



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

“LA SEÑALIZACIÓN DOPAMINÉRGICA EN EL
ESTABLECIMIENTO DE LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO AL SABOR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A :

CECILIA GABRIELA ACEVEDO HUERTA



DIRECTORA : Dra. Elvi Gil Lievana

REVISOR : Dr. Hugo Sánchez Castillo

CIUDAD DE MÉXICO

2021



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.

Índice

<u>Abreviaturas.....</u>	<u>4</u>
<u>Resumen.....</u>	<u>6</u>
<u>1. Introducción.....</u>	<u>7</u>
<u>1.1 Aprendizaje y memoria.....</u>	<u>7</u>
<u>1.2. Memoria de reconocimiento al sabor</u>	<u>10</u>
<u>1.3. Catecolaminas.....</u>	<u>11</u>
<u>1.4 Sistema dopaminérgico.....</u>	<u>13</u>
<u>1.5. Antecedentes.....</u>	<u>14</u>
<u>2. Justificación.....</u>	<u>19</u>
<u>3. Hipótesis.....</u>	<u>21</u>
<u>4. Objetivos.....</u>	<u>21</u>
<u>5. Diagrama de trabajo.....</u>	<u>22</u>
<u>6. Metodología general.....</u>	<u>23</u>
<u>6.1 Sujetos.....</u>	<u>23</u>
<u>6.2. Genotipificación.....</u>	<u>24</u>
<u>6.3. Cirugía para inyección del vector viral.....</u>	<u>25</u>
<u>6.4. Memoria de reconocimiento al sabor.....</u>	<u>26</u>
<u>6.5. Curva de dosis-respuesta de estímulos gustativos.....</u>	<u>28</u>
<u>6.6. Curvas de dosis-respuesta con estímulos gustativos asociados a agentes</u> <u> inductores.....</u>	<u>29</u>
<u>6.7. Optogenética.....</u>	<u>30</u>

<u>6.8. Inmunohistoquímicas.....</u>	<u>31</u>
<u>6.9. Análisis estadísticos.....</u>	<u>32</u>
<u>7.0 Resultados</u>	<u>32</u>
<u>7.1. Infección de los somas de neuronas dopaminérgicas en el VTA.....</u>	<u>32</u>
<u>7.2. Respuesta de reconocimiento a diferentes concentraciones de sacarina y quinina.....</u>	<u>33</u>
<u>7.3. Respuesta de reconocimiento a sabores asociados a agentes inductores.....</u>	<u>35</u>
<u>7.4. Respuesta de reconocimiento al sabor después de la estimulación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del VTA.....</u>	<u>37</u>
<u>7.5. Respuesta de reconocimiento a sabores asociados a agentes inductores después de la estimulación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del VTA.....</u>	<u>38</u>
<u>8. Discusión.....</u>	<u>39</u>
<u>9. Conclusiones.....</u>	<u>46</u>
<u>10. Referencias.....</u>	<u>47</u>

Abreviaturas

AAV	Virus adeno-asociado
AMPC	Adenosín Monofosato Cíclico
BNST	Núcleo del lecho de la estría terminal
BLA	Amígdala basolateral
CA	Amígdala central
Ca ²⁺	Calcio
CAS	Condicionamiento aversivo al sabor
CAMKII	Calcio/calmodulina proteína quinasa tipo II
CI	Corteza insular
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
CPS	Condicionamiento de preferencia al sabor
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDC	DOPA-descarboxilasa
DBH	Dopamina beta-hidroxilasa
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DPSS	Estado sólido bombeado por diodos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Estimulo incondicionado
EC	Estimulo condicionado
HL	Hipotálamo lateral
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina

MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
nAcc	Núcleo accumbens
NaOH	Hidróxido de Sodio
NBM	Núcleo basal magnocelular
NDR	Núcleo dorsal del rafe
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NTS	Núcleo del tracto solitario
ORF	Marco de lectura abierto invertido de doble flujo
PBN	Núcleo parabrancial
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
PKA	Proteína quinasa A
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
SSI	Solución salina isotónica
TH	Tirosina Hidroxilasa
Tris-HCl	Trisaminometano-ácido clorhídrico
VTA	Área tegmental ventral
WT	Tipo salvaje

Resumen

La memoria de reconocimiento al sabor es la capacidad que permite a los organismos recordar qué comida ingerida es dulce, amarga, salada, etc. además, permite a los organismos asociar el sabor de la comida a las consecuencias de su ingesta.

La corteza insular es el sustrato neuroanatómico de la memoria de reconocimiento al sabor y se comunica con otras estructuras subcorticales para complementar su función, una de ellas es el Área Tegmental Ventral (VTA). El VTA es la estructura con mayor número de proyecciones dopaminérgicas hacia otras áreas cerebrales. Las neuronas dopaminérgicas del VTA responden a estímulos aversivos y recompensantes, sin embargo, no se ha descrito la repercusión de la actividad dopaminérgica del VTA ante estímulos de diferentes valencias en el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor.

Por lo tanto, en el presente trabajo nos preguntamos cuál sería el efecto de la activación dopaminérgica del VTA en el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor. Debido a esto, propusimos estimular optogenéticamente las neuronas dopaminérgicas del VTA mientras se les presentaban a los ratones estímulos gustativos recompensantes o aversivos en concentraciones subumbrales y después aparear estos estímulos con agentes inductores también en dosis subumbrales y a continuación evaluar la memoria de reconocimiento al sabor.

Los resultados muestran que la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA permite que se establezca la memoria de reconocimiento al sabor independientemente de la valencia del estímulo.

Introducción

Aprendizaje y memoria

El **aprendizaje** es el proceso mediante el cual, las experiencias y la información adquirida modifican el sistema nervioso y por consiguiente la conducta. Los organismos modifican su conducta a través del aprendizaje para adaptarse a las condiciones cambiantes e impredecibles del medio que los rodea. El aprendizaje fortalece las conexiones entre neuronas y modifica por lo tanto el cerebro (Carlson, 2014; Morgado, 2005; Poirazi y Mel, 2001).

