal, y a su vez propiciar un estado diferente para procesar los estímulos durante el CAS (Ángulo, 2018).

De tal forma que la fuerza del CAS podría estar relacionada con el estado de saciedad, la homeostasis, la motivación y los cambios circadianos que son a su vez regulados por la actividad histaminérgica (Haas et al., 2008). De manera que resulta relevante el estudio de la formación de la memoria aversiva al sabor en un esquema donde los sujetos no estén privados de líquidos (*ad libitum*) y con ello comparar los efectos de la privación o de la saciedad sobre el aprendizaje y la memoria. Asimismo, debido a que el sistema histaminérgico juega un papel clave en la regulación de la ingesta mediada por el hipotálamo (Haas et al., 2008), y que está involucrado en varios tipos de aprendizaje (Provinsi et al., 2018) es importante conocer de qué manera la histamina en la CI participa particularmente en conductas motivadas como lo es el aprendizaje del sabor.

Una mejor comprensión del papel del sistema histaminérgico en el aprendizaje y la memoria no solo tiene un significado teórico sino también un valor de traslación. Los ligandos de los receptores de histamina se encuentran presentes en la mayoría de los trastornos y en el trastorno de estrés postraumático (Provinsi et al., 2018), por lo tanto, comprender el impacto de estos compuestos en el aprendizaje y la memoria

puede ayudar a mejorar su perfil farmacológico y desentrañar las aplicaciones terapéuticas no exploradas.

HIPÓTESIS

La magnitud de la memoria aversiva del sabor (del CAS) será mayor bajo un esquema *ad libitum* que en un esquema de privación.

Cuando la adquisición del CAS es bajo un esquema *ad libitum*, la aversión en la evocación bajo privación será mayor que cuando se adquiere y se evoca en un esquema de privación constante.

Cuando la adquisición del CAS es bajo un esquema de privación, la aversión en la evocación *ad libitum* será menor que cuando se adquiere y se evoca en un esquema *ad libitum* constante.

El agonismo de los receptores para histamina tipo H₃, en la CI durante la adquisición del CAS, disminuirá en mayor medida la formación de la memoria bajo un esquema de privación de líquidos que en un esquema *ad libitum*.

OBJETIVOS

- Caracterizar un modelo de CAS en grupos de rata macho y hembra bajo un esquema de líquidos *ad libitum* o de privación de líquidos.
- Caracterizar un modelo de CAS en grupos de rata macho y hembra bajo esquemas cruzados de líquido *ad libitum* o de privación durante la adquisición o la evocación.
- Evaluar los efectos del agonista de los receptores para histamina H₃, RAMH, en la CI durante la adquisición del CAS bajo un esquema de líquidos *ad libitum* o de privación.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Se emplearon grupos de ratas hembra y macho cepa Wistar de 9 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) campus Juriquilla, Querétaro.

El número total de sujetos experimentales fue de 150, los cuáles fueron distribuidos de la siguiente manera: para la caracterización del CAS se emplearon 20 ratas macho y 20 ratas hembra, en la caracterización bajo esquemas cruzados, 20 ratas macho y 20 hembras; por último en el agonismo de los receptores H₃ se trabajó con 70 ratas macho.

En el laboratorio las ratas se mantuvieron en aclimatación durante 7 días en cajas individuales (45 x 25 x 20 cm) con agua y alimento *ad libitum* bajo un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 am– 8:00 pm oscuridad, 8:00 pm – 8:00 am luz) y una temperatura de 23 ± 2 °C. Todos los experimentos se realizaron durante la fase de actividad de los roedores (oscura 8:00 am - 8:00 pm). Los procedimientos realizados siguen las normas establecidas por el Comité de Ética y Cuidado Animal del Instituto de Neurobiología de la UNAM y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Así también, fueron acordes con la normatividad internacional para el manejo y uso de animales de experimentación (National Institutes of Health, www.nih.gov).

- **Caracterización de modelos: CAS esquema *ad libitum* y esquema privación**

El primer objetivo fue la caracterización de un protocolo experimental del CAS bajo dos esquemas, conservando las mismas variables excepto la disponibilidad de líquido.

El primer esquema, “*ad libitum*” de no privación de líquido (agua), mantuvo el acceso permanente al agua; durante todo el protocolo del CAS. Durante la adquisición,

la presentación del “sabor novedoso” (sacarina 0.1%) fue durante una hora (1-2 pm) intercambiando la probeta de agua por la de sacarina. Por otra parte, en el segundo esquema, “privado”, solo se dio acceso diario a agua por una hora/día (1-2 pm) durante el consumo basal. En la adquisición, la presentación del “sabor novedoso” sacarina fue sólo durante esa misma hora (1-2 pm) (Figura 8). En este esquema privado en todo el protocolo del CAS se dieron 20 minutos de rehidratación diaria (3:40-4 pm).

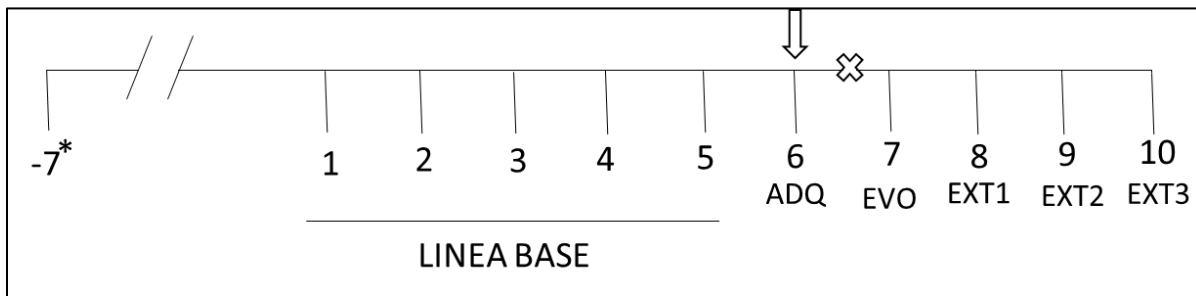


Figura 8. Protocolo del CAS. Durante los 5 primeros días se cuantificó el consumo basal (agua) cada hora de 11 am-4 pm para el esquema *ad libitum*. A lo largo del CAS se mantuvo la cuantificación de consumo de agua dos horas antes y dos horas después del consumo de sacarina. En el esquema de privación, las ratas se privaron de agua 18 horas antes del día 1, posteriormente se dio acceso a agua solo durante una hora al día (1-2 pm). El símbolo **X** indica el día en el que se realizó el intercambio de esquemas para la caracterización con esquemas cruzados. * Indica el día de la cirugía estereotáxica para los grupos farmacológicos. La flecha blanca indica el día que se hicieron las inyecciones farmacológicas. ADQ = adquisición del CAS sabor novedoso, sacarina al 0.1% en todos los grupos y esquemas durante una hora (1-2 pm), 30 minutos después se inyectó LiCl 0.3 M (10 mL/Kg) intraperitoneal. EVO= Evocación de la memoria aversiva igual que durante la ADQ, pero sin inyección de LiCl. EXT= Tres sesiones de extinción de la memoria aversiva, presentación de sacarina igual que en EVO.

Registro de consumos basales

Se cuantificó durante 5 días el consumo basal de agua, presentando una probeta con 40 mL de agua, en un horario de 11:00 am-4:00 pm se registró el consumo de agua cada hora (12:00 pm, 1:00 pm, 2:00 pm, 3:00 pm y 4:00 pm) para el esquema *ad libitum*. La línea basal en el esquema “privado” se hizo presentando también una probeta con 40 mL de agua, pero sólo durante una hora (1:00-2:00 pm). Para ambos esquemas en el horario de 1:00-2:00 pm se registró el consumo de los primeros 20 minutos y de la hora total.

Condicionamiento aversivo al sabor

Adquisición

Se presentó, en ambos esquemas, una probeta con 40 mL de una solución de sacarina al 0.1% durante 1 hora (1:00-2:00 pm); se registró el consumo a los primeros 20 minutos y a la hora, se retiró la probeta y 30 minutos después se inyectó LiCl 0.3 M (10mL/Kg) por vía intraperitoneal, sustancia que provoca irritación gástrica. En el caso del esquema *ad libitum* se tomaron 2 registros de consumo de agua antes de la hora de adquisición (11:00 am-12:00 pm, y 12:00 pm-1:00 pm) y 2 registros después de la adquisición (2:00-3:00 pm y de 3:00-4:00 pm).

Evocación de la memoria aversiva (EVO)

Este día se comprobó la formación de la memoria aversiva presentando nuevamente una probeta con 40 mL de sacarina al 0.1% durante el mismo horario en el que fue presentada el día de la adquisición (1:00 pm-2:00 pm), se registró el consumo en los primeros 20 minutos y en la hora total. En el caso del grupo *ad libitum* se realizaron dos mediciones de consumo de agua antes y dos después de la hora de evocación.

Extinción de la aversión (EXT)

Para la evaluación de la extinción de la memoria aversiva se presentaron durante 3 días consecutivos 40 mL de sacarina al 0.1% en el mismo horario que la adquisición y la evocación (1:00-2:00 pm) y se registra el consumo en los primeros 20 minutos y en la hora total. Para el grupo *ad libitum* nuevamente se registraron los dos consumos de agua anteriores a la hora de extinción y los dos consumos posteriores.

- **Caracterización de modelos cruzados: CAS *ad libitum* o privación durante la adquisición y evocación**

Con el objetivo de evaluar si el grado de saciedad de líquidos afecta la adquisición o la evocación de la memoria aversiva se realizó otro experimento con

grupos independientes de ratas, donde se intercambiaron los esquemas después de la adquisición, es decir, si la adquisición fue bajo un esquema *ad libitum* la evocación se realizó bajo privación y viceversa. Para lograrlo, se aplicó el mismo procedimiento con la única diferencia de que 4 horas después de la presentación de sacarina, se entrecruzan esquemas (Figura 8 símbolo X). Las ratas que adquirieron bajo el esquema *ad libitum* se privaron de agua retirándoles los bebederos por 19 horas y a las ratas que adquirieron bajo el esquema privado se les dio acceso de agua *ad libitum* 4 horas después de la adquisición.

- **Grupos farmacológicos**

Una vez establecido el protocolo para el CAS en ambos esquemas, en grupos independientes de ratas se abordó el tercer objetivo, el cual consistió en evaluar los efectos del agonista para los receptores H₃ de histamina, RAMH en la CI. Para cada esquema, se tuvieron dos grupos: el grupo SALINA y el grupo RAMH (Figura 8, flecha blanca).

Cirugía

Después de la aclimatación al vivario (7 días), en grupos independientes se realizó cirugía estereotáxica, para ello se administró como anestésico una combinación de ketamina (70mg/Kg) y xilacina (6 mg/Kg) vía intraperitoneal, posteriormente se colocaron bilateralmente cánulas de acero inoxidable de 12mm \pm 0.5 mm de longitud, dirigidas a la CI teniendo como referencia las siguientes coordenadas a partir de Bregma: Anteroposterior: +1.2mm, Lateral \pm 5.5 mm y Dorsoventral -4 mm de acuerdo con el atlas de Paxinos Watson (1998). Las cánulas colocadas funcionaron como guía para los inyectores durante las inyecciones. Después de la cirugía los animales recibieron como tratamiento postoperatorio una sola dosis del analgésico tramadol (5mg/Kg) vía sublingual, por último se destinaron 7 días de recuperación, pasado este período se inició el registro de consumos basales.

Inyecciones intracerebrales

El día de la adquisición del CAS, 20 minutos antes (12:40 pm) de la exposición a la sacarina al 0.1% se realizaron inyecciones bilaterales de 0.5 μ L de RAMH 10 μ M (626 pg por lado) en la CI con inyectores (agujas dentales) de número 30 conectándose por uno de sus lados con una jeringa Hamilton de 10 μ L por medio de un tubo delgado de polietileno, las jeringas a su vez se cargaron con el volumen del fármaco a inyectar. Las jeringas de ambos inyectores se colocaron en una bomba de inyección automática, la cual fue programada para expeler 0.5 μ L en cada lado a una razón de 0.5 μ L/min. Los inyectores sobresalieron 2 mm más allá de la punta de la cánula para alcanzar la profundidad de la CI. El tiempo de inyección fue de 1 minuto por sujeto, al término de la inyección los inyectores permanecieron en el sitio durante 1 min más con el fin de no provocar reflujo del líquido inyectado al retirarlos. Todos los animales fueron manipulados por aproximadamente 3 minutos cada día durante tres días previos a la inyección bajo las mismas condiciones.

Histología

Al término de los experimentos de farmacología, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital intraperitoneal (1mL/0.5 Kg), posteriormente se perfundieron intracardialmente con solución salina al 0.9%, y se extrajeron los cerebros, para posteriormente conservarse en solución de formaldehído al 10% durante 4 días. Paso siguiente, los cerebros se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% y se mantuvieron por un mínimo de 4 días hasta el momento del corte. Se realizaron cortes coronales de 50 μ m de espesor entre las coordenadas a partir de Bregma +3.7mm hasta -0.8mm abarcando gran parte de la longitud de la corteza insular.

Los cortes se hicieron en micrótopo, a una temperatura de -27 ± 2 °C y fueron montados en un portaobjetos gelatinizados con previa identificación, se dejaron secar de 3 a 5 días para su correcta adhesión y posteriormente se aplicó la tinción de Violeta de Cresilo (Nissl), útil para la comprensión de la citoarquitectura de diferentes áreas cerebrales y cuyo método se basa en la interacción del colorante básico violeta de

cresilo con el contenido de ácido nucleico de las células. Como procedimiento se incubaron los cortes durante 25 min en cloroformo absoluto bajo la campana de extracción, posteriormente los cortes pasaron al tren de tinción en el siguiente orden: solución de alcohol al 25% por 2 minutos, violeta de cresilo al 1% por 27 min, alcohol al 50% durante 30 segundos, alcohol al 70% por 1 minuto, solución diferenciadora (500 mL de alcohol al 70% con 10 gotas de ácido acético glacial) durante 30 segundos aproximadamente, alcohol 95% de 10 a 20 segundos, alcohol absoluto por 1 minuto, mezcla xilol-alcohol 1:1 durante 1 minuto, Xilol por 2 minutos y al final se cubrieron los cortes con resina sintética y cubreobjetos. Una vez secos se analizaron los cortes en el estereoscopio para determinar si las inyecciones fueron realizadas en la corteza insular.

Se buscó en cada cerebro evidencias de la trayectoria de las cánulas y de los inyectores (Figura 9), así como de los sitios de difusión (RAMH o solución salina), teniendo previamente identificados lado izquierdo y derecho en todos los cortes.

Se excluyeron aquellos sujetos con evidencias de lesión en el sitio de interés o con inyecciones fuera de lugar, además algunas ratas del grupo RAMH esquema *ad libitum* no consumieron sacarina durante los primeros 20 minutos de presentación por lo que no fue posible establecer si tuvieron un CAS, razón que permitió excluirlas pese a tener resultados positivos en histología.

Análisis histológico

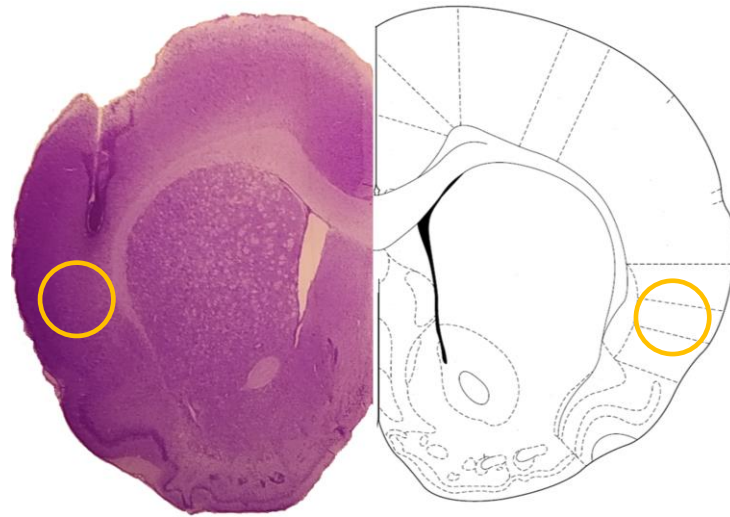


Figura 9. Foto representativa de la localización de las guías cánulas y del trayecto de los inyectores para llegar a la CI. Corte coronal de 50µm de cerebro de rata, del lado izquierdo se muestra el lugar donde estuvo la guía cánula, debajo de este sitio y encerrado en un ovalo amarillo se indica el área de difusión del fármaco. Del lado derecho se puede observar un esquema del atlas Paxinos con la localización de la CI a un nivel AP de 0.7 mm con respecto a Bregma, Modificado de Paxinos et al., 2013.

Estadística

Después de realizar pruebas de normalidad D'Agostino-Pearson para valorar la distribución de los datos, se obtuvo para el esquema *ad libitum* un valor de $p=0.387$ y para el esquema privado $p=0.746$ indicando la existencia de una distribución de probabilidad normal, y por lo tanto la prueba estadística elegida fue del tipo paramétrico.

Para cada horario (11:00-12:00 pm, 12:00 pm – 1:00 pm, 1:00pm – 2:00 pm, 2:00 pm – 3:00 pm y 3:00 pm – 4:00 pm) se promedió en consumo de agua cuantificado durante las 5 líneas base, se corrigió el consumo del horario de 1-2 pm por el efecto de chorreo y se aplicó una prueba estadística de Análisis de Varianza (ANDEVA) de medidas repetidas para cada sexo.

Los consumos basales fueron indexados con respecto al peso de los sujetos, posteriormente se analizaron con una ANDEVA de medidas repetidas para cada sexo.

Los resultados de la caracterización del CAS también fueron indexados con respecto al peso en mL/Kg, para estos análisis se aplicó la prueba estadística ANDEVA de medidas repetidas para cada esquema y separado por sexo.

Se normalizaron los consumos del CAS con respecto a la adquisición y nuevamente fueron analizados con una ANDEVA de medidas repetidas para cada esquema y separado por sexo. La comparación del CAS *ad libitum* vs privado fue posible al normalizar los consumos, resultados que fueron analizados estadísticamente con una ANDEVA de medidas repetidas separada por sexo.

Las diferencias estadísticas entre los esquemas cruzados fueron establecidas con una prueba ANDEVA de una vía separada por sexo.

Para cada uno de los análisis mencionados $p < 0.05$ fue considerado significativo, se realizó una prueba pos-hoc Fisher de ser necesario y las diferencias debidas al factor sexo fueron determinadas con una ANDEVA de dos vías.

Los consumos durante el CAS de los grupos farmacológicos fueron analizados con una ANDEVA de medidas repetidas para cada grupo con una post hoc Fisher en caso de requerirlo. Se compararon los consumos de ambos grupos (Salina y RAMH) de cada esquema (*ad libitum* o *privado*) con una ANDEVA de dos vías.

Además, con el objetivo de poder comparar por esquemas, estos datos fueron normalizados con respecto a la adquisición y se analizaron primeramente por grupo con una ANDEVA de medidas repetidas y posteriormente se compararon todos los grupos (*ad libitum* salina, *ad libitum* RAMH, privado salina, privado RAMH) con una prueba ANDEVA de una vía aplicando una prueba post-hoc Fisher. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Todos resultados fueron expresados con el valor de la media \pm el error estándar.

RESULTADOS

OBJETIVO 1

- **Consumo constante durante los diferentes horarios de las líneas basales en el esquema *ad libitum* (ambos sexos)**

Una prueba ANDEVA de medidas repetidas se utilizó para evaluar diferencias significativas entre los consumos basales de agua registrados cada hora para cada sexo. El primer análisis arrojó diferencias significativas entre el horario intermedio y el resto de los horarios tanto en machos como en hembras; estas diferencias son debidas al efecto del goteo que se tiene por manipular las probetas, en el horario intermedio de 1-2 pm se manipula la probeta dos veces; una para medir el consumo inicial (a los 20 minutos) y otra para medir el consumo final en una hora. Sin embargo, en el resto de los horarios la medición de consumo en las probetas solamente se realizó al finalizar la hora. Para corregir este sesgo de medición por manipulación, se decidió cuantificar el volumen de pérdida por goteo en 5 probetas colocadas en cámaras individuales vacías bajo el procedimiento exacto al realizado durante el experimento. La pérdida por goteo promedio fue de 0.692 mL, cantidad que se restó a los consumos del horario intermedio. Hecho este ajuste nuevamente se aplicó la prueba estadística de ANDEVA de medidas repetidas con una post hoc Fisher para los consumos de cada sexo. Los resultados indicaron que el consumo en hembras fue constante durante todos los horarios ($F_{4,9} = 0.722$, $p=0.50$) (Figura 10), y en el caso de los machos solo hubo una diferencia significativa ($F_{4,9} = 2.979$, $p=0.042$; diferencia significativa entre horario de 1-2 pm y el horario de 2-3 pm, $p<0.05$), Figura 11).

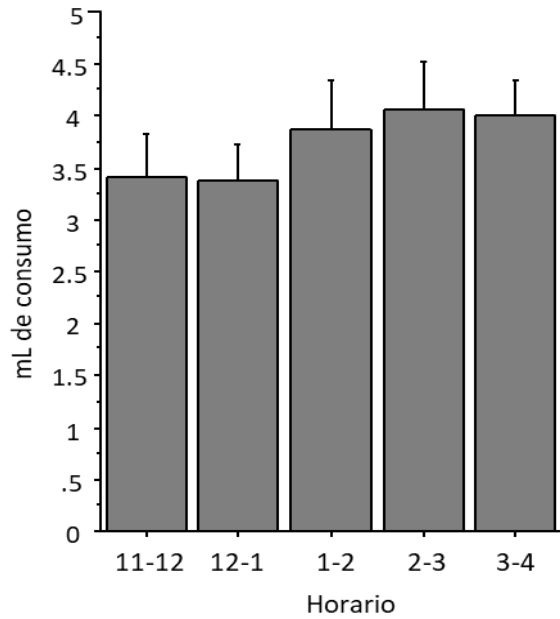


Figura 10. Las barras representan los promedios de los consumos de agua por hora \pm SEM en ratas hembra del esquema *ad libitum* (n=10). No existen diferencias significativas entre los horarios al normalizar restando el efecto del goteo debido a la manipulación $p > 0.05$.

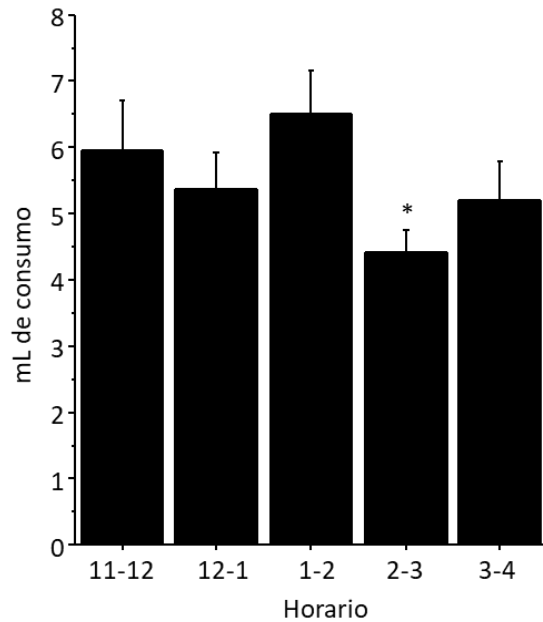


Figura 11. Las barras representan los promedios de los consumos de agua por hora \pm SEM en ratas macho del esquema *ad libitum* (n=10). Existen diferencias significativas entre los horarios 1-2 pm y 2-3 pm al normalizar restando el efecto del goteo debido a la manipulación $*p < 0.05$.

- En el esquema *ad libitum* los machos registran un mayor consumo en la mayoría de los horarios en comparación con las hembras.

Al realizar una prueba ANDEVA de dos vías para los promedios de los consumos de agua por hora en ratas macho vs ratas hembra del *esquema ad libitum* se encontraron diferencias significativas entre sexos, ($F_{1,18} = 31.429$, $p < 0.0001$; diferencia significativa entre machos y hembras) y con un análisis post hoc de Fisher se encontraron diferencias en todos los horarios, excepto en el horario de 2-3. Estas diferencias de consumo de agua pueden ser explicadas por las diferencias de peso inherentes al sexo.

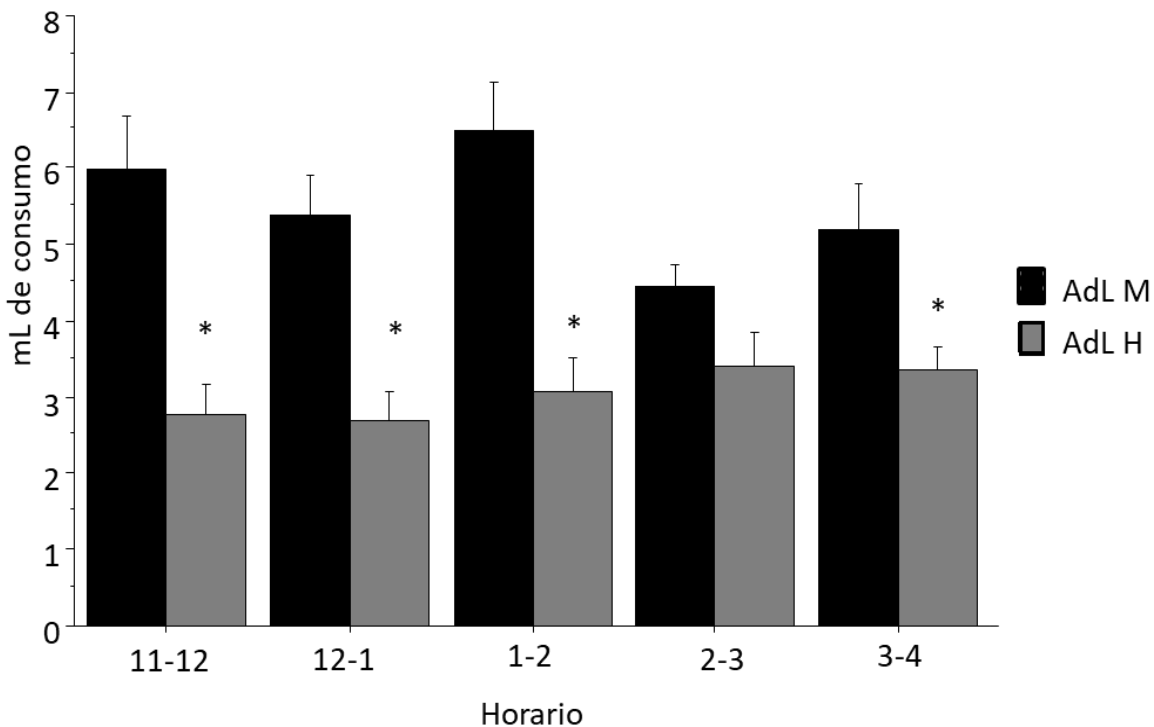


Figura 12. Las barras representan los promedios de los consumos de agua por hora \pm SEM en ratas macho $n=10$ y hembra $n=10$ del *esquema ad libitum*. Existen diferencias significativas debidas al sexo en todos los horarios al normalizar restando el efecto del goteo por manipulación, $*p < 0.05$, excepto en el horario de 2-3. En general machos y hembras bajo el *esquema ad libitum* difieren en los mL de consumo basal $p < 0.001$.

- **Machos y hembras del esquema *ad libitum* registran consumos basales similares al normalizar con respecto al peso**

Con el objetivo de eliminar el efecto que tiene la diferencia de peso inherente al sexo y poder comparar los consumos basales de machos vs hembras, se indexaron los datos al dividir los mililitros de consumo entre Kg de peso de la rata, posteriormente una prueba ANDEVA de dos vías indicó que no existen diferencias significativas en el consumo de agua debidas al sexo ($F_{1, 18} = 1.797$, $p=0.196$) (Figura 13). Con estos resultados el horario seleccionado para presentar el sabor novedoso durante el CAS para ambos sexos fue el intermedio de 1-2 pm.

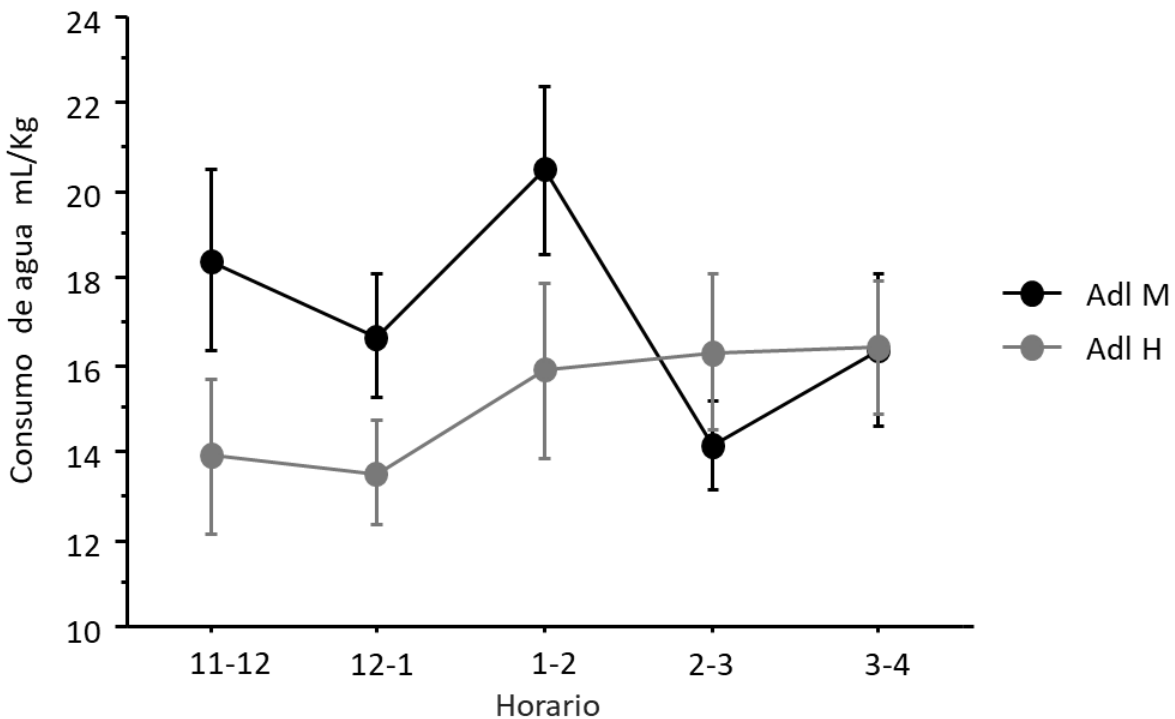


Figura 13. Consumo Basal de agua para el esquema *ad libitum* en mL/Kg durante los primeros 20 minutos. Los resultados son similares al comparar machos con hembras *ad libitum* $p>0.05$. Adl Hembras (n=10), Adl Machos (n=10) (media \pm SEM).