Por otro lado, la memoria es la capacidad de almacenar la información que ya no está disponible en el ambiente. Se definen tres diferentes tipos de memorias de acuerdo con su duración, estas son: memoria sensorial, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Thompson y Madigan, 2013). La **memoria sensorial**, es la más breve, dura de 200 ms a 500 ms después de la percepción de un estímulo (Baddeley, 1999). La **memoria a corto plazo** es un sistema que almacena una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo, desde minutos hasta 3 horas (Bernabeu et al., 1997). Estas memorias son el resultado de un fortalecimiento transitorio de las conexiones sinápticas ya establecidas, causado por modificaciones de las proteínas preexistentes. Para este tipo de memorias se requieren ensamblajes neuronales temporales (Baars y Gage, 2010; Bear et al., 2016).

La **memoria a largo plazo** es la retención duradera de recuerdos, que implica la retención de información por un periodo de tiempo más prolongado, su almacenamiento puede comprender incluso toda una vida. Este tipo de memoria es consecuencia de un fortalecimiento persistente de las conexiones sinápticas, causado por alteraciones en la expresión genética, la síntesis de nuevas proteínas y el desarrollo de nuevas conexiones sinápticas. El proceso gradual por el cual la reiteración de las memorias a corto plazo produce los cambios neurales que originan las memorias

a largo plazo se denomina **consolidación de la memoria** (Bear et al., 2016; Morgado, 2005; Purves et al., 2018).

La memoria se ha dividido cualitativamente en dos diferentes sistemas de almacenamiento de información: la memoria explícita y la memoria implícita (Ver figura 1). La **memoria explícita** comprende el recuerdo consciente de: personas, lugares, cosas, eventos y hechos. La **memoria implícita**, por otro lado, es aquella que almacena el conocimiento que retenemos de manera inconsciente, incluye el recuerdo de habilidades y hábitos. Dentro de la memoria implícita se encuentran diferentes procesos como: habituación, sensibilización, condicionamiento y facilitación o “priming” (Kandel, 2006; Purves, et al., 2018; Squire, y Dede, 2015).

La memoria implícita puede formarse gracias a un aprendizaje asociativo, en el que el animal aprende la relación entre dos estímulos o eventos. El aprendizaje asociativo incluye: el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante (Bear et al., 2016; Carlson, 2014; Hawkins y Byrne, 2015). El **condicionamiento clásico** involucra la asociación de un **estímulo condicionado** con un **estímulo incondicionado** (EC-EI). Por ejemplo, si se aparea un sabor (EC) con una inyección de cloruro de litio (EI), que de forma natural provoca malestar gástrico (RC), posteriormente, la presentación del sabor (EC) solo, sin la inyección de cloruro de litio (EI) será capaz de provocar el malestar gástrico ya que se habrá formado una asociación entre el sabor y el malestar que provoca la inyección de cloruro de litio. Este tipo de aprendizaje se conoce como asociativo porque requiere la presentación contingente y contigua de los dos estímulos, EC y EI (Barik y Krashes, 2018; Lechner y Byrne, 1998). Por otro lado, en el **condicionamiento operante** una respuesta (por ejemplo, la presión de una palanca) es apareada con una consecuencia (comida) resultando en una asociación respuesta-estimulo (R-E). Aunque por definición son diferentes ambos tipos de condicionamiento en la práctica pueden interactuar entre sí (Schachtman y Reilly, 2011).

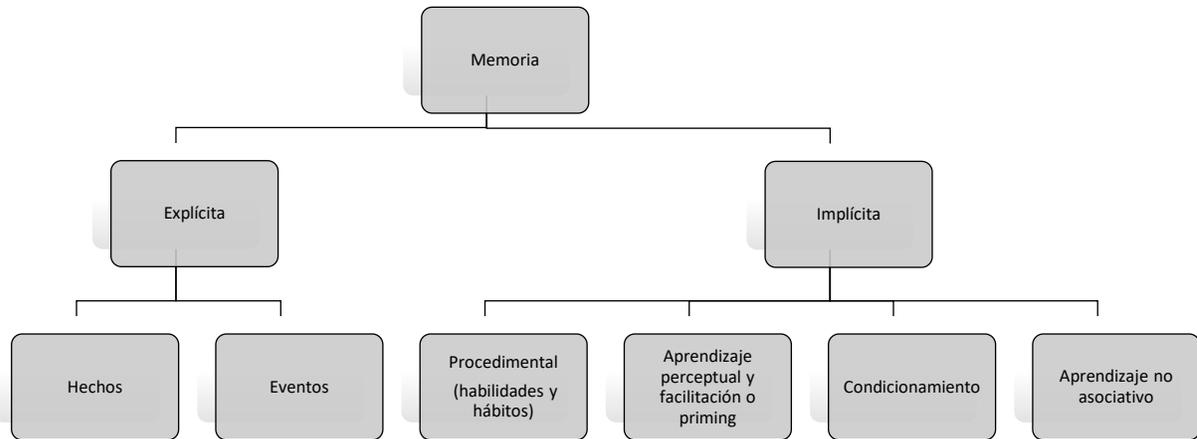
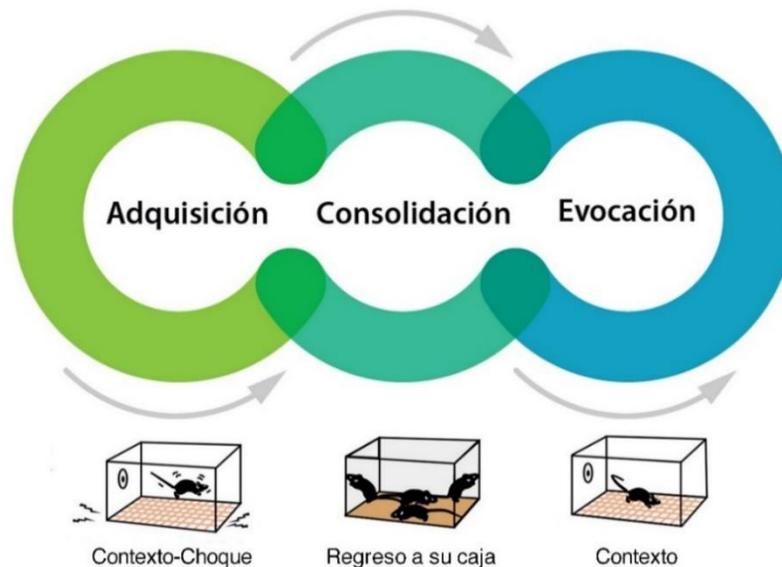


Figura 1. Organización de los sistemas de memoria. La memoria se divide en dos sistemas de almacenamiento, la memoria explícita y la memoria implícita. A su vez la memoria explícita se divide en hechos y eventos. La memoria implícita se divide en: memoria procedimental, que incluye habilidades y hábitos; aprendizaje perceptual y facilitación o priming; condicionamiento y aprendizaje no asociativo (Modificado de Squire y Dede, 2015).

Todos los tipos de memoria se desarrollan como un proceso, el cual tiene diferentes fases, las fases principales de la memoria son: la adquisición, la consolidación y la evocación. La fase de **adquisición**, es el aprendizaje o entrenamiento. Esta fase implica modificaciones en el número de proteínas en las terminales sinápticas, lo que puede aumentar o disminuir la excitabilidad de una neurona y facilitar la aparición de un trazo de memoria. La adquisición involucra cambios de la actividad eléctrica del cerebro, cambios en las moléculas de segundos mensajeros y modificaciones de proteínas sinápticas existentes (Abel y Lattal, 2001). La segunda fase es la **consolidación** en donde se convierten memorias inicialmente frágiles en engramas de memoria estables. Para que se dé la consolidación de la memoria se necesita que nuevas proteínas lleguen a la sinapsis modificada y conviertan el cambio temporal, en un cambio más duradero (Bear et al., 2016; Dudai, 2004). La codificación de nueva información se explica a través del modelo de potenciación a largo plazo, lo que resulta en cambios neuroquímicos y estructurales, generando el potencial necesario para un cambio sináptico de larga duración. La tercera etapa de la memoria es la **evocación**, que es básicamente la recuperación de la información almacenada, las memorias consolidadas cuando son

reactivadas mediante la evocación retornan a un estado lábil (Thompson y Madigan, 2013) (Ver figura 2).

Figura 2. Fases de la memoria. Principales fases de la memoria: adquisición, consolidación y evocación. Ejemplo de estas tres fases para el condicionamiento clásico de miedo al contexto. En la primera fase se establece la memoria de la asociación choque-contexto. Durante la fase de consolidación, el ratón es regresado a su casa hogar donde la memoria es consolidada. Finalmente, en la fase de evocación, el ratón es regresado al contexto en donde fue condicionado y la memoria es evaluada registrando el comportamiento de congelamiento (Modificado de Abel y Lattal, 2001).



Memoria de reconocimiento al sabor

La memoria de reconocimiento al sabor permite recordar qué comida ingerida es sabrosa, tóxica, aversiva, etc. Los alimentos presentan diferentes cualidades gustativas como dulce, salado, agrio, amargo, umami, graso y tal vez otros sabores como metálico (Iwata et al., 2014; Roper, 2009). Se cree que cada una de estas cualidades representa diferentes requisitos nutricionales o plantea riesgos dietéticos potenciales. Por ejemplo, los alimentos con sabor dulce señalan la presencia de carbohidratos que sirven como fuente de energía. Mientras que, el sabor amargo es aversivo por naturaleza y se cree que protege contra el consumo de venenos (Chaudhari y Roper, 2010).

La memoria de reconocimiento es importante desde el punto de vista evolutivo, ya que permite a los animales asociar claves relacionadas con la comida a las consecuencias de su ingesta. Si un

sabor nuevo es asociado con un determinado malestar, los animales van a evitar el consumo en posteriores presentaciones, es decir adquirirán una aversión al sabor. Este tipo de condicionamiento suele estudiarse al aparear sacarina o una sustancia apetitiva con inyecciones de cloruro de litio, un agente inductor de malestar gástrico (Bermúdez, 2004).

Por otro lado, la preferencia condicionada al sabor se establece cuando un sabor es asociado a consecuencias positivas de la ingesta (por ejemplo, una inyección de glucosa). Los animales que tengan una memoria gustativa de preferencia al sabor, van a incrementar el consumo de este sabor en posteriores presentaciones. Esta memoria se forma gracias a un aprendizaje asociativo, específicamente gracias a un condicionamiento clásico, en el que el animal aprende a asociar un sabor específico (EC) con un estímulo incondicionado (EI) que de forma natural es recompensante gracias a las consecuencias nutricionales que implica (Bodnar, 2018).

La formación de la memoria gustativa recae en cambios sinápticos iniciados por la activación de diversos sistemas de neurotransmisión como por ejemplo los cambios iniciados por el sistema catecolaminérgico. Se ha encontrado evidencia de variaciones en los niveles extracelulares de catecolaminas que correlacionan con cambios en la actividad neuronal durante la formación de la memoria (Miranda, 2007).

Catecolaminas

Las catecolaminas son una clase de monoaminas, que contienen un grupo catecol y un grupo amino. El grupo catecol es un compuesto químico que consiste en un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo (-OH) en la posición 3 y 4. Las catecolaminas son moléculas que están