- **Existe una respuesta apetitiva al consumo de sacarina el día de la adquisición tanto para machos como para hembras del esquema *ad libitum***

Después de realizar una ANDEVA de medidas repetidas de los consumos obtenidos el día de la adquisición se encontró, con prueba post hoc Fisher, un mayor consumo del sabor novedoso (sacarina) durante los primeros 20 minutos del horario intermedio de 1-2 comparado con los consumos control agua del resto de los horarios (Machos: $F_{4,9} = 23.30$, $p < 0.0001$; diferencias entre los consumos basales de los horarios 11-12, 12-1, 2-3, 3-4 y el consumo de sacarina del horario de 1-2, $p < 0.05$). Este mismo resultado se obtuvo en hembras (Hembras: $F_{4,9} = 96.16$, $p < 0.0001$; diferencias entre los consumos basales de los horarios 11-12, 12-1, 2-3, 3-4 y el consumo de sacarina del horario de 1-2, $p < 0.05$). Después al comparar machos vs hembras con una ANDEVA de dos vías no se encontraron diferencias significativas debidas al sexo, ($F_{1,18} = 0.233$, $p = 0.634$), pero si se observa una interacción del sexo con la diferencia encontrada en el consumo del horario de 1-2 pm (sabor novedoso) ($F_{4,72} = 3.001$, $p = 0.023$) (Figura 14).

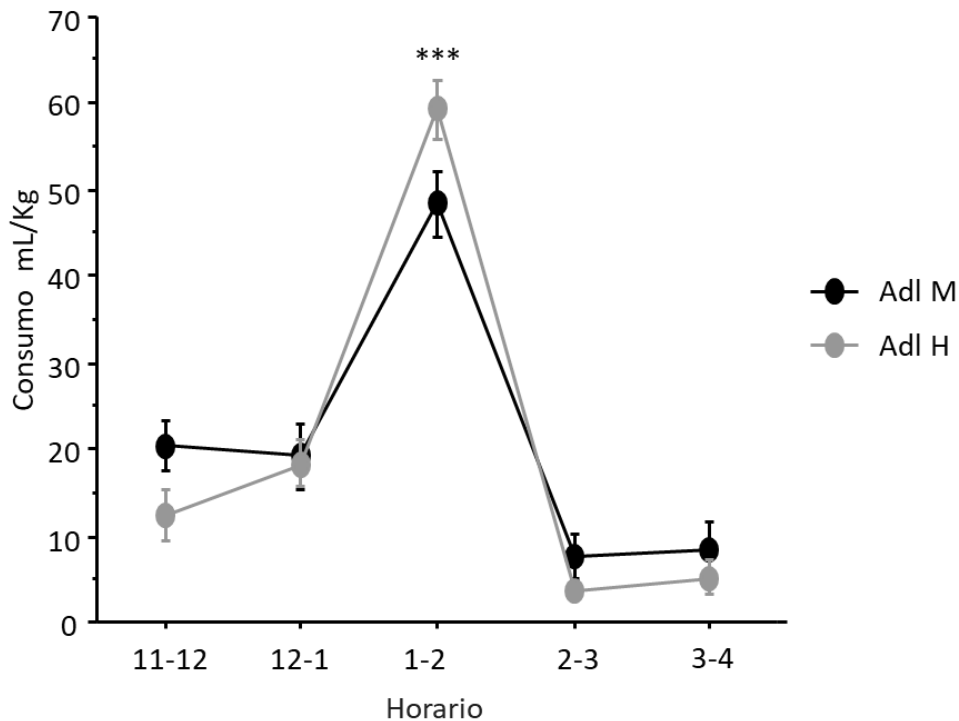


Figura 14. Consumos del esquema *ad libitum* en mL/Kg durante los diferentes horarios del día de adquisición. El consumo del horario intermedio 1-2 corresponde a sacarina, y el resto de las

horas corresponde al consumo de agua (11-12), (12-1), (2-3), (3-4). En ambos sexos existe una respuesta apetitiva a sacarina con respecto al resto de los consumos de agua *** $p < 0.0001$ (1-2) vs (11-12), (12-1), (2-3), (3-4). Los resultados son similares al comparar machos vs hembras. Adl Hembras (n=10), Adl Machos (n=10) (media \pm SEM).

- **En el esquema *ad libitum* la magnitud del CAS es fuerte y similar al comparar machos con hembras**

Una prueba ANOVA de medidas repetidas de los consumos durante el CAS en el esquema *ad libitum* para cada sexo reveló un consumo significativamente mayor el día de la adquisición comparado con el de la Línea Base 5 (LB5) ($p < 0.01$). Además, las diferencias de consumo entre el día de adquisición (ADQ) y el día de evocación (EVO) indican un CAS amplio ($p < 0.0001$); y las diferencias entre el consumo del día de ADQ y los días de extinción (EXT) ($p < 0.01$), indican que no hay extinción completa en ese número de sesiones para los machos y las hembras (Machos: $F_{5,9} = 27.35$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre ADQ y LB5, EVO, EXT1,EXT2,EXT3, $p < 0.05$) (Hembras: $F_{5,9} = 11.15$, $p < 0.001$; diferencias significativas entre ADQ y LB5, EVO, EXT1,EXT2,EXT3, $p < 0.05$) (Figura 15).

Con la finalidad de comparar y definir si la magnitud del CAS es similar en machos y en hembras se realizó una prueba ANDEVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas ($F_{1,18} = 0.740$, $p = 0.40$) lo cual indica que tanto machos como hembras, bajo esquema *ad libitum* aprenden con la misma fuerza.

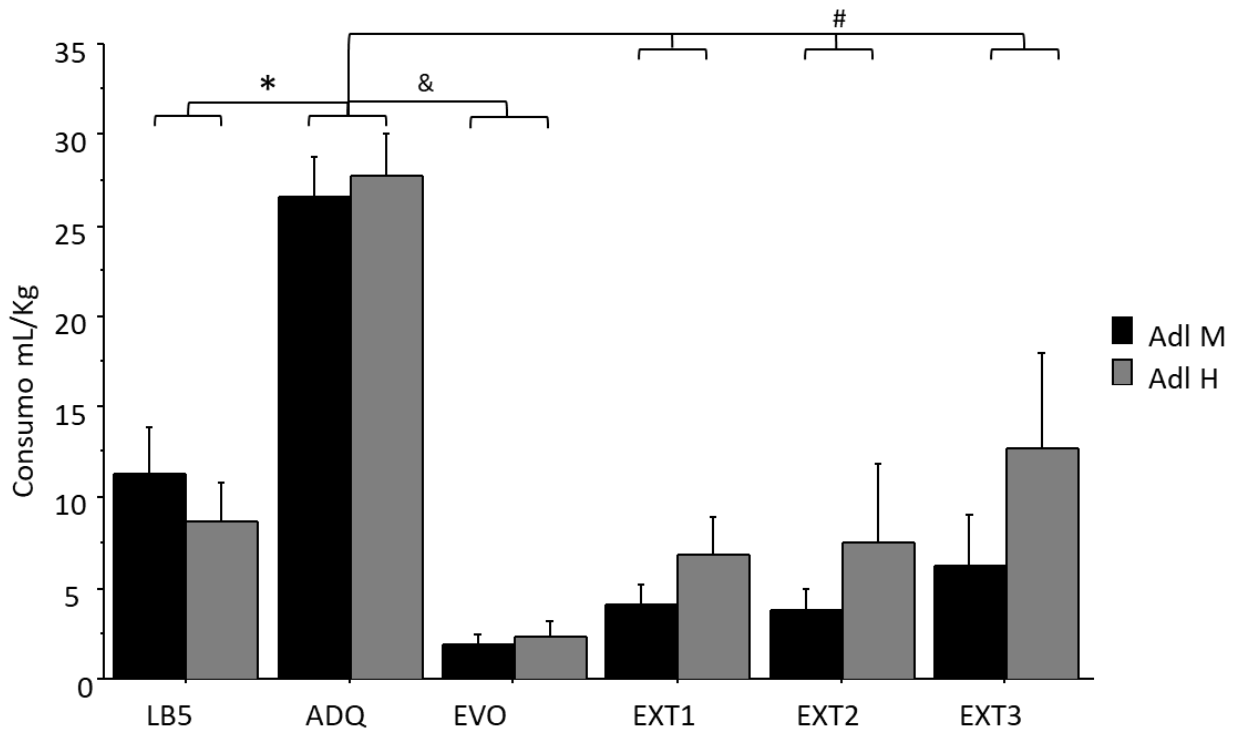


Figura 15. Consumo de sacarina en mL/Kg durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema *ad libitum*. Existe una respuesta apetitiva a sacarina el día de adquisición * $p < 0.01$ ADQ vs LB5. La intensidad del CAS en el esquema *ad libitum* es fuerte & $p < 0.0001$ ADQ vs EVO, y el proceso de extinción es retardado (con respecto al consumo el día de la ADQ) para machos y hembras # $p < 0.01$ ADQ vs EXT1-3. LB5= línea base 5, ADQ=adquisición, EVO= evocación, EXT1= extinción 1, EXT2= extinción 2, EXT3= extinción 3 Adl Machos (n= 10), Adl Hembras (n=10) (media \pm SEM).

- **En el esquema privado machos y hembras tienen una magnitud similar del CAS**

Tras realizar una prueba ANDEVA de dos vías no se encontraron diferencias significativas en los consumos mL/Kg de los días de CAS de machos vs hembras del esquema privado ($F_{1, 18} = 0.530$, $p = 0.47$). En cada caso no se registraron diferencias significativas del consumo de sabor novedoso el día de la ADQ con respecto al consumo basal de agua ($p > 0.05$), además las diferencias de consumo entre el día de ADQ y EVO indican un CAS robusto ($p < 0.0001$); existe un proceso de extinción $p < 0.0001$ al comparar los consumos el día de la EVO con los de las sesiones de extinción, proceso que es sumamente rápido pues no se observaron diferencias

significativas con respecto a la ADQ ($p > 0.05$) desde la primera sesión de extinción (Machos: $F_{5,9} = 24.61$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EVO y ADQ, EXT1, EXT2, EXT3, $p < 0.05$) (Hembras: $F_{5,9} = 16.88$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EVO y ADQ, EXT1, EXT2, EXT3, $p < 0.05$) (Figura 16).

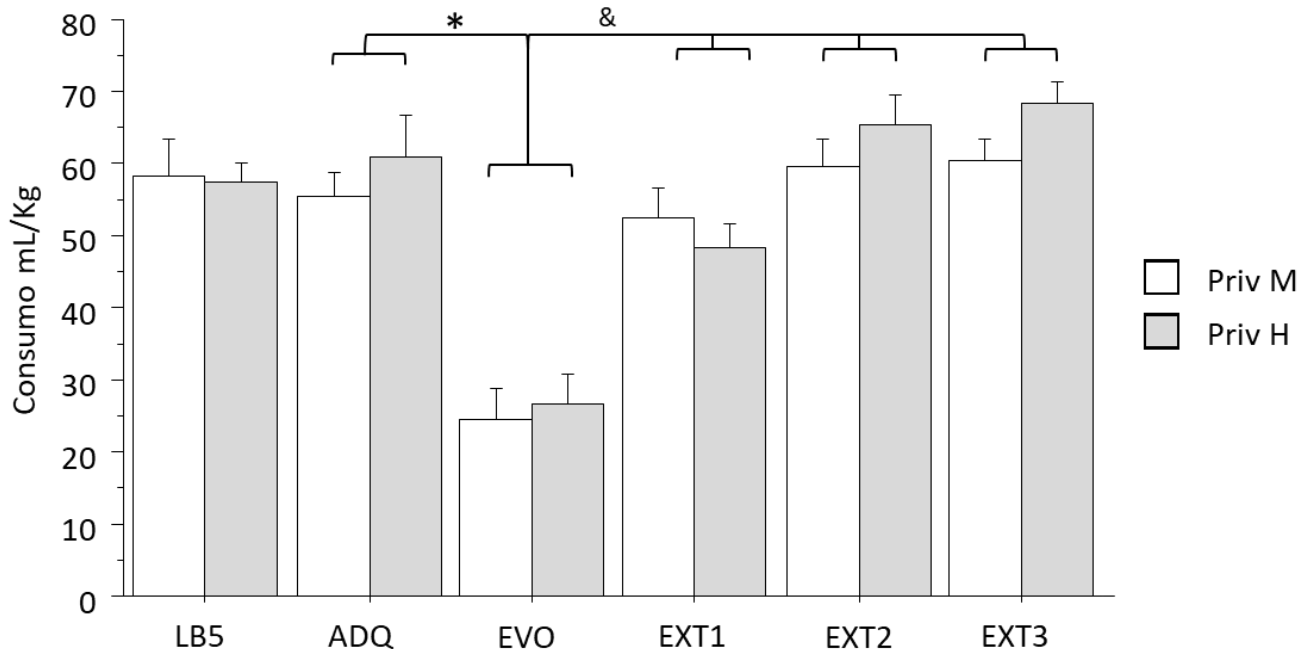


Figura 16. Consumo de sacarina durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema privado. El consumo de sacarina el día de la adquisición es similar al consumo basal de agua. Se puede apreciar un CAS robusto al comparar el consumo del día de ADQ con el de EVO, $*p < 0.0001$ ADQ vs EVO. Se puede observar el proceso de extinción $\&p < 0.001$ EVO vs EXT 1-3 y una extinción completa desde la primera sesión de extinción al registrarse consumos similares al día de adquisición $p > 0.05$ ADQ vs EXT1-3. Los resultados son similares al comparar machos vs hembras. LB5= línea base 5, ADQ=adquisición, EVO= evocación, EXT1= extinción 1, EXT2= extinción 2, EXT3= extinción 3. Priv Machos ($n=10$), Priv hembras ($n=10$) (media \pm SEM).

- **La magnitud del CAS es mayor en el esquema *ad libitum* comparado con el esquema privado tanto para machos como para hembras.**

Con el objetivo de poder comparar la magnitud del CAS del esquema *ad libitum* vs el esquema privado se normalizaron los consumos de cada sesión con respecto al

consumo que se tuvo el día de la adquisición, siendo este consumo considerado como el 100%.

Tras analizar con una ANDEVA de medidas repetidas para cada grupo se encontró que machos y hembras en el esquema *ad libitum* llevan un proceso de extinción retardado tal como se mostró en los consumos crudos (Figura 15) (Machos: $F_{4,9} = 131$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre ADQ y EVO, EXT1-3, $p < 0.05$) (Hembras: $F_{4,9} = 28.30$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre ADQ y EVO, EXT1-3, $p < 0.05$), mientras que en el esquema privado extinguen completamente desde la primer sesión de extinción al no observarse diferencias significativas con respecto a la ADQ ($p > 0.05$) como se mostró en los consumos crudos (Figura 16) (Machos: $F_{4,9} = 28.04$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EVO y EXT1-3, $p < 0.05$) (Hembras: $F_{4,9} = 14.76$, $p < 0.0009$; diferencias significativas entre EVO y EXT1-3, $p < 0.05$), específicamente los machos alcanzan una respuesta apetitiva en la última sesión de extinción al presentar un porcentaje de consumo en la última sesión de extinción significativamente mayor al tenido el día de adquisición ($p > 0.05$).

Después de realizar una ANDEVA de medidas repetidas para comparar los resultados de los 2 esquemas para cada sexo se encontró que el CAS bajo el esquema *ad libitum* es de mayor magnitud comparado con el esquema privado ($p < 0.001$). Además, en el esquema privado se registra un mayor consumo de sacarina durante las sesiones de extinción ($p < 0.001$), lo cual habla de un proceso de extinción acelerado (Machos: $F_{1,18} = 204.339$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre esquema privado y esquema *ad libitum* en todas las sesiones: EVO, EXT1-3, $p < 0.05$) (Hembras: $F_{1,18} = 30.243$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre esquema privado y esquema *ad libitum* en todas las sesiones: EVO, EXT1-3, $p < 0.05$) (Figura 17).

Los resultados fueron similares en machos y en hembras, y se comprobó con una ANOVA de dos vías ($F_{1,38} = 0.258$, $p = 0.61$).

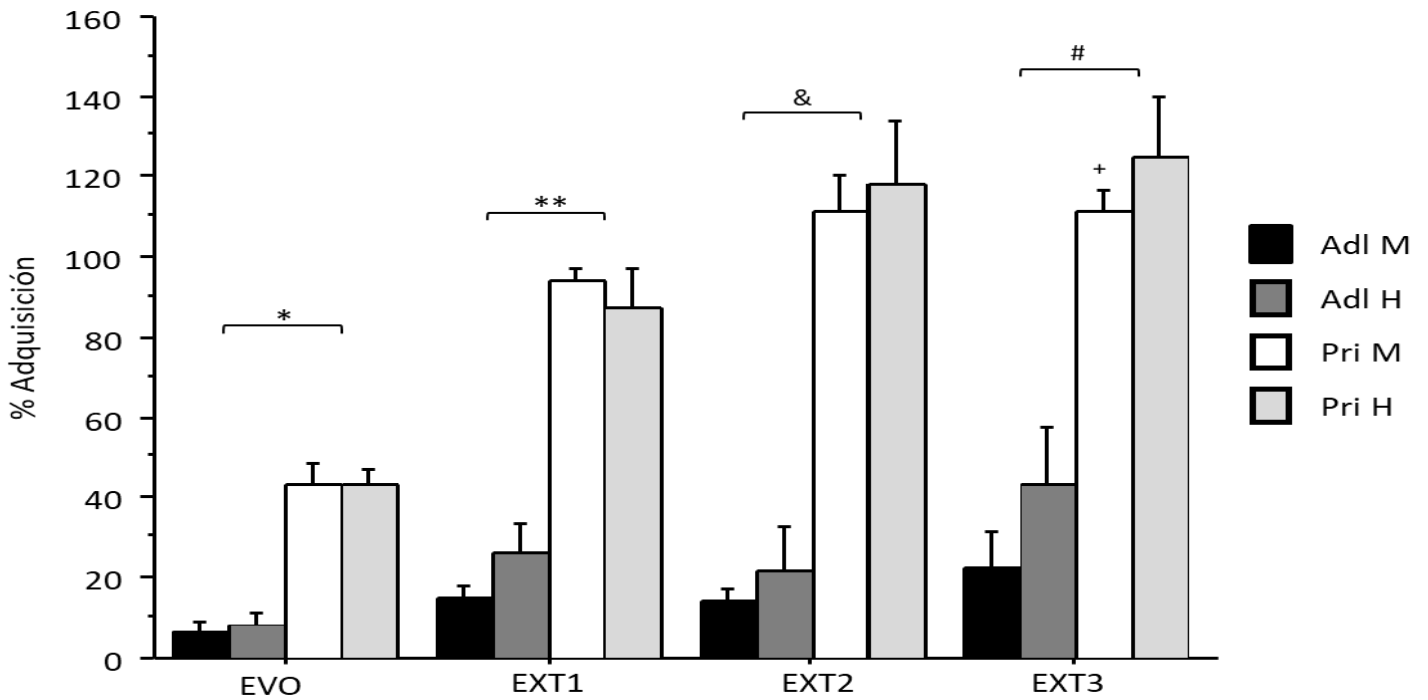


Figura 17. Consumos de sacarina durante el CAS (1:00-1:20 pm) expresados en % de adquisición y separados por esquema y por sexo. Machos y hembras del esquema *ad libitum* registran un CAS de intensidad fuerte y siguen un proceso de extinción retardado $p < 0.001$ ADQ vs EXT1-3. En el esquema privado ambos sexos se comportan de forma similar y extinguen por completo desde la primera sesión de extinción $p > 0.05$ ADQ vs EXT1-3, y específicamente los machos alcanzan una respuesta apetitiva en la última sesión de extinción $+p < 0.05$ EXT3 vs ADQ. La magnitud del CAS en el esquema *ad libitum* es mayor que en el esquema privado para ambos sexos $*p < 0.0001$ EVO Adl vs EVO Pri; además difieren en el proceso de extinción siendo mucho más rápido en el esquema privado y retardado para el *ad libitum* $**p < 0.001$ EXT1 Adl vs Pri, $&p < 0.001$ EXT2 Adl vs Pri, $\#p < 0.001$ EXT3 Adl vs Pri. Adl M (n=10), Priv M (n=10), Adl H (n=10), Priv H (n=10).

OBJETIVO 2

Con el objetivo de evaluar si el grado de saciedad de líquidos afecta la asociación de estímulos durante la adquisición o la expresión de la memoria aversiva durante la evocación se decidió caracterizar el mismo modelo de CAS intercambiando esquemas.

- **Cuando la adquisición del CAS es bajo un esquema de privación y la evocación es *ad libitum* la aversión es de la misma magnitud con respecto a un esquema *ad libitum* constante.**

Después de realizar una ANOVA de una vía para cada sexo (Figura 17 incisos a) y b) machos; incisos c) y d) hembras) no se encontraron diferencias significativas en la sesión de evocación ni en las sesiones de extinción entre el esquema Privado-*Ad libitum* y su respectivo control, el esquema *Ad libitum-Ad libitum* ($p > 0.05$), lo cual indica una memoria aversiva similar independiente del estado de saciedad con el que se asocian los estímulos.

- **Cuando la adquisición del CAS es bajo un esquema *ad libitum* y la evocación es bajo un esquema de privación la expresión de la memoria es menor con respecto a un esquema de privación constante.**

En cambio el grado de aprendizaje fue menor (Machos: $F_{3,36} = 28.498$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EVO privado-privado y *ad libitum*-privado, $p < 0.05$) y con un proceso de extinción más rápido (Machos: $F_{3,36} = 33.175$ EXT1, 27.962 EXT2, 25.511 EXT3, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EXT1-3 privado-privado y *ad libitum*-privado, $p < 0.05$) en el esquema *ad libitum*-privado machos (Figura 18 incisos a) y b) comparado con su control privado-privado y, pese a que una prueba ANOVA de dos vías confirmó que no existen diferencias debidas al sexo en estos resultados ($F_{1,78} = 0.135$, $p = 0.71$), se encontró que las hembras de este esquema cruzado Figura 18 incisos c) y d) no presentan aversión (ADQ vs EVO $p = 0.10$; $p > 0.05$) y por lo tanto en las

sesiones de extinción se habla de una memoria apetitiva más que de un proceso de extinción (Hembras: $F_{3,36} = 13.646$ EVO, 25.743 EXT1, 31.774 EXT2, 13.519 EXT3, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EVO, EXT1-3 privado-privado y *ad libitum*-privado, $p < 0.05$).

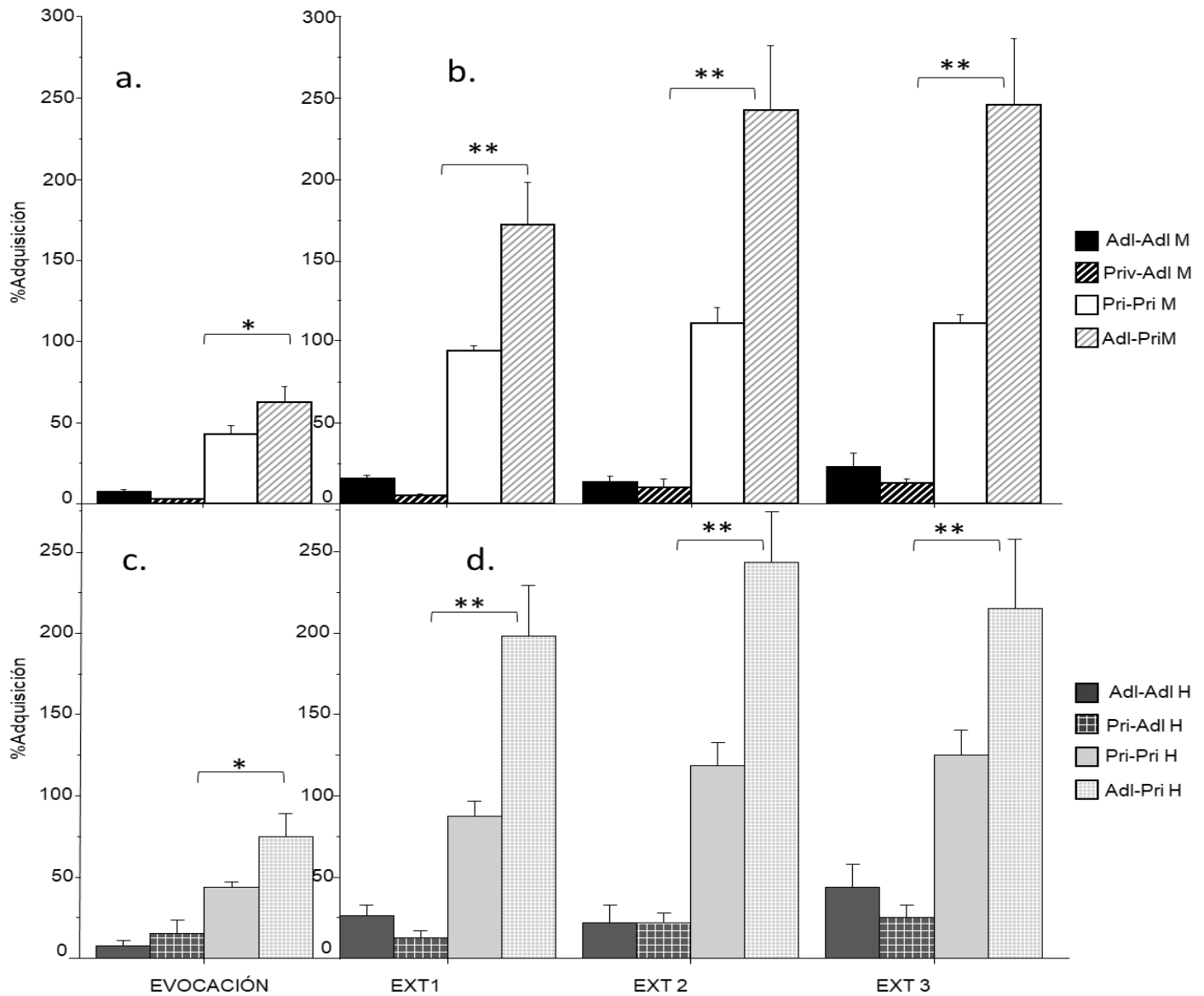


Figura 18. Consumos normalizados con respecto a la adquisición para los esquemas cruzados y los esquemas control durante el CAS. En ambos sexos a) machos y c) hembras, cuando la adquisición se realiza en condiciones privadas y la evocación en condiciones *ad libitum* (Pri-Adl, $n = 10$ para cada sexo), la intensidad de la CAS es similar al esquema control constante *ad libitum* (Adl-Adl, $n = 10$ para cada sexo); no se encontraron diferencias significativas debidas al sexo ($p > 0.05$). Por otro lado, si la adquisición se realiza bajo condiciones *ad libitum* y la evocación bajo privación (Adl-Pri, $n = 10$ para cada sexo) la magnitud del CAS es menor que el esquema control privación constante (Pri-Pri, $n = 10$ para cada sexo) * $p < 0.01$ EVO Adl-Pri vs

Pri-Pri, incluso las hembras de este esquema cruzado no muestran aversión $p > 0.05$ ADQ vs EVO. Además, el proceso de extinción en machos b) del esquema Ad libitum-Privado cruzado se acelera comparado con su control Privado-Privado $**p < 0.0001$ EXT1-3 Pri-Adl vs Pri-Pri, en hembras d) se puede hablar de una respuesta apetitiva $** p < 0.01$ EXT1-3 Pri-Adl vs Pri-Pri (media \pm SEM). No se encontraron diferencias significativas entre sexos $p > 0.05$.

OBJETIVO 3

- **En el esquema ad libitum RAMH disminuye la respuesta apetitiva a sacarina y acelera el proceso de extinción.**

Se aplicó una prueba de ANDEVA de medidas repetidas de los consumos en mL durante el CAS para cada grupo del esquema *ad libitum*, los resultados obtenidos indican que existe una respuesta apetitiva a sacarina en ambos grupos (RAMH y SALINA) observada por el mayor consumo de sacarina el día de la adquisición comparado con el consumo de agua durante la línea basal previa ($p < 0.0001$), además, la magnitud de la memoria aversiva es fuerte para ambos grupos al comparar los consumos el día de la adquisición con los del día de la evocación ($p < 0.0001$); pero al contrastar los consumos en las extinciones con los del día de la adquisición se tiene que RAMH acelera el proceso de extinción recuperando el nivel consumido el día de la adquisición desde la segunda sesión ($p > 0.05$), en comparación con el grupo salina que mantiene un proceso de extinción retardado ($p < 0.0001$) (Salina $F_{5, 15} = 25.58$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre ADQ y LB5, EVO, EXT1-3, $p < 0.05$) (RAMH $F_{5, 16} = 8.570$, $p < 0.001$; diferencias significativas entre ADQ y LB5, EVO, EXT1, $p < 0.05$).

Después, se compararon los dos grupos con una prueba ANDEVA de dos vías, la cual mostró diferencias en los días de prueba debidas a la inyección, donde el grupo RAMH registra una menor respuesta apetitiva ($p < 0.05$) ($F_{1, 5} = 4.775$, $p < 0.001$; diferencias significativas entre ADQ RAMH y SALINA, $p < 0.05$) comparado con el grupo control SALINA.