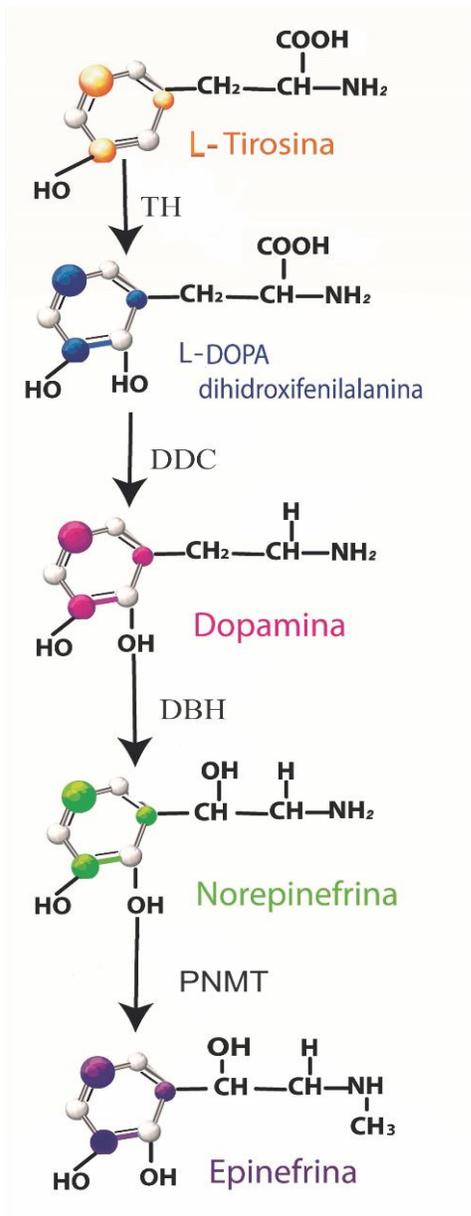


Figura 3. Biosíntesis de las catecolaminas. La enzima tirosina hidroxilasa (TH) le añade a la L-tirosina un grupo hidroxilo (OH) y esta se convierte en dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A continuación, la enzima DOPA-d Descarboxilasa (DDC) retira un grupo carboxilo (COOH) y se convierte en dopamina. Después la enzima dopamina-beta-hidroxilasa (DBH) añade un grupo OH a la dopamina para generar norepinefrina. Finalmente, la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) añade un grupo metilo (CH₃) a la norepinefrina y se convierte en epinefrina.

ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central como periférico. Las catecolaminas del sistema nervioso central son liberadas y sintetizadas por neuronas catecolaminérgicas que se encuentran en regiones que están involucradas en la regulación del movimiento, la atención y el estado de ánimo (Bear, 2016; Carlson, 2014; Dudas, 2014).

Las catecolaminas dopamina, norepinefrina y epinefrina son neurotransmisores que están formados por un conjunto de pasos enzimáticos sucesivos, la presencia de enzimas de síntesis específicas en las diferentes células da como resultado grupos separados de neuronas que contienen dopamina, norepinefrina y epinefrina (Squire et al., 2013).

La síntesis de estas catecolaminas comienza a partir del aminoácido L-tirosina, que es hidroxilado por una enzima dependiente de tetrahidrobiopterina, la tirosina

hidroxilasa (TH) a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Posteriormente, la L-DOPA pierde un grupo carboxilo gracias a la actividad de la enzima DOPA-d Descarboxilasa (DDC) y se convierte en dopamina. Posteriormente, la enzima dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), presente únicamente en células noradrenérgicas y adrenérgicas, une un

grupo hidroxilo a la dopamina que pasa a ser norepinefrina. Finalmente, la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), presente únicamente en células adrenérgicas, une un grupo metilo a la norepinefrina convirtiéndola en epinefrina (Carlson, 2014; Dudas, 2014; Siegel et al., 1999) (Ver figura 3).

Cabe mencionar, que la tirosina hidroxilasa (TH) es un blanco común para identificar histológicamente las neuronas catecolaminérgicas, ya que la actividad de la TH es el paso limitante en la síntesis de catecolaminas (Goldstein et al., 1998).

Sistema dopaminérgico

Se sabe que la dopamina se distribuye en el cerebro a lo largo de tres principales circuitos neuronales: el nigroestriatal, el mesolímbico/mesocortical y el tubular-infundibular. Los cuerpos celulares de las neuronas del sistema nigroestriado están en la sustancia negra y proyectan sus axones al neostriado, que está compuesto por el núcleo caudado y el putamen. En el sistema mesolímbico/mesocortical los cuerpos celulares de las neuronas están situados en el área tegmental ventral (VTA) y proyectan sus axones a varias partes del sistema límbico, entre ellas; la amígdala, el núcleo accumbens, el hipocampo, y la corteza (Carlson, 2014; Kudo y Fujii, 2012) (Ver figura 4). El circuito mesolímbico/mesocortical es importante ya que regulan la cognición, la atención, la memoria, el aprendizaje, el refuerzo y la conducta emocional (Ayano, 2016; Carlson, 2014).

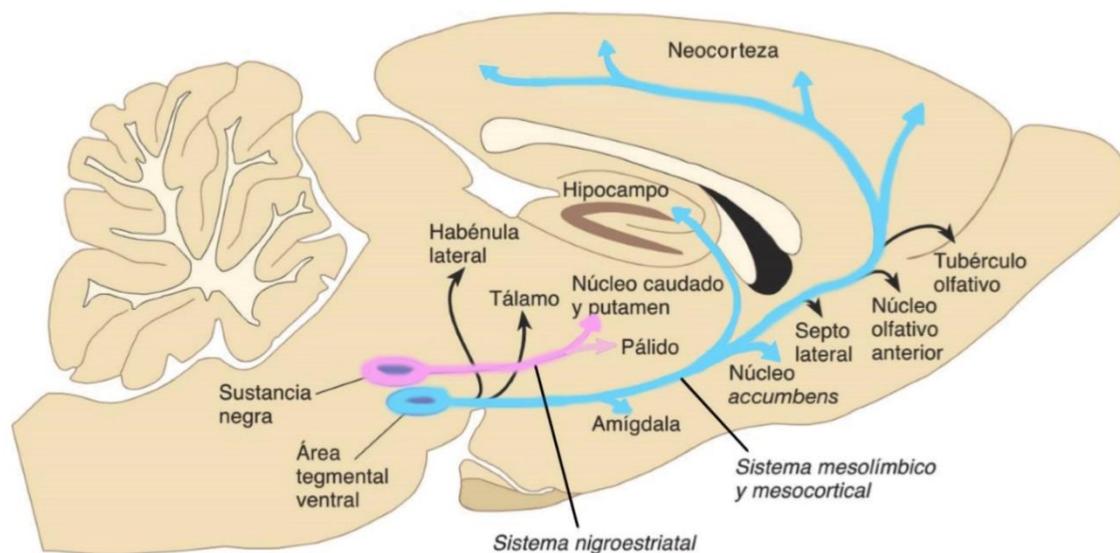


Figura 4. Vías dopaminérgicas en el encéfalo de rata. Sistema nigroestriatal con cuerpos neuronales en la sustancia negra que proyectan sus axones al núcleo caudado, putamen y pálido. Sistema mesolímbico y mesocortical con cuerpos neuronales en el área tegmental ventral que proyectan sus axones al tálamo, habénula lateral, amígdala, núcleo accumbens, hipocampo, septo lateral, núcleo olfativo anterior, tubérculo olfativo y neocorteza (Modificado de Carlson, 2014).

Se ha propuesto al sistema mesolímbico dopaminérgico como un sistema involucrado en todas las conductas motivadas, tanto las relacionadas con estímulos aversivos como las relacionadas con estímulos recompensantes (Ventura et al., 2007). Una característica importante de los estímulos es la valencia la cual puede ser negativa o positiva, los estímulos aversivos son estímulos inherentemente desagradables para los sujetos y tiene valencia negativa, mientras que, los estímulos recompensantes son estímulos inherentemente agradables o placenteros y tienen valencia positiva (Namburi et al., 2016).

Antecedentes

Las neuronas dopaminérgicas se activan independientemente de la valencia del estímulo. Cho y colaboradores en 2017 registraron *in vivo* la actividad dopaminérgica del núcleo dorsal del rafé (NDR) mientras se les presentaba a los ratones diferentes estímulos. Utilizaron imagenología de

calcio, metodología que permite medir el aumento de calcio intracelular gracias a la fluorescencia de GCaMP6, un indicador de calcio genéticamente codificado. Observaron que la actividad dopaminérgica (interpretada como incremento de calcio intracelular) aumenta como respuesta a estímulos externos, tanto recompensantes (la interacción de una hembra con un macho, o la presentación de chocolate) como aversivos (un choque eléctrico en las patas). Mientras que, durante la presentación de un objeto que no es ni recompensante ni aversivo, no hay un incremento en la actividad dopaminérgica registrada (Ver figura 5). Cabe mencionar, que el núcleo dorsal del rafe resulta una estructura importante ya que es una vía de entrada del VTA (Wang et al., 2019).

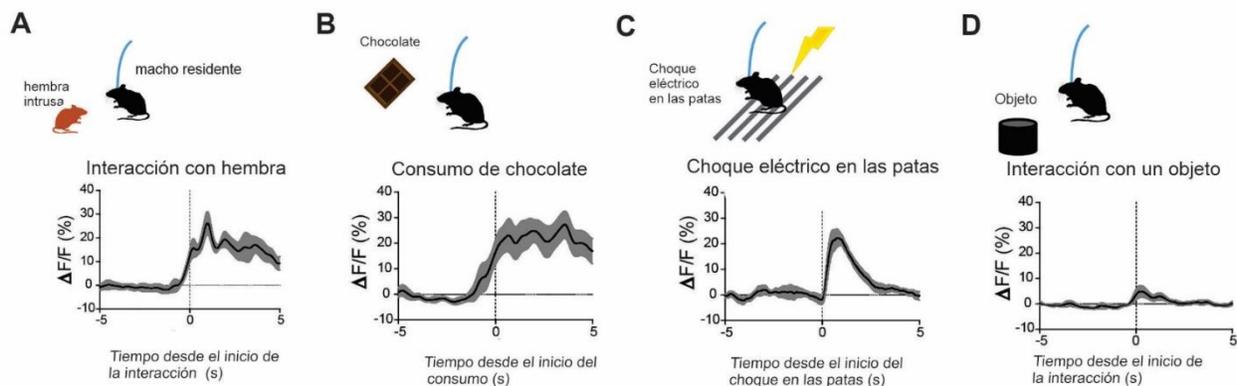


Figura 5. Actividad de neuronas dopaminérgicas del núcleo dorsal del rafe ante diferentes estímulos. Porcentaje de aumento de calcio intracelular ($\Delta F/F$) ante la presentación de estímulos, recompensantes: A) la presentación de una hembra a un macho y B) consumo de chocolate; estímulo aversivo: C) choque eléctrico en las patas y un estímulo que no es ni recompensante ni aversivo: D) interacción con un objeto. En el eje “x” se muestra el tiempo de duración de los estímulos en s. El punto cero representa la interacción, el consumo o la presentación de los diferentes estímulos. La actividad del calcio intracelular es graficada como la diferencia entre la fluorescencia a una luz con longitud de onda control y la fluorescencia a una luz con la longitud de onda específica para activar la fluorescencia del indicador de calcio, graficada a modo de porcentaje ($\Delta F/F\%$) (Modificado de Cho et al., 2017).

Las neuronas dopaminérgicas del cerebro-medio responden ante estímulos recompensantes o antes estímulos que predicen el refuerzo (Schultz, 2007). Adicionalmente, estudios recientes también han demostrado un aumento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA ante estímulos aversivos. Se ha observado, en ratones, por imagenología de calcio, que la actividad dopaminérgica en el VTA aumenta por la presentación de diferentes estímulos aversivos como: un

pellizco en la cola, un sonido ultrasónico, un intruso (macho) o el olor del depredador. Mientras que, ante estímulos que no resultan ni aversivos ni recompensantes para los ratones (un toque en la cola con un cotonete y una caja vacía) no hay cambio en la actividad dopaminérgica (Moriya et al., 2018) (Ver figura 6).