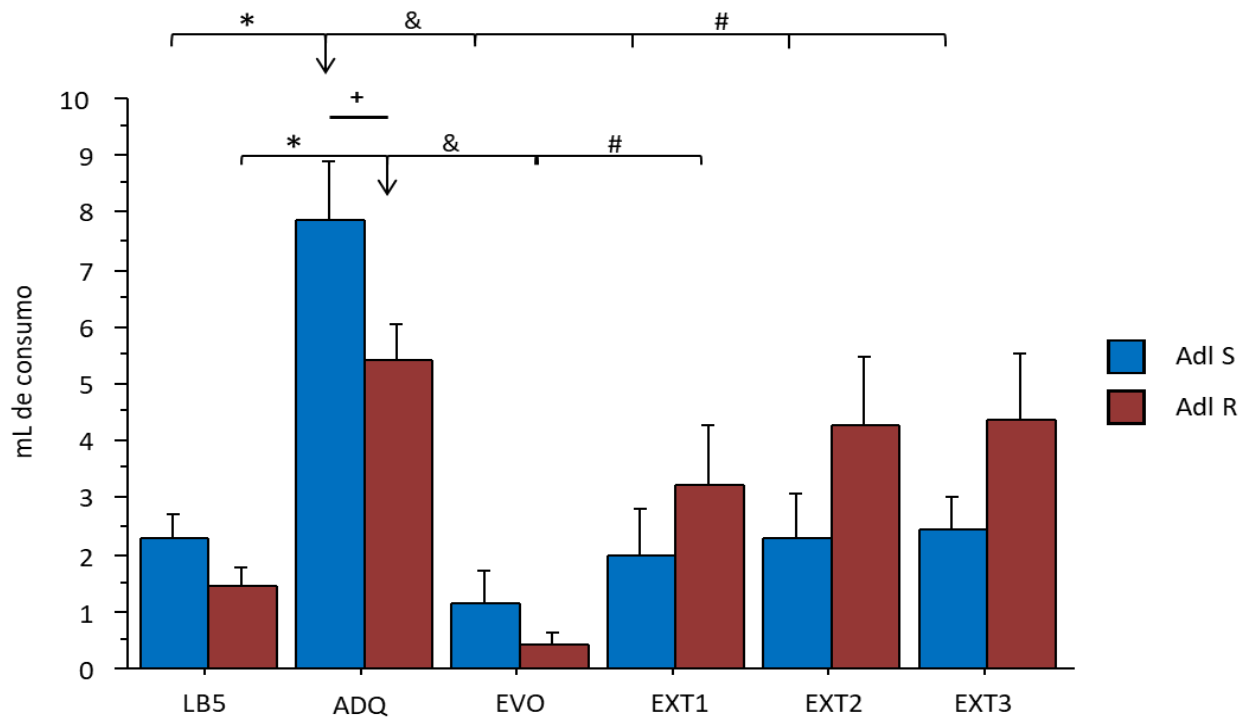


Figura 19. Consumo de sacarina en mL durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema *ad libitum* control y fármaco. Existe una respuesta apetitiva a sacarina el día de adquisición en ambos grupos (salina y RAMH) * $p < 0.0001$ ADQ vs LB5, aunque el grupo RAMH registra una menor respuesta comparado con el control salina + $p < 0.05$ ADQ Adl S vs Adl R. La intensidad del CAS en ambos grupos es fuerte & $p < 0.0001$ ADQ vs EVO, y el proceso de extinción es retardado para el grupo *ad libitum* salina # $p < 0.0001$ ADQ vs EXT 1-3, en cambio, el grupo RAMH extingue por completo desde la segunda sesión de extinción # $p < 0.05$ ADQ vs EXT1, $p > 0.05$ ADQ vs EXT2-3 (media \pm SEM) Adl S (n=16), Adl R (n=17).

- **En el esquema privado RAMH interfiere con la respuesta apetitiva a sacarina y tiende a disminuir la memoria aversiva actualizándola rápidamente en apetitiva.**

Se analizaron por separado los consumos en mL durante el CAS de los grupos RAMH y salina del esquema privado, después de aplicar una ANDEVA de medidas repetidas se encontró que el grupo SALINA presenta una respuesta apetitiva a sacarina el día de la adquisición ($p < 0.01$) mientras que RAMH no muestra esta respuesta ($p > 0.05$). Además, se observó que tanto RAMH como SALINA generan una memoria aversiva ($p < 0.001$), en cuanto a las extinciones ambos grupos extinguen

completamente desde la primera sesión de extinción ($p > 0.05$) pero se observó el retorno a la respuesta apetitiva, superando los consumos del día de la adquisición en el grupo RAMH durante la última sesión de extinción ($p < 0.01$). (Salina $F_{5, 17} = 24.65$ $p < 0.0001$; diferencias significativas entre ADQ y LB5, EVO, además entre EVO y EXT1-3, $p < 0.05$), (RAMH $F_{5, 18} = 19.02$, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre ADQ y EVO, además entre EVO y EXT1-3, $p < 0.05$).

Después, al comparar los consumos durante el CAS de ambos grupos con la prueba estadística ANDEVA de dos vías no se mostraron diferencias significativas en evocación ($F_{1, 5} = 0.629$, $p = 0.67$); resultados que cambian al normalizar los consumos como se muestra más adelante.

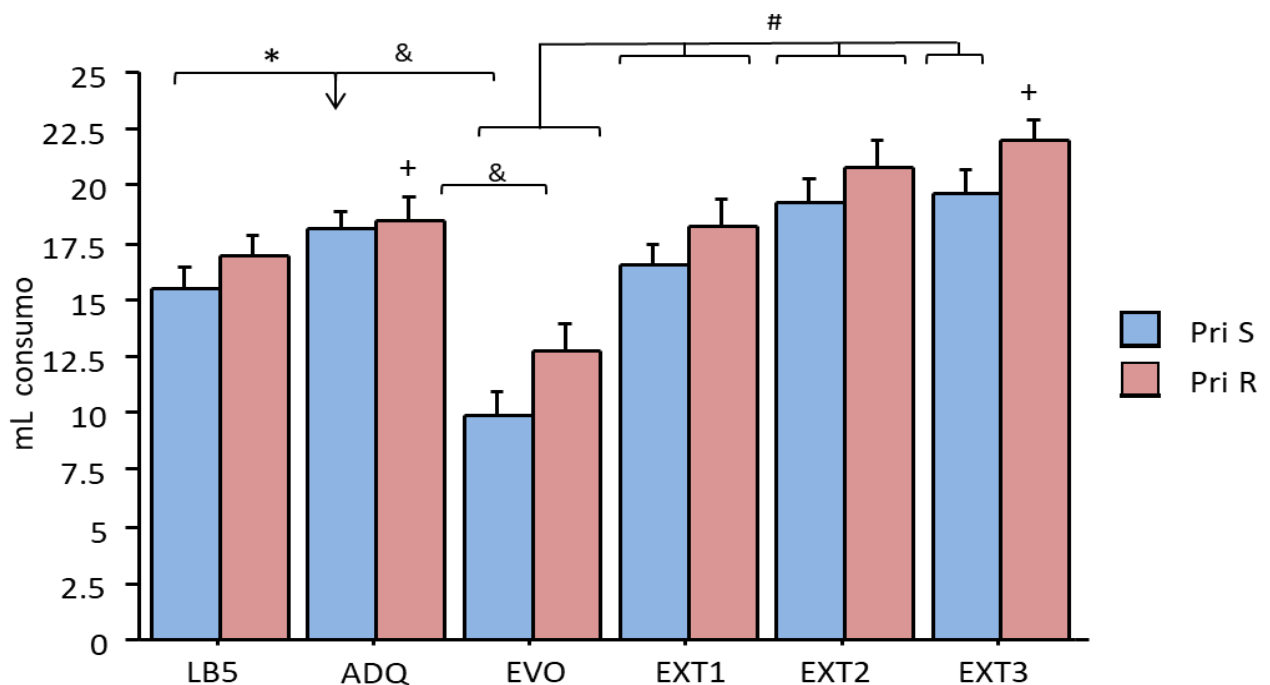


Figura 20. Consumo de sacarina durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema privado control (SALINA) y fármaco (RAMH). El consumo de sacarina el día de la adquisición es similar al consumo basal de agua para el grupo RAMH $p > 0.05$, en cambio en el grupo Salina se registra una respuesta apetitiva $*p < 0.01$ ADQ vs LB5. En ambos grupos se genera una memoria aversiva a sacarina al comparar el consumo del día de ADQ con el de EVO $&p < 0.001$ ADQ vs EVO. El proceso de extinción es acelerado en ambos grupos extinguiendo completamente desde la primera sesión de extinción al registrarse consumos similares al día de adquisición $p > 0.05$ ADQ vs EXT1 y diferencias significativas marcadas con respecto a la evocación $\#p < 0.0001$ EVO vs EXT 1-3. Además de la extinción, el grupo RAMH registra una respuesta apetitiva el día de la EXT3 $+p < 0.01$ ADQ vs EXT3. Pri Salina ($n = 18$), Pri RAMH ($n = 19$) (media \pm SEM).

- **RAMH debilita la memoria aversiva en el esquema privado mientras que en el esquema *ad libitum* solo acelera el proceso de extinción simulando los resultados en condiciones privadas**

Para poder comparar ambos esquemas, *ad libitum* y privado, al igual que en los resultados de caracterización del CAS, se normalizaron los consumos de cada sesión con respecto al consumo que se tuvo el día de la adquisición, siendo este consumo considerado como el 100%. Después se aplicó una ANOVA de medidas repetidas para cada grupo, encontrando los mismos resultados ya presentados anteriormente en cada esquema. Esquema *Ad libitum* (Salina $F_{4, 15} = 46.40$ $p < 0.0001$), (RAMH $F_{4, 16} = 11.43$, $p < 0.0001$); esquema Privado (Salina $F_{4, 17} = 29.93$, $p < 0.0001$) (RAMH $F_{4, 18} = 19.34$, $p < 0.0001$).

Posteriormente, se realizó una prueba ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos, y se encontró que efectivamente RAMH debilita la memoria aversiva en el esquema privado ($p < 0.05$) al comparar con su control salina, además induce una recuperación de la respuesta apetitiva más rápida, desde la segunda sesión de extinción ($p < 0.05$), mientras que eso mismo sucede en la última sesión de extinción para el grupo control. La magnitud del CAS en el esquema *ad libitum* no se ve afectada por RAMH ($p = 0.77$), teniendo mayor magnitud de la memoria aversiva al comparar con el grupo RAMH del esquema privado ($p < 0.0001$), en cambio al hablar de extinciones se observó que RAMH acelera el proceso de extinción en el esquema *ad libitum* ($p < 0.01$) comparado con su control salina e induce una extinción similar al grupo control privado desde la segunda sesión de extinción ($F_{3, 66} = 21.127$ EVO, 14.879 EXT1, 11.785 EXT2, 12.190 EXT3, $p < 0.0001$; diferencias significativas entre EVO privado salina y RAMH, EXT1-3 *ad libitum* salina y RAMH).

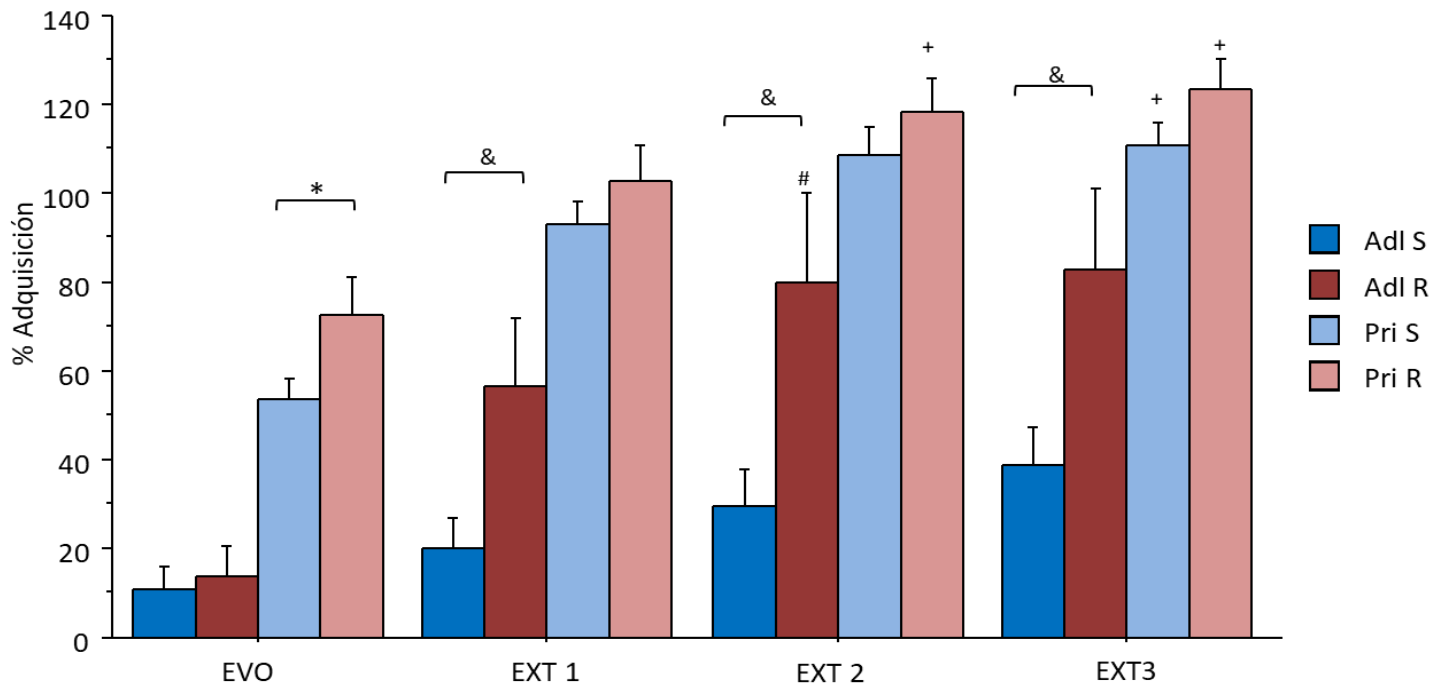


Figura 21. Consumos de sacarina durante el CAS (1:00-1:20 pm) expresados en % de adquisición y separados por grupos. En el esquema *ad libitum* ambos grupos (Salina y RAMH) presentan el mismo alto grado de aversión $p > 0.05$ EVO Adl S vs Adl R, pero el proceso de extinción es más acelerado en el grupo RAMH $& p < 0.01$ EXT1-3 Adl S vs Adl R, extinguiendo por completo desde la sesión de EXT2 # $p > 0.05$ ADQ vs EXT2. En el esquema privado, RAMH debilita la memoria aversiva comparado con el grupo control salina $* p < 0.05$ EVO Pri S vs Pri R, y aunque ambos grupos extinguen desde la primer sesión de extinción $p > 0.05$ ADQ vs EXT1, el grupo RAMH retoma la respuesta apetitiva más rápido, desde la segunda sesión de extinción, mientras esto mismo sucede en la sesión final para el grupo control $+ p < 0.05$ ADQ vs EXT2-3. La magnitud del CAS en el esquema *ad libitum* es mayor que en el esquema privado para ambos grupos $p < 0.0001$ EVO Adl vs EVO Pri; además difieren en las sesiones de extinción siendo mayores los porcentajes para el esquema privado $p < 0.01$ EXT1-3 Adl S vs Pri S y R, excepto el grupo *ad libitum* RAMH que extingue de forma similar al grupo control privado salina a partir de la segunda sesión de extinción $p > 0.05$ EXT2-3 Adl R vs Pri S. Adl S (n=16), Adl R (n=17), Pri S (n=18), Pri R (n=19) (media \pm SEM).

DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DEL CAS BAJO UN ESQUEMA DE SACIEDAD DE LÍQUIDOS

El paradigma clásico del CAS tiene en su protocolo un horario de privación de consumo de líquidos que puede ser hasta de 24 horas, y que es mantenida a lo largo de todo el procedimiento (Purón-Sierra & Miranda, 2014; Purón-Sierra et al., 2010). El objetivo de la privación es lograr a través de la sed, animales motivados para realizar ciertas tareas de aprendizaje (Salary, 1994; Toth & Gardiner, 2000) como es el caso del CAS donde se requiere obtener medidas de consumo que puedan ser leídas fácilmente. Aún con todos los años que tiene este paradigma, los efectos de la restricción de líquidos en el CAS han sido poco evaluados.

Los resultados de la presente investigación demuestran que es posible caracterizar un CAS bajo un esquema *ad libitum* de líquidos obteniendo medidas legibles de consumo. El diseño experimental establecido para caracterizar el CAS bajo un esquema *ad libitum*, entre otras particularidades que surgieron en el transcurso, hicieron posible cumplir con el objetivo; como el mantenimiento de un consumo constante de agua en las líneas basales para ambos sexos durante los horarios seleccionados; resultado de realizar los experimentos durante la fase oscura en la cual se bebe el porcentaje más alto de líquidos (Stoynev, 1981), además el rango de horarios planteado permitió evitar los picos de consumo máximos que se presentan después de apagar las luces y antes de encenderlas (Stoynev, 1981; Velasco Plaza, G-Granda, & Cachero, 1993).