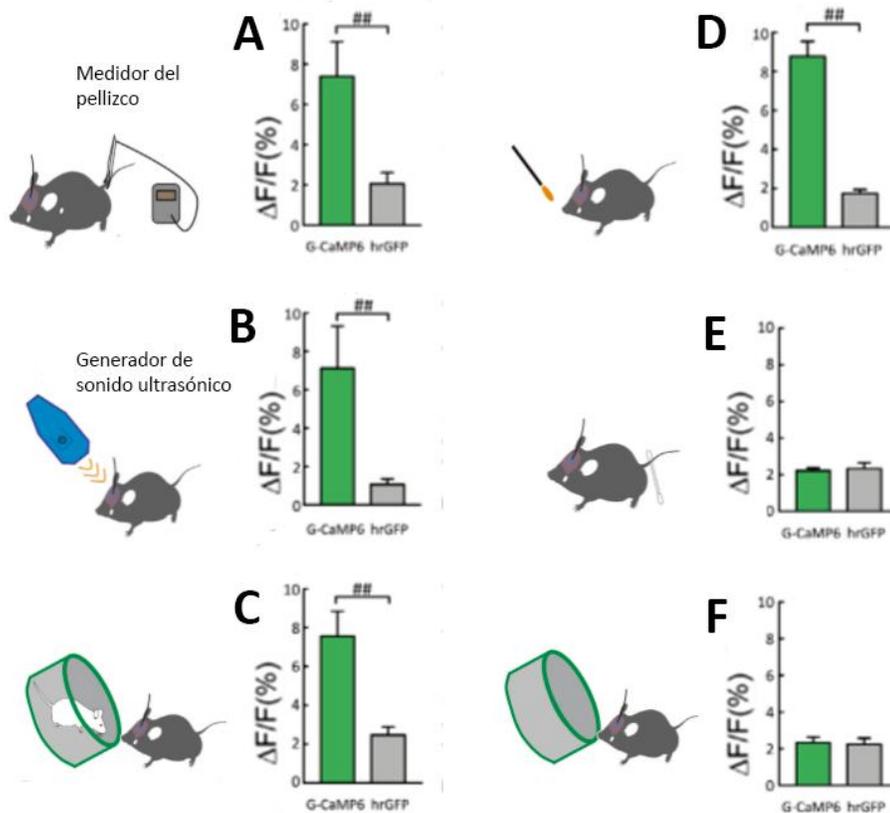


Figura 6. Actividad de neuronas dopaminérgicas del VTA ante la presentación de estímulos aversivos. Cambio de la actividad de neuronas dopaminérgicas en el VTA en un grupo control (hrGFP) y un grupo experimental (G-CaMP6), ante la presentación de estímulos aversivos: A) un pellizco en la cola B) un sonido ultrasónico C) un ratón macho intruso D) el olor del depredador; estímulos neutros: E) un toque en la cola con un cotonete F) una caja vacía. Se muestra el pico más alto de la intensidad de la señal de la fluorescencia del indicador de calcio genéticamente codificado graficado a modo de porcentaje ($\Delta F/F(\%)$) ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ (Modificado de Moriya et al., 2018).

Así mismo, Matsumoto y Hikosaka en 2009, registraron la actividad de neuronas dopaminérgicas del cerebro-medio en monos durante la presentación de estímulos recompensantes y aversivos. Se utilizó una gota de agua como estímulo recompensante (los monos estaban en restricción) y un soplo de aire en la cara como estímulo aversivo. Se encontró que algunas neuronas

dopaminérgicas se excitaban ante el estímulo recompensante y se inhibían ante el estímulo aversivo mientras que otras se excitaban ante ambos tipos de estímulos: el estímulo recompensante y el aversivo. Lo que sugiere que hay grupos específicos de neuronas dopaminérgicas en el cerebro-medio que codifican estímulos tanto recompensantes como aversivos (Ver figura 7).

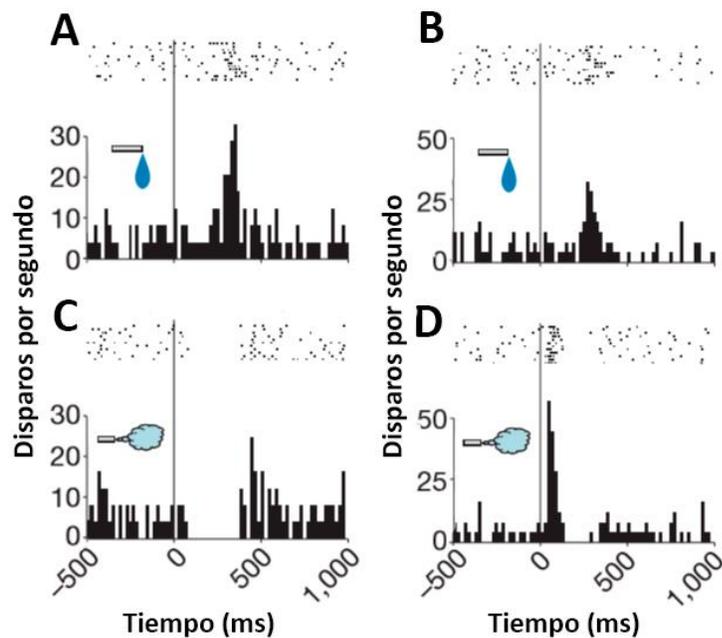


Figura 7. Actividad de neuronas dopaminérgicas ante la presentación de estímulos recompensantes y aversivos en el cerebro-medio. Disparos por segundo de neuronas dopaminérgicas del cerebro-medio ante la presentación de un estímulo recompensante: A y B, la presentación de una gota de agua; y un estímulo aversivo C y D, un soplo de aire. A y C son un grupo neuronal, que se excita ante un estímulo recompensante y se inhibe ante un estímulo aversivo. B y D son otro grupo neuronal que se excita ante un estímulo recompensante y ante uno aversivo. En el eje “x”, el punto cero representa la presentación del estímulo, se utiliza una escala de ms y se grafica desde 500 ms antes de prestando el estímulo hasta 1000 ms después (Modificado de Matsumoto y Hikosaka, 2009).

Hagnal y colaboradores en 2004, midieron en ratas, con microdialisis in vivo, la cantidad de dopamina extracelular en el núcleo accumbens: antes, durante y después de la presentación de sacarosa a diferentes concentraciones: 0.03, 0.1 y 0.3 M. Observaron que los niveles extracelulares de dopamina incrementan de forma dependiente a la concentración de sacarosa. Ante la presentación de sacarosa a la concentración más intensa (0.3 M) las ratas tuvieron una mayor

cantidad de dopamina extracelular en el núcleo accumbens que durante la presentación de la sacarosa a la concentración menos intensa (0.03 M) (Ver figura 8).

Con base a lo anterior, podemos concluir que existe una relación entre la intensidad del estímulo y la liberación de dopamina, si la intensidad del estímulo aumenta también lo hace la cantidad de dopamina liberada.

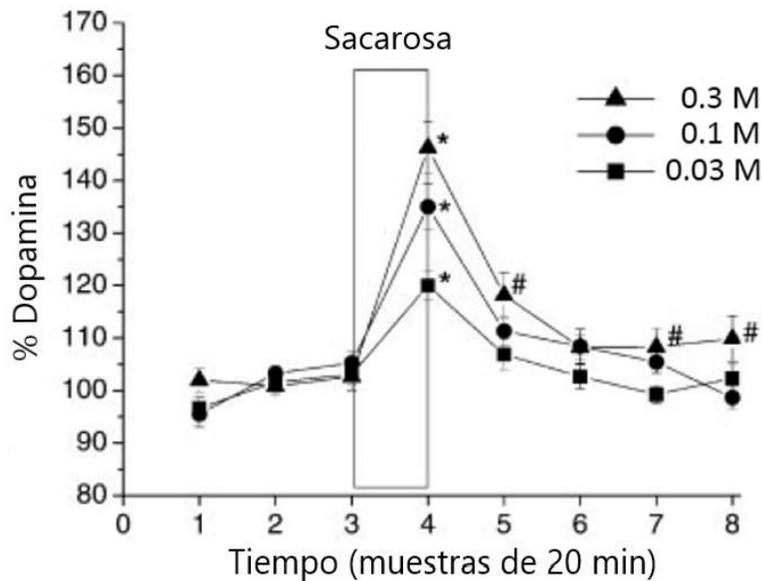


Figura 8. Nivel de dopamina extracelular ante la presentación de sacarosa a diferentes concentraciones. Porcentaje de dopamina extracelular en comparación con la basal, en el núcleo accumbens: antes, durante y después (el rectángulo marca la muestra en donde se presentó la sacarosa) de 20 min de acceso ilimitado a sacarosa a diferentes concentraciones. Se presentó una concentración de alta intensidad 0.3 M, una de intensidad media 0.1 M y una de intensidad baja, 0.03 M. Se tomaron muestras cada 20 min y se presentaron las diferentes concentraciones de sacarosa en días consecutivos en un orden contrabalanceado. * $p < 0.01$, # $p < 0.05$, en comparación con la basal (Modificado de Hagnal, et al., 2004).

Ding y colaboradores en 2008, observaron, en ratones, que la extinción de una memoria de condicionamiento aversivo al sabor (CAS), a una dosis de 96 mg/kg de cloruro de litio tarda significativamente más tiempo en suceder que la extinción de la memoria aversiva de ratones que recibieron una dosis de 48 mg/kg de cloruro de litio. La resistencia a la extinción en el grupo de ratones condicionados con una dosis alta (96 mg/kg) de cloruro de litio es consistente con el supuesto de que la memoria de CAS en este grupo es más fuerte. Lo que demuestra que la

intensidad del estímulo se relaciona con la fuerza de la memoria. Sugiriendo que la fuerza de la memoria incrementa a medida que aumenta la intensidad del estímulo (Ver figura 9).

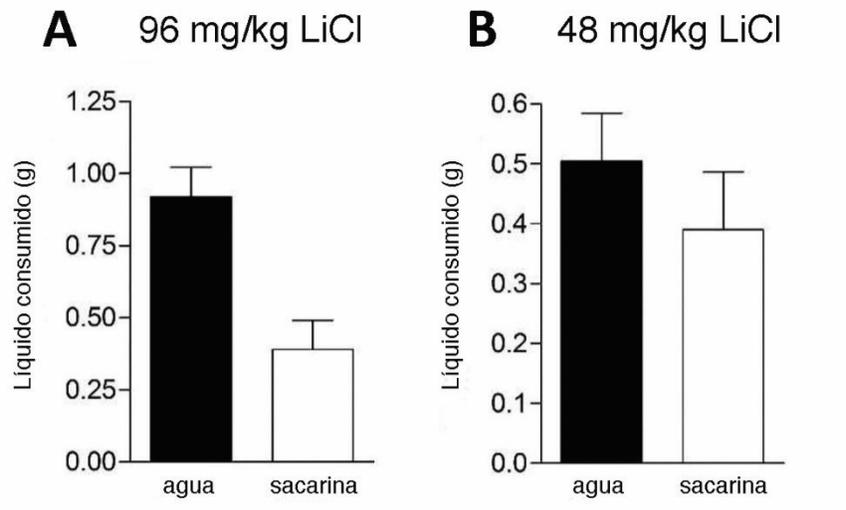


Figura 9. Memoria de condicionamiento aversivo al sabor ante diferentes concentraciones de cloruro de litio. Líquido consumido (g) ante diferentes dosis de cloruro de litio: A) 48 mg/kg y B) 96 mg/kg (Modificado de Ding et al., 2008).

Justificación

Se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas del VTA están implicadas en el procesamiento de la información de estímulos recompensantes (Schultz, 1998, 2007, 2010; Sesack y Grace, 2010; Wise 2005). Adicionalmente, otros estudios han demostrado su involucro en el procesamiento de estímulos aversivos (Coizet et al., 2006; Holly y Miczek, 2016; Moriya et al. 2018; Overton et al., 2014). Esto sugiere que las neuronas dopaminérgicas del VTA codifican tanto estímulos recompensantes como aversivos.

A pesar de que existen estos estudios sobre la actividad dopaminérgica del VTA ante estímulos recompensantes y aversivos no se ha descrito completamente la repercusión de esta actividad dopaminérgica en la formación y mantenimiento de la memoria.

La memoria de estímulos recompensantes y aversivos resulta esencial para un comportamiento adaptativo ya que esta habilidad es un pre-requisito para que los organismos ejecuten exitosos

comportamientos dirigidos a metas (Brancato, et al., 2017). Se ha propuesto que los estímulos reforzantes y aversivos de alta intensidad promueven el establecimiento de la memoria ya que permiten la consolidación, sin embargo, se sabe poco con respecto a los mecanismos celulares que subyacen la interpretación de la relevancia de la información para su consolidación (Murty et al., 2016).

Se ha reportado que la intensidad del estímulo está relacionada con la cantidad de dopamina liberada (Hagnal et al., 2004) y a su vez que la intensidad de un estímulo determina su procesamiento y su almacenamiento en la memoria, estableciendo que estímulos de mayor intensidad permiten la formación de trazos de memoria más fuertes (Ding et al., 2008). Sin embargo, se desconoce la relación entre la actividad de neuronas dopaminérgicas en el VTA, la codificación de la intensidad del estímulo y el establecimiento de la memoria de estímulos recompensantes y aversivos. Lo que nos llevó a preguntarnos ¿Cuál es el efecto de la activación optogenética de neuronas dopaminérgicas del VTA durante la presentación de estímulos recompensantes y aversivos de baja intensidad en el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor? Hipotetizamos que la activación optogenética permitirá que los estímulos sean codificados como estímulos intensos y esto permitirá que se establezca la memoria.