Por otra parte machos y hembras registran consumos indexados al peso corporal similares en los horarios establecidos, dato no coincidente con una revisión donde las hembras tienen índices más elevados que los machos (McGivern, Henschel, Hutcheson, & Pangburn, 1996), la posible explicación de esta discrepancia es la edad, pues trabajaron con ratas 7 semanas mayores a las nuestras.

Suponiendo que una de las causas por las que no se estudia el CAS en condiciones *ad libitum* de líquidos sea la posibilidad de no obtener medidas legibles de

consumo durante la adquisición que dificulten el condicionamiento, puesto se conoce que la cantidad consumida de sabor novedoso tiene una función directa con la fuerza de aversión (Bond & Di Giusto, 1975); nosotros encontramos que existe una respuesta apetitiva a sacarina en ambos sexos que aseguró un consumo inicial y, según Bermúdez-Rattoni (2004), algunos estímulos gustativos novedosos la inducen, llevando a una preferencia medida como un incremento en el consumo, de forma tal que no observamos la respuesta neofóbica característica, es decir, ese cierto grado de indecisión para consumir el sabor novedoso (Federico Bermúdez-Rattoni, 2004), además algunas cepas de ratas muestran menos neofobia que otras (Foy & Foy, 2016) como lo demostró Mitchell (1976) siendo la rata albina menos neofóbica que la parda y la silvestre. Ambos sexos presentaron dicha respuesta apetitiva a sacarina aunque la literatura indica que las hembras tienen una respuesta mayor, diferencia que ya ha sido estudiada y establecida como una preferencia por soluciones dulces que parece estar regulada por hormonas gonadales, en particular el estradiol (Clarke & Ossenkopp, 1998).

Experimentos previos a establecer el diseño experimental definitivo del CAS mostraron que el tiempo de exposición al sabor novedoso durante la adquisición y las extinciones es importante, ya que en la caracterización del esquema privado, al evaluar los consumos registrados durante una hora no fue posible observar aversión, en cambio el consumo registrado durante los primeros 20 minutos sí la reflejó de manera robusta; una explicación podría ser que durante los primeros minutos se procese la información mnemónica del sabor y pasado este tiempo prevalezca la respuesta motivacional provocada por sed, planteamiento que necesita ser comprobado. Abocándonos a los antecedentes, varios son los parámetros del paradigma del CAS que pueden ser manipulados y que afectan la respuesta condicionada en el aprendizaje, en cuanto al tiempo, se ha reportado que la pre exposición al estímulo condicionado durante una hora antes de condicionar, típicamente reduce el aprendizaje del CAS (Foy & Foy, 2016) es decir, el tiempo de exposición afecta la fuerza del CAS (Fouquet, Oberling, & Sandner, 2001). Además otros resultados reportados indican que el acceso al estímulo condicionado durante 2 horas no permite observar aversión en ratas macho privadas (Chambers et al., 1981).

MAGNITUD DE LA MEMORIA AVERSIVA EN MACHOS Y HEMBRAS DURANTE EL CAS

Nuestros resultados mostraron que la magnitud del CAS bajo un esquema *ad libitum* es fuerte y con un proceso de extinción retardado, resultados que no presentan diferencias debidas al sexo. Hallazgos que coinciden con estudios anteriores en los que aseveran las diferencias debidas al sexo durante la adquisición del CAS no son aparentes, es decir la adquisición es conservada y persistente (Bethus et al., 2005; Rinker et al., 2008).

Por otro lado Chambers y colaboradores (1981) demostraron la existencia de un dimorfismo sexual con respecto a la adquisición de la aversión al sabor, con una proporción marcada de machos que adquieren la aversión comparada con hembras. Ellos presentaron como sabor novedoso sacarosa al 10%, por un tiempo de 2 horas, además de que se hicieron múltiples sesiones de asociación de los estímulos alternados con días de recuperación. Este dimorfismo sexual parece ser debido a los efectos activacionales de la testosterona (Chambers et al., 1976) ya que machos gonadectomizados reducen su tendencia a adquirir la aversión, lo que puede ser contrarrestado con inyecciones de propionato de testosterona.

Reafirmando lo anterior, en un CAS con período interestímulo de 4 horas y pruebas de preferencias a sacarina con 2 botellas realizadas durante 20 días, encontraron una aversión mayor y un proceso lento de extinción en ratas adultas macho comparadas con hembras, las cuales mostraron velocidades de extinción más rápidas y mayor preferencia a sacarina. Diferencia sexual que se vio más pronunciada en ratas de 8 semanas de edad (Foy & Foy, 2016), además de que la castración de machos acelera la extinción, mientras que la ovariectomía no tiene consecuencias (Chambers & Sengstake, 1976).

En general los resultados de investigaciones previas muestran que en condiciones de no privación las hembras típicamente extinguen más rápido que los machos; consumen la solución dulce en menos tiempo y lo hacen en cantidades grandes (Chambers & Sengstake, 1976; Chambers et al., 1981; Randall-Thompson & Riley, 2003).

Según Chambers & Sengstake (1976) las ratas hembra alcanzan una extinción completa de la memoria aversiva desde la sesión número doce, mientras lo mismo sucede con los machos en la sesión número cuarenta bajo la presentación del estímulo condicionado (sacarosa) por un periodo de dos horas. Lo mismo se encontró en ratones silvestres parcialmente privados, pero con una extinción más rápida, machos tardaron 4 días y hembras 3 días. (Choleris et al., 2000). Tal vez para poder observar esas diferencias en nuestros resultados harían falta más sesiones de extinción, además de tener en cuenta otros factores que pueden influir como el tiempo de presentación del estímulo condicionado.

Existen diferencias marcadas entre los experimentos discutidos y la caracterización que hicimos, que son importantes de mencionar pues al interpretar los resultados se deben tomar en cuenta las adaptaciones al modelo debido a que la liberación de neurotransmisores y la actividad celular puede cambiar significativamente dependiendo del método usado (Miranda, 2012).

De acuerdo a los antecedentes el CAS está influenciado por las diferencias debidas al sexo, puesto que la reactividad al sabor, las propiedades recompensantes y las respuestas aversivas son influenciadas por las hormonas sexuales (Clarke & Ossenkopp, 1998) y como resultado es difícil estudiar las diferencias, aunque existan; complicando más la situación se tiene que la administración exógena de hormonas sexuales como el estradiol también tiene propiedades inductoras de malestar (náusea, malestar gástrico) las cuales en turno pueden influenciar el CAS (Yuan & Chambers, 1999a). Lo anterior nos lleva a la conclusión de cuán importante es considerar el tipo de aprendizaje sobre el que se quiere estudiar dimorfismo sexual porque en este caso representa una manera en que el animal aprende a seleccionar una dieta disponible y adecuada en su ambiente (Choleris et al., 2000) lo cual tiene un valor adaptativo, independiente del sexo.

Por otra parte, al caracterizar el esquema privado (CAS tradicional) observamos una memoria aversiva robusta y un proceso de extinción acelerado similar en machos y hembras. Estos datos coinciden con los obtenidos por Chambers & Sengstake (1976; 1979), que sugieren que el dimorfismo sexual de la conducta

observado en un CAS sin privación de líquidos se ve oscurecido por el estado privado, y a pesar del estado de privación que se tenga durante la adquisición.

La pregunta inicialmente planteada fue si el grado de saciedad de líquidos tiene efectos en el aprendizaje y la memoria del CAS, nuestros resultados mostraron que la magnitud del CAS es mayor en el esquema *ad libitum* comparado con el esquema privado tanto para machos como para hembras, además de existir como ya se discutió anteriormente, un proceso de extinción retardado bajo el esquema *ad libitum* y acelerado bajo privación. Resultados coincidentes con los hallazgos de Grote & Brown (1973) que, si bien no trabajaron con un esquema de acceso libre a líquidos, compararon el CAS bajo diferentes grados de privación, ellos encontraron que la extinción de la memoria aversiva es más rápida en ratas pardas bajo una alta privación (23 horas), en comparación con aquellas con un nivel bajo de privación (10 horas), llegando a la misma conclusión: el consumo del sabor condicionado sin la presentación del malestar durante la extinción, podría estar dando una mayor actualización acerca de las consecuencias postingestivas de la sacarina en las ratas altamente privadas.

ESQUEMAS CRUZADOS DE LÍQUIDO *AD LIBITUM* O DE PRIVACIÓN DURANTE LA ADQUISICIÓN

Después de analizar el efecto que tiene el grado de saciedad de líquidos sobre la memoria aversiva surgió la pregunta acerca de dónde es que está participando la sed, ¿está mediando propiamente la formación de la memoria aversiva o tiene efectos en la evocación?.

Para dar respuesta se trabajó con esquemas cruzados, en los cuales se adquiriere en un esquema contrario al esquema en el que se evoca. Inicialmente se hipotetizó que si la adquisición del CAS es bajo un esquema *ad libitum* la aversión en la evocación bajo privación sería mayor que en un esquema de privación constante, los resultados encontrados demuestran lo contrario, es decir, la magnitud del CAS fue menor, predominando durante la evocación la necesidad de satisfacer la demanda de líquidos sobre la aversión. Resulta importante mencionar que pese a no haber

diferencias entre sexos, las hembras no registraron aversión lo cual nos habla de la influencia marcada del estado motivacional en la expresión del CAS.

La sed al ser una motivación primaria innata (Escobar & Aguilar, 2002) y como lo menciona Hebb (1955) en su definición de motivación, es entonces una fuente de fuerza que mantendrá dominada temporalmente a un conjunto particular de respuestas sobre otras y dará cuenta de la continuidad y dirección del comportamiento.

También se planteó que cuando la adquisición del CAS es bajo un esquema de privación, la aversión en la evocación en condiciones *ad libitum* sería menor que en un esquema *ad libitum* constante, inesperadamente la memoria aversiva fue de la misma magnitud. Lo cual indica que la adquisición/ formación de la memoria aversiva no está mediada por el componente de sed; en cambio la evocación si depende del grado de saciedad. Es decir, el estado motivacional durante la evocación compite con la memoria aversiva (Bures et al., 1998).

Al parecer no importa el estado de saciedad en el que se asocien los estímulos, la memoria del CAS es robusta e independiente de este factor, pero si el estado motivacional provocado por sed participa durante la evocación la magnitud del CAS será menor y habrá una actualización más rápida de la memoria apetitiva.

En ciertas tareas conductuales se ha demostrado que la sed constituye una mejor condición para la retención del proceso aprendizaje-memoria (Komaki; 2004), pero depende del tipo de aprendizaje a evaluar, la conclusión anterior se obtuvo de un experimento de laberinto radial donde las ratas privadas de agua dominan la tarea de aprendizaje más rápido que las privadas de alimento, es decir el estado de sed facilita el aprendizaje al ser un componente motivacional, en el CAS el efecto de la sed parece estar funcionando al contrario, ya que en lugar de facilitar una mayor memoria aversiva compite con ella disminuyendo su magnitud.

Por otro lado no se tiene certeza de que todos los sujetos privados tendrán el mismo nivel de motivación dados los diferentes mecanismos de regulación que se sugiere existen (Toth & Gardiner, 2000). Es importante considerar que existen reguladores fisiológicos y reguladores conductuales, los primeros responden

moderando los niveles de deshidratación al conservar agua y excretar orina concentrada, mientras que los segundos beberán más agua y excretarán orina diluida. Entonces los individuos que son reguladores fisiológicos pueden ser sujetos problemáticos en algunos modelos de motivación ya que no modifican su conducta (Toth & Gardiner, 2000). Esos son los aspectos fisiológicos de la sed que pueden influir en el CAS en condiciones privadas, lo que sucede a nivel cerebral no es aún menos importante.

Allen y colaboradores (2019), con tecnología de registros electrofisiológicos extracelulares registraron la actividad de aproximadamente 24,000 neuronas a través de 34 regiones cerebrales durante la conducta motivada por sed, ellos encontraron que existe una representación global del estado motivado por sed en todo el cerebro que parece dar puerta a la propagación de información sensorial estableciendo un escenario de condiciones iniciales distribuidas a través de muchas regiones cerebrales, y que determina las subsecuentes dinámicas neurales evocadas por estímulos sensoriales y la transformación en una salida conductual. También encontraron que el estado de saciedad modula la actividad basal espontánea de las neuronas de muchas regiones cerebrales, cuando el animal está saciado existe una “barrera energética” a través del cerebro que previene las mismas dinámicas que llevan a la ejecución de la conducta.

Entonces usar la privación como una herramienta motivacional para el entrenamiento conductual es un reto, ya que implica la introducción de numerosas variables, los resultados obtenidos en este proyecto pueden contribuir a la investigación básica del aprendizaje y la memoria bajo un esquema de libre acceso de líquidos que minimice el malestar provocado en los animales (Nakajima, 2018).

EFFECTOS DEL AGONISTA DE LOS RECEPTORES PARA HISTAMINA H₃, RAMH, EN LA CI DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS

Dado que el sistema histaminérgico participa en la conducta motivada por sed (Contreras et al., 2016), el siguiente propósito de esta investigación fue conocer cuál es la función de la histamina, en específico de los receptores histaminérgicos H₃ presentes en la CI, durante la formación de la memoria aversiva al sabor bajo esquemas con diferente grado de saciedad de líquidos, es decir en condiciones *ad libitum* o de privación que previamente caracterizamos.

El grupo del esquema *ad libitum* tratado con el agonista histaminérgico RAMH en la CI antes de la adquisición del CAS, mostró una disminución de la respuesta apetitiva a sacarina el día de la adquisición comparado con el grupo control que fue inyectado con solución salina, una situación parecida fue observada en el esquema privado donde al comparar el grupo inyectado con RAMH con su respectivo control salina no se observó la respuesta apetitiva a sacarina.

Algunos estímulos gustativos novedosos inducen una respuesta apetitiva, (Núñez-Jaramillo et al., 2010) y la activación colinérgica en el reconocimiento de un sabor novedoso está muy bien documentada (Clark & Bernstein, 2009). Se ha reportado que en la CI existen receptores histaminérgicos H₃ colocalizados postsinápticamente en células gabaérgicas y que facilitan la liberación de GABA, la cual parece inhibir la liberación de ACh en la corteza (Bacciottini, Passani, Mannaioni, & Blandina, 2001). Y como lo sugiere Purón-Sierra & Miranda (2014), es posible que exista una interacción GABA/ACh durante la formación de la memoria del sabor que es regulada por la actividad histaminérgica. De forma tal que la disminución o no presencia de la respuesta apetitiva en ambos esquemas, *ad libitum* y privado podría ser explicada de la siguiente manera: la inyección de RAMH, agonista histaminérgico H₃ en la CI provoca que el sabor de la sacarina en lugar de procesarse como novedoso se procese como familiar, disminuyendo o eliminando así la respuesta apetitiva.

Otra posible explicación es que la inyección del agonista histaminérgico H₃ RAMH en la CI esté alterando la percepción del sabor cuando se prueba sacarina por primera vez en la adquisición y con ello disminuya la respuesta apetitiva mediante un

mecanismo que desconocemos. Se ha demostrado que existe una relación entre la liberación de histamina y la información gustativa. Cuando las ratas se infunden intraoralmente con quinina se incrementa la liberación de histamina del hipotálamo. Por otro lado la liberación de histamina disminuye por la administración de soluciones de sacarina y sacarosa (Treesukosol et al., 2005).