Estudiar la relación entre: la actividad dopaminérgica del VTA, la intensidad de los estímulos (recompensantes o aversivos) y la memoria, resulta importante ya que esto podría ayudar a esclarecer cuales son los mecanismos que permiten la interpretación de la relevancia de la información para controlar su preservación en la memoria a largo. Así como también mejorar el entendimiento de los componentes que permiten la formación y el establecimiento de memorias recompensantes y aversivas. Inclusive, el presente trabajo propone una forma de cómo podría ser la traducción de la intensidad de un estímulo a componentes neurales que le permitan al sistema saber qué información debe ser consolidada.

Hipótesis

La activación optogenética de neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral permite que se establezca la memoria de reconocimiento al sabor de estímulos de baja intensidad, independientemente de la valencia del estímulo.

Objetivos

Objetivo General

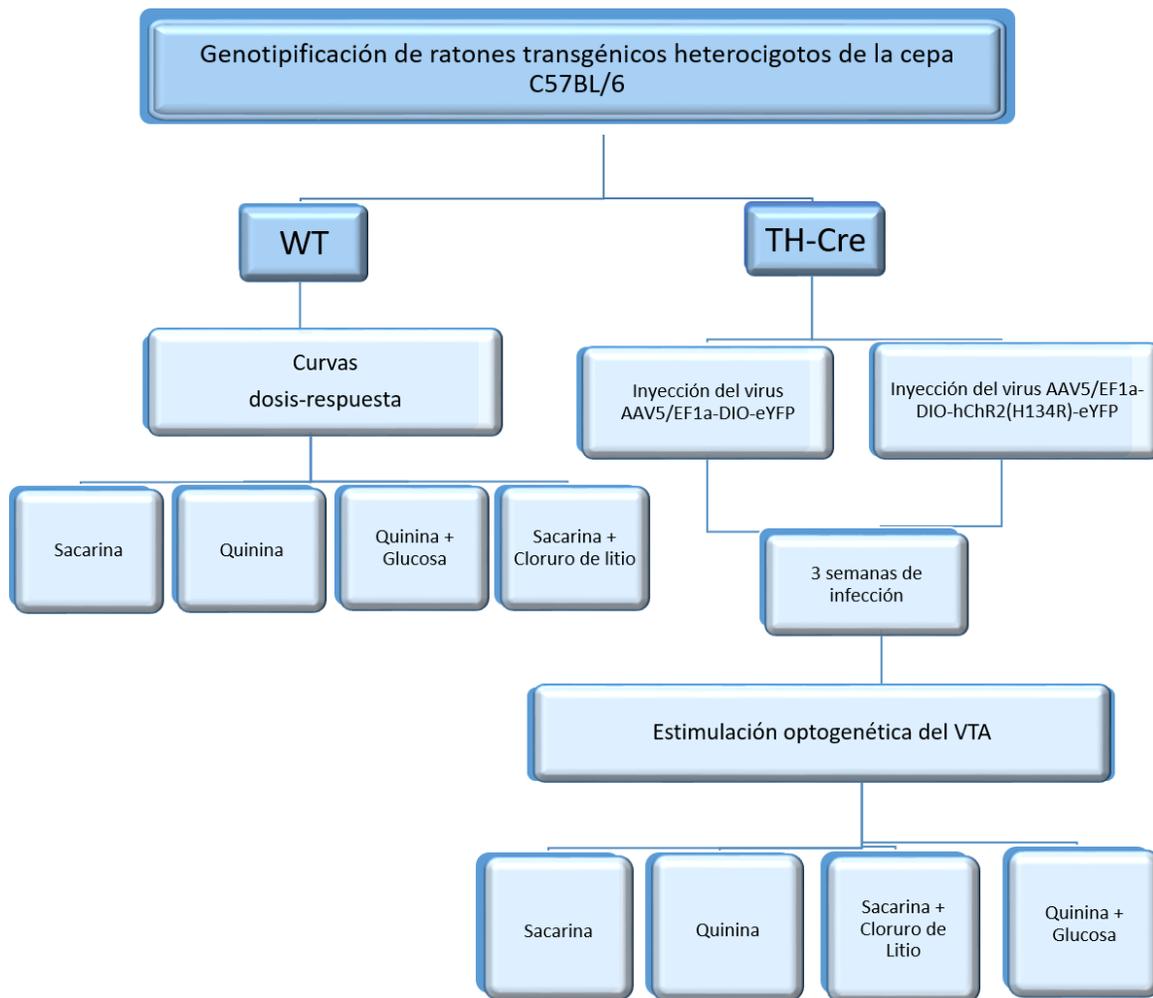
Determinar el efecto que tiene la activación optogenética de neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral sobre el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor ante estímulos de baja intensidad, tanto recompensantes como aversivos.

Objetivos Particulares

- Establecer la concentración más baja de sacarina que no permite que los ratones establezcan una memoria de reconocimiento al sabor.
- Establecer la concentración más baja de quinina que no permite que los ratones establezcan una memoria de reconocimiento al sabor.
- Establecer la dosis más baja de cloruro de litio que no permite que los ratones establezcan una memoria de aversión al sabor.
- Establecer la dosis de glucosa que no permite que los ratones establezcan una memoria de preferencia al sabor.
- Evaluar si la activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral durante la presentación de sacarina y quinina en concentraciones subumbrales permite el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor.

- Evaluar si la activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral durante la presentación de sacarina y quinina asociadas con agentes inductores como glucosa y cloruro de litio, en concentraciones subumbrales, permite el establecimiento de una memoria de aversión o de preferencia al sabor.

Diagrama de Trabajo



Metodología general

Sujetos

Se utilizaron 98 ratones de la cepa C57BL/6, de aproximadamente 2 a 4 meses, machos y hembras, de los cuales 50 fueron ratones Wild-type y 48 ratones transgénicos TH-Cre heterocigotos, los cuales expresan la proteína cre-recombinasa bajo el promotor de la enzima tirosina hidroxilasa, por lo tanto, la cre-recombinasa solo se expresó en neuronas catecolaminérgicas.

Los ratones fueron alojados individualmente en cajas de acrílico transparente (29.5 cm de largo, 18.5 cm de ancho y 12.5 cm de alto) con aserrín que se cambiaba 3 veces a la semana, en