Se ha descrito que los receptores para histamina tipo H_3 están implicados en funciones cerebrales superiores, como la cognición, el aprendizaje y la memoria, el sueño, el apetito y el metabolismo energético (Haas et al., 2008). La implicación de la histamina cerebral en conductas apetitivas y aversivas favorece el estado de alerta y una mayor preparación para actuar y gastar energía (Akins & Bealer, 1993). La activación temprana del TMN está presente en la conducta apetitiva de búsqueda de agua en ratas sedientas, sugiriendo un papel de las neuronas histaminérgicas en esta conducta motivada (Contreras et al., 2016). Es entonces factible suponer que la actividad histaminérgica del TMN cuyas proyecciones llegan hacia CI (Haas et al., 2008) es mayor en el estado de privación que en estado de saciedad de líquidos.

Los resultados de esta investigación mostraron que la inyección de RAMH en la CI antes de la adquisición del CAS debilita la formación de la memoria aversiva en el esquema privado al comparar con su respectivo control inyectado con salina, mientras que en el esquema *ad libitum* no tiene tal efecto, presentando una aversión de la misma magnitud que su control privado salina, y solo se encontró que acelera el proceso de extinción, simulando un proceso de extinción semejante al grupo control salina privado. Los resultados del esquema privado son similares a los obtenidos previamente por Purón-Sierra y colaboradores (2010) donde demuestran que la inyección del agonista del receptor H_3 , RAMH, interrumpe la formación de la memoria aversiva al sabor en un CAS con acceso restringido de líquidos, es decir en condiciones de privación. Si bien nosotros no observamos una interrupción total de la formación de la memoria aversiva, si observamos que se vio debilitada por la inyección de RAMH, esta diferencia en los resultados puede ser explicada por las adaptaciones a los modelos de CAS, en nuestro caso consideramos la exposición al estímulo condicionado durante una hora y no durante 20 minutos.

En este sentido, se ha propuesto que la histamina participa en diferentes tareas de aprendizaje asociativo, principalmente mediante la regulación de la liberación de neurotransmisores como ACh, dopamina y GABA (Passani et al., 2017). Específicamente, la disminución de la liberación cortical de ACh provocada por la histamina también tiene un impacto significativo en la formación de memoria aversiva del sabor, ya que una inyección de RAMH en la CI deterioró el CAS y disminuyó simultáneamente la liberación de ACh en la CI. Este daño puede ser explicado por la presencia de receptores histaminérgicos H₃ en células gabaérgicas de la CI, sugiriendo una posible interacción GABA/ACh durante la formación de la memoria del sabor que es regulada por la actividad histaminérgica (Purón-Sierra & Miranda, 2014).

El mecanismo expuesto no explica los resultados obtenidos bajo el esquema *ad libitum* de líquidos, donde la formación de la memoria aversiva no se ve afectada, pero si se acelera la velocidad de extinción, resultados que guardan cierta lógica con lo que en un inicio discutimos: tanto el estado motivado por sed como el estado de saciedad tienen diferentes representaciones globales en todo el cerebro que determinan las dinámicas neurales evocadas por estímulos sensoriales y su transformación en diferentes conductas (Allen et al., 2019). Además, sabemos que el estado de saciedad, la homeostasis, la motivación y los cambios circadianos son a su vez regulados por la actividad histaminérgica (Haas et al., 2008).

Hallazgos recientes indican que la regulación supresiva de los heteroreceptores H₃ en la transmisión sináptica puede estar mediando la regulación de los procesos de información sensorial como la gustación y la sensación visceral en la CI, se sugiere además que los receptores H₃ están ampliamente distribuidos en la CI, más que expresados en un tipo específico de neuronas, además demostraron que están presentes no solo en terminales gabaérgicas sino también en glutamatérgicas y que su activación suprime la liberación de glutamato y de GABA de las terminales presinápticas (Takei et al., 2017).

Se ha propuesto que la histamina tiene un efecto neuromodulatorio general por su participación en diferentes tareas de aprendizaje asociativo principalmente regulando la liberación de neurotransmisores como ACh, dopamina y GABA. (Passani et al., 2017; Provensi et al., 2018).

Para poder tener una mayor comprensión acerca de como el agonismo de los receptores histaminérgicos en CI está modulando de manera diferencial la formación de la memoria aversiva en esquemas con diferente grado de saciedad (*ad libitum* o de privación) resulta necesario evaluar su función bajo esquemas cruzados que previamente hemos caracterizado, en los cuáles se adquiere en un esquema contrario al esquema en el que se evoca y con ello analizar la relación que guarda el grado de motivación y el agonismo de los receptores H₃ durante la formación de la memoria aversiva, con la posibilidad de eliminar la competencia entre el estado de sed y la memoria aversiva durante la evocación (Bures et al., 1998).

Además de evaluar el consumo se sugiere hacer estudios que aporten mayor información de la conducta ingestiva, ya que diferentes patrones en la velocidad de lengüeteo pueden generar los mismos consumos (Davis & Smith, 1988) el uso del análisis de la microestructura de lengüeteo provee un análisis detallado de la formación, generalización y extinción del CAS cuyas medidas varían en función de la retroalimentación orosensorial y, visceral que controlan el consumo. El muestreo continuo y la precisión temporal (resolución de milisegundos) proveen una oportunidad ideal para evaluar la formación del CAS (Baird, St. John, & Nguyen, 2005), además es un modelo ideal que sirve para evaluar los efectos conductuales de la administración aguda o crónica de tratamientos farmacológicos (Lin, Pierce, Light, & Hayar, 2013).

Estos resultados hacen saltar a la vista la importancia de considerar el estado de saciedad en el que estamos evaluando las diferentes tareas de aprendizaje, ya que al menos en el CAS ello puede determinar resultados con o sin intervención farmacológica completamente diferentes.

CONCLUSIONES

- Es posible caracterizar un CAS bajo un esquema de saciedad de líquidos obteniendo medidas legibles de consumo. La magnitud de la memoria aversiva al sabor (CAS) es mayor y con un proceso de extinción retardado bajo un esquema *ad libitum* comparado con el esquema de privación.
- La magnitud de la memoria aversiva y el proceso de extinción con el número de sesiones otorgadas es similar en machos y hembras durante el CAS bajo condiciones *ad libitum* de líquidos o de privación.
- La adquisición/ formación de la memoria aversiva no está mediada por el componente de sed; en cambio la evocación si depende del grado de saciedad, donde el estado motivacional compite con la expresión de la memoria aversiva.
- La administración del agonista del receptor H₃ RAMH en la CI, minutos antes de la adquisición del CAS, debilita la formación de la memoria aversiva en el esquema privado, mientras que en el esquema *ad libitum* no tiene tal efecto, y solo acelera el proceso de extinción.

En conclusión, los datos obtenidos en esta tesis nos permiten demostrar que el grado de saciedad de líquidos afecta de manera diferencial la evocación de la memoria aversiva al sabor. Además, la actividad histaminérgica en la CI podría participar bajo mecanismos diferentes en la formación de la memoria aversiva en condiciones de privación o de saciedad de líquidos.

REFERENCIAS

- Akins, V. F., & Bealer, S. L. (1993). Hypothalamic histamine release, neuroendocrine and cardiovascular responses during tuberomammillary nucleus stimulation in the conscious rat. *Neuroendocrinology*, *57*(5), 849–855.
<https://doi.org/10.1159/000126444>
- Allen, W. E., Chen, M. Z., Pichamoorthy, N., Tien, R. H., Pachitariu, M., Luo, L., & Deisseroth, K. (2019). Thirst regulates motivated behavior through modulation of brainwide neural population dynamics. *Science*, *364*(6437).
<https://doi.org/10.1126/science.aav3932>
- Andreano, J. M., & Cahill, L. (2009). Sex influences on the neurobiology of learning and memory. *Learning and Memory*, *16*(4), 248–266. <https://doi.org/10.1101/lm.918309>
- Ángulo, R. (2018). Pre-exposure Schedule Effects on Generalization of Taste Aversion and Palatability for Thirsty and Not Thirsty Rats. *Frontiers in Psychology*, *9*, 878.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00878>
- Arrang, J. M. (2007). Histamine and Schizophrenia. *International Review of Neurobiology*, *78*(06), 247–287. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)78009-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)78009-6)
- Bacciottini, L., Passani, M. B., Giovannelli, L., Cangioli, I., Mannaioni, P. F., Schunack, W., & Blandina, P. (2002). Endogenous histamine in the medial septum-diagonal band complex increases the release of acetylcholine from the hippocampus: A dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. *European Journal of Neuroscience*, *15*(10), 1669–1680. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02005.x>
- Bacciottini, L., Passani, M. B., Mannaioni, P. F., & Blandina, P. (2001). Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, *124*(2), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00230-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00230-3)
- Baird, J. P., St. John, S. J., & Nguyen, E. A. N. (2005). Temporal and qualitative

- dynamics of conditioned taste aversion processing: Combined generalization testing and licking microstructure analysis. *Behavioral Neuroscience*, 119(4), 983–1003. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.4.983>
- Bangasser, D. A., & Shors, T. J. (2007). The hippocampus is necessary for enhancements and impairments of learning following stress. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1401–1403. <https://doi.org/10.1038/nn1973>
- Beatty, W. W., & Beatty, P. A. (1970). Hormonal determinants of sex differences in avoidance behavior and reactivity to electric shock in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 73(3), 446–455. <https://doi.org/10.1037/h0030216>
- Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). Female rats are not more variable than male rats: A meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5>
- Beery, A. K., & Zucker, I. (2011, January 1). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 35, pp. 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>
- Beghdadi, W., Porcherie, A., Schneider, B. S., Morisset, S., Dubayle, D., Peronet, R., ... Mécheri, S. (2009). Histamine H3 receptor-mediated signaling protects mice from cerebral malaria. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006004>
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2007). *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging*. New York: CRC Press.
- Bermúdez-Rattoni, Federico. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bethus, I., Lemaire, V., Lhomme, M., & Goodall, G. (2005). Does prenatal stress affect

- latent inhibition? It depends on the gender. *Behavioural Brain Research*, 158(2), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.09.013>
- Beylin, A. V., Gandhi, C. C., Wood, G. E., Talk, A. C., Matzel, L. D., & Shors, T. J. (2001). The role of the hippocampus in trace conditioning: Temporal discontinuity or task difficulty? *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(3), 447–461. <https://doi.org/10.1006/nlme.2001.4039>
- Bond, N., & Di Giusto, E. (1975). Amount of solution drunk is a factor in the establishment of taste aversion. *Animal Learning & Behavior*, 3(2), 81–84. <https://doi.org/10.3758/BF03209104>
- Brem, A. K., Ran, K., & Pascual-Leone, A. (2013). Learning and memory. *Handbook of Clinical Neurology*, 116(Elsevier), 693–737.
- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). Conditioned taste aversion: Memory of a special kind. In *Oxford Psychology Series*.
- Busse, G. D., Freeman, K. B., & Riley, A. L. (2005). The interaction of sex and route of drug administration in cocaine-induced conditioned taste aversions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(4), 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.06.004>
- Chambers, K. C., Gb-, G., & Bolles, R. C. (1976). *Hormonal Influences on Sexual Dimorphism in Rate of Extinction of a Conditioned Taste Aversion in Rats The expression of a number of other sexual dimorphisms have been shown to be dependent on the gonadal hormones . These hormones have been postulated to .* 90(9), 851–856.
- Chambers, K. C., & Sengstake, C. B. (1976). Sexually dimorphic extinction of a conditioned taste aversion in rats. *Animal Learning & Behavior*, 4(2), 181–185. <https://doi.org/10.3758/BF03214032>
- Chambers, K. C., Sengstake, C. B., Yoder, R. L., & Thornton, J. E. (1981). Sexually dimorphic acquisition of a conditioned taste aversion in rats: Effects of gonadectomy, testosterone replacement and water deprivation. *Physiology and*

Behavior, 27(1), 83–88. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90303-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90303-6)

Choleris, E., Thomas, A. W., Ossenkopp, K. P., Kavaliers, M., Valsecchi, P., & Prato, F. S. (2000). Sex differences in conditioned taste aversion and in the effects of exposure to a specific pulsed magnetic field in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Physiology and Behavior*, 71(3–4), 237–249. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00323-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00323-1)

Clark, E. W., & Bernstein, I. L. (2009). Boosting Cholinergic Activity in Gustatory Cortex Enhances the Salience of a Familiar Conditioned Stimulus in Taste Aversion Learning. *Behavioral Neuroscience*, 123(4), 764–771. <https://doi.org/10.1037/a0016398>

Clarke, S. N. D. A., & Ossenkopp, K. P. (1998). Taste reactivity responses in rats: Influence of sex and the estrous cycle. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274(3 43-3). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.3.r718>

Contreras, M., Riveros, M. E., Quispe, M., Sanchez, C., Perdomo, G., Torrealba, F., & Valdes, J. L. (2016). The Histaminergic Tuberomamillary Nucleus Is Involved in Appetite for Sex, Water and Amphetamine. *PloS One*, 11(2), e0148484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148484>

Cowan, N. (2009). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? Nelson. *NIH Public Access*, 6123(07), 323–338. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00020-9).What

Crowder, R. G. (2015). *Principles of learning and memory* (Classic ed). New York: Psychology Press.

Cumming, P., Lalibert, C., & Gjedde, A. (1994). *Distribution of histamine*. 664, 276–279.

Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005). Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? *Neuroscience*, 135(3), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.068>

- Dalla, Christina, Edgecomb, C., Whetstone, A. S., & Shors, T. J. (2008). Females do not express learned helplessness like males do. *Neuropsychopharmacology*, 33(7), 1559–1569. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301533>
- Dalla, Christina, Papachristos, E. B., Whetstone, A. S., & Shors, T. J. (2009). Female rats learn trace memories better than male rats and consequently retain a greater proportion of new neurons in their hippocampi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2927–2932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809650106>
- Dalla, Christina, & Shors, T. J. (2009). Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiology and Behavior*, 97(2), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.035>
- Davis, J. D., & Smith, G. P. (1988). Analysis of lick rate measure the positive and negative feedback effects of carbohydrates on eating. *Appetite*, 11(3), 229–238. [https://doi.org/10.1016/S0195-6663\(88\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0195-6663(88)80005-9)
- de Almeida, M. A., & Izquierdo, I. (1986). Memory facilitation by histamine. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 283(2), 193–198. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3789882
- Escobar Briones, C., & Aguilar Robledo, R. A. (2002). *Motivación y conducta: sus bases biológicas*. México: El manual moderno.
- Ferry, B., & Duchamp-Viret, P. (2014). The orexin component of fasting triggers memory processes underlying conditioned food selection in the rat. *Learning & Memory*, 21(4), 185–189. <https://doi.org/10.1101/lm.033688.113>
- Flood, J. F., Uezu, K., & Morley, J. E. (1998). Effect of histamine H₂ and H₃ receptor modulation in the septum on post-training memory processing. *Psychopharmacology*, 140(3), 279–284. <https://doi.org/10.1007/s002130050768>

- Fouquet, N., Oberling, P., & Sandner, G. (2001). Differential effect of free intake versus oral perfusion of sucrose in conditioned taste aversion in rats. *Physiology and Behavior*, 74(4–5), 465–474. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00585-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00585-6)
- Fox, G. B., Pan, J. B., Esbenshade, T. A., Bennani, Y. L., Black, L. A., Faghieh, R., ... Decker, M. W. (2002). Effects of histamine H3receptor ligands GT-2331 and ciproxifan in a repeated acquisition avoidance response in the spontaneously hypertensive rat pup. *Behavioural Brain Research*, 131(1–2), 151–161. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00379-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00379-5)
- Foy, M. R., & Foy, J. G. (2016). Conditioned taste aversion. *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, (December 2015), 35–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02599-2>
- Fryer Leibowitz, S. (1973). Histamine: a stimulatory effect on drinking behavior in the rat. *Brain Research*, 63(C), 440–444. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90120-0)
- Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Current Biology*, 27(12), R580–R586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010>
- Goio, M., Federman, N., Navarro, N., Marisa, V., & Würschmidt, A. (2012). *Cerebro y memoria* (1era edici). Buenos aires: Ministerio de Educación de la Nación.
- Grote, F. W., & Brown, R. T. (1973). Deprivation level affects extinction of a conditioned taste aversion. *Learning and Motivation*, 4(3), 314–319. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(73\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0023-9690(73)90021-0)
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 88(3), 1183–1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>
- Haas, H., & Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 121–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1034>
- Hebb, D. O. (1955). Drives and the C. N. S. (conceptual nervous system). *Psychological Review*, 62(4), 243–254. <https://doi.org/10.1037/h0041823>

- Heinsbroek, R. P. W., van Oyen, H. G., van de Poll, N. E., & Boer, G. J. (1983). Failure of dexamethasone to influence sex differences in acquisition of discriminated lever press avoidance. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *19*(4), 599–604.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90334-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90334-9)
- Hilgard, E. R., Marquis, D. G., & Ribes, I. E. (1969). *Condicionamiento y aprendizaje*. México: Trillas.
- Hodes, G. E., & Shors, T. J. (2005). Distinctive stress effects on learning during puberty. *Hormones and Behavior*, *48*(2), 163–171.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.02.008>
- Hyde, J. S., Lindberg, S. M., Linn, M. C., Ellis, A. B., & Williams, C. C. (2008, July 25). Diversity: Gender similarities characterize math performance. *Science*, Vol. 321, pp. 494–495. <https://doi.org/10.1126/science.1160364>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science* (Fifth edit). United States of America: McGraw-Hill.
- Köhler, C. A., Da Silva, W. C., Benetti, F., & Bonini, J. S. (2011). Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. *Neural Plasticity*, *2011*.
<https://doi.org/10.1155/2011/328602>
- Komaki, J. (2004). Water can induce better spatial memory performance than food in radial maze learning by rats. *Japanese Psychological Research*, *46*(1), 65–71.
<https://doi.org/10.1111/j.1468-5884.2004.00237.x>
- Komater, V. A., Browman, K. E., Curzon, P., Hancock, A. A., Decker, M. W., & Fox, G. B. (2003). H3receptor blockade by thioperamide enhances cognition in rats without inducing locomotor sensitization. *Psychopharmacology*, *167*(4), 363–372.
<https://doi.org/10.1007/s00213-003-1431-0>
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., & Shors, T. J. (2004). High levels of estrogen enhance associative memory formation in ovariectomized females. *Psychoneuroendocrinology*, *29*(7), 883–890.

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2003.08.001>

Levine, S., & Broadhurst, P. L. (1963). Genetic and ontogenetic determinants of adult behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *56*(2), 423–428. <https://doi.org/10.1037/h0040285>

Lin, X. Bin, Pierce, D. R., Light, K. E., & Hayar, A. (2013). The fine temporal structure of the rat licking pattern: What causes the variability in the interlick intervals and how is it affected by the drinking solution? *Chemical Senses*, *38*(8), 685–704. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt038>

Magrani, J., De Castro E Silva, E., Ramos, A. C., Athanazio, R., Barbetta, M., & Fregoneze, J. B. (2005). Central H1 and H2 receptor participation in the control of water and salt intake in rats. *Physiology and Behavior*, *84*(2), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.11.010>

Magrani, J., De Castro E Silva, E., Varjão, B., Duarte, G., Ramos, A. C., Athanazio, R., ... Fregoneze, J. B. (2004). Histaminergic H1 and H2 receptors located within the ventromedial hypothalamus regulate food and water intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *79*(1), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.07.004>

Mahía, J., & Puerto, A. (2006). Lesions of tuberomammillary nuclei induce differential polydipsic and hyperphagic effects. *European Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1321–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04644.x>

McGaugh, J. L. (1973). *Learning and Memory. An introduction*. Albion Publishing Company.

McGivern, R. F., Henschel, D., Hutcheson, M., & Pangburn, T. (1996). Sex difference in daily water consumption of rats: Effect of housing and hormones. *Physiology and Behavior*, *59*(4–5), 653–658. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02017-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02017-9)

Miñana-Solis, M. C., Ángeles-Castellanos, M., Feillet, C., Pévet, P., Challet, E., & Escobar, C. (2009). Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat. *Chronobiology International*, *26*(5),

808–820. <https://doi.org/10.1080/07420520903044240>

Miranda, M. I., LaLumiere, R. T., Buen, T. V., Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (2003). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *European Journal of Neuroscience*, *18*(9), 2605–2610.

<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.03008.x>

Miranda, M. I. (2011). El sabor de los recuerdos : Formación de la memoria gustativa. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 1–14.

Miranda, María Isabel. (2012). Taste and odor recognition memory: The emotional flavor of life. *Reviews in the Neurosciences*, *23*(5–6), 481–499.

<https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0064>

Mitchell, D. (1976). Experiments on neophobia in wild and laboratory rats: A reevaluation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *90*(2), 190–197. <https://doi.org/10.1037/h0077196>

Nakajima, S. (2018). Food aversion learning based on voluntary running in non-deprived rats: a technique for establishing aversive conditioning with minimized discomfort.

Experimental Animals, *68*(1), 71–79. <https://doi.org/10.1538/expanim.18-0075>

Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., & Miranda, M. I. (2010). Taste memory formation: Latest advances and challenges. *Behavioural Brain Research*, *207*(2), 232–248. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.040>

Passani, M. B., Benetti, F., Blandina, P., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2017). Histamine regulates memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *145*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.08.007>

Paxinos, G., Ashwell, K. W., & Tork, I. (2013). *Atlas of the Developing Rat Nervous System*. Academic Press.

Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J. C., & Arrang, J. M. (2002). A detailed mapping of the histamine H3receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, *114*(1), 173–193.

[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00135-5)

- Pollard, H., Moreau, J., Arrang, J. M., & Schwartz, J. C. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neuroscience*, *52*(1), 169–189. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90191-H](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90191-H)
- Poulin, A. M., & Timofeeva, E. (2008). The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Research*, *1227*, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.039>
- Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *40*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001>
- Provinsi, G., Passani, M. B., Costa, A., Izquierdo, I., & Blandina, P. (2018). Neuronal histamine and the memory of emotionally salient events. *British Journal of Pharmacology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/bph.14476>
- Purón-Sierra, L., & Miranda, M. I. (2014). Histaminergic modulation of cholinergic release from the nucleus basalis magnocellularis into insular cortex during taste aversive memory formation. *PLoS ONE*, *9*(3), 25–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091120>
- Purón-Sierra, L., Sabath, E., Nuñez-Jaramillo, L., & Miranda, M. I. (2010). Blockade of nucleus basalis magnocellularis or activation of insular cortex histamine receptors disrupts formation but not retrieval of aversive taste memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *93*(2), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.10.001>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., La Mantia, A.-S., Monney, R. D., ... White, L. E. (2018). *Neuroscience* (sixth; S. Associates, Ed.). New York: Oxford University Press.
- Randall-Thompson, J. F., & Riley, A. L. (2003). Morphine-induced conditioned taste aversions: Assessment of sexual dimorphism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *76*(2), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.08.010>
- Rinker, J. A., Busse, G. D., & Riley, A. L. (2008). An assessment of sex differences in nicotine-induced conditioned taste aversions. *Pharmacology Biochemistry and*

Behavior, 88(4), 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.09.016>

Romero, E., & Hernández, N. (2011). El papel de la memoria en el proceso lector.

Umbral Científico, 24–32. Retrieved from

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30428111003>

Salary, T. L. (1994). *The Effects of Water Deprivation and Conditioned Taste Aversion On a Cognitive Task in Laboratory Rats*.

Sengstake, C. B., & Chambers, K. C. (1979). Differential effects of fluid deprivation on the acquisition and extinction phases of a conditioned taste aversion. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 14(2), 85–87. <https://doi.org/10.3758/BF03329407>

Shors, T. J., Mathew, J., Sisti, H. M., Edgecomb, C., Beckoff, S., & Dalla, C. (2007). Neurogenesis and Helplessness Are Mediated by Controllability in Males But Not in Females. *Biological Psychiatry*, 62(5), 487–495.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.10.033>

Shors, T. J., & Miesegaes, G. (2002). Testosterone in utero and at birth dictates how stressful experience will affect learning in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13955–13960.

<https://doi.org/10.1073/pnas.202199999>

Shors, T. J., & Servatius, R. J. (1997). The contribution of stressor intensity, duration, and context to the stress-induced facilitation of associative learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(1), 92–96. <https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3763>

Siegel, G. et al. (2006). Basic Neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects. In *Chemistry & ...* (7a ed.). Retrieved from

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>

Simon, S. A., De Araujo, I. E., Gutierrez, R., & Nicolelis, M. A. L. (2006). The neural mechanisms of gustation: A distributed processing code. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(11), 890–901. <https://doi.org/10.1038/nrn2006>

Simpson, E. H. (2016). The Behavioural Neuroscience of Motivation: An Overview of Concepts, Measures, and Translational Applications. *HHS Public Access*, 27, 1–12.

<https://doi.org/10.1007/7854>

- Smith, D. V., & Lemon, C. H. (2007). Neural Coding in the rNST. In *In The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2537/>
- Solomon, P. R., Vander Schaaf, E. R., Thompson, R. F., & Weisz, D. J. (1986). Hippocampus and trace conditioning of the rabbit's classically conditioned nictitating membrane response. *Behavioral Neuroscience*, *100*(5), 729–744. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.100.5.729>
- Stephan, F. K. (2001). Food-entrainable oscillators in mammals. In *Circadian clocks* (Springer, pp. 223–246). Boston, MA.
- Stoynev, A. (1981). *Simultaneous study of the circadian rhythms of food intake , water intake and renal excretion and analysis of their interrelations in rats*. (February 1981).
- Sutcliffe, J. S., Marshall, K. M., & Neill, J. C. (2007). Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research*, *177*(1), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.029>
- Takei, H., Yamamoto, K., Bae, Y.-C., Shirakawa, T., & Kobayashi, M. (2017). Histamine H3 Heteroreceptors Suppress Glutamatergic and GABAergic Synaptic Transmission in the Rat Insular Cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, *11*(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00085>
- Toth, L. A., & Gardiner, T. W. (2000). Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, *39*(6), 9–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487246>
- Toufexis, D. J., Myers, K. M., & Davis, M. (2006). The effect of gonadal hormones and gender on anxiety and emotional learning. *Hormones and Behavior*, *50*(4), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.06.020>
- Treesukosol, Y., Ishizuka, T., Yamamoto, C., Senda, K., Tsutsumi, S., Yamatodani, A., & Yamamoto, T. (2005). Hypothalamic histamine release by taste stimuli in freely

- moving rats: Possible implication of palatability. *Behavioural Brain Research*, 164(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.004>
- Valdés, J. L., Sánchez, C., Riveros, M. E., Blandina, P., Contreras, M., Farías, P., & Torrealba, F. (2010). The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *European Journal of Neuroscience*, 31(11), 2073–2085. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07241.x>
- van Haaren, F., van Hest, A., & Heinsbroek, R. P. W. (1990). Behavioral differences between male and female rats: Effects of gonadal hormones on learning and memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80157-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80157-5)
- Van Oyen, H. G., Walg, H., & Van De Poll, N. E. (1981). Discriminated lever press avoidance conditioning in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 26(2), 313–317. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90028-7)
- Velasco Plaza, A., G-Granda, T., & Cachero, M. T. G. (1993). Circadian rhythms of food and water intake and urine excretion in diabetic rats. *Physiology and Behavior*, 54(4), 665–670. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90074-P](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90074-P)
- Waddell, J., Bangasser, D. A., & Shors, T. J. (2008). The basolateral nucleus of the amygdala is necessary to induce the opposing effects of stressful experience on learning in males and females. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5290–5294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1129-08.2008>
- Walf, A. A., Rhodes, M. E., & Frye, C. A. (2006). Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.01.004>
- Wood, G. E., & Shors, T. J. (1998). Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 4066–4071. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4066>

- Wright, P., Stern, J., & Phelan, M. (2012). Psychology. In N. Goddard (Ed.), *Core psychiatry* (Third, pp. 64–80). Elsevier Health Sciences.
- Yamamoto, T. (1984). Taste responses of cortical neurons. *Prog. Neurobiol.*, 23, 273–315. [https://doi.org/016/S0306-4522\(98\)00152-3](https://doi.org/016/S0306-4522(98)00152-3)
- Yuan, D. L., & Chambers, K. C. (1999a). Estradiol accelerates extinction of a conditioned taste aversion in female and male rats. *Hormones and Behavior*, 36(1), 1–16. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1520>
- Yuan, D. L., & Chambers, K. C. (1999b). Estradiol accelerates extinction of lithium chloride-induced conditioned taste aversions through its illness-associated properties. *Hormones and Behavior*, 36(3), 287–298. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1551>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vías neuronales estudiadas en diferentes modelos animales involucradas en el procesamiento del sabor	6
Figura 2. Sabor novedoso: consumo seguro, aversión y neofobia	15
Figura 3. Diagrama simplificado de los factores y procesos involucrados en la motivación.	17
Figura 4. Representación esquemática de la corteza insular de ratones y ratas	25
Figura 5. Síntesis y metabolismo de la histamina.....	27
Figura 6. Principales proyecciones histaminérgicas y distribución de los receptores a histamina en el cerebro de rata.	30
Figura 7. Principales vías de señalización de los receptores de histamina.	30
Figura 8. Protocolo del CAS (esquema <i>ad libitum</i> ; esquema de privación, esquemas cruzados y grupos farmacológicos)	37
Figura 9. Foto representativa de la localización de las guías cánulas y del trayecto de los inyectores para llegar a la corteza insular.....	42
Figura 10. Promedios de los consumos de agua por hora en ratas hembra del esquema <i>ad libitum</i>	45
Figura 11. Promedios de los consumos de agua por hora en ratas macho del esquema <i>ad libitum</i>	45
Figura 12. Promedios de los consumos de agua por hora en ratas macho y hembra del esquema <i>ad libitum</i>	46
Figura 13. Consumo Basal de agua para el esquema <i>ad libitum</i> en mL/Kg durante los primeros 20 minutos.	47
Figura 14. Consumos del esquema <i>ad libitum</i> en mL/Kg durante los diferentes horarios del día de adquisición.....	48
Figura 15. Consumo de sacarina en mL/Kg durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema <i>ad libitum</i>	50
Figura 16. Consumo de sacarina durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema privado.	51

Figura 17. Consumos de sacarina durante el CAS (1:00-1:20 pm) expresados en % de Adquisición y separados por esquema y por sexo.. 53

Figura 18. Consumos normalizados con respecto a la adquisición para los esquemas cruzados y los esquemas control durante el CAS. 55

Figura 19. Consumo de sacarina en mL durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema *ad libitum* control y fármaco..... 57

Figura 20. Consumo de sacarina durante los primeros 20 minutos (1:00-1:20 pm) en los días del CAS para el esquema privado control y fármaco. 58

Figura 21. Consumos de sacarina durante el CAS (1:00-1:20 pm) expresados en % de Adquisición y separados por grupos control y fármaco 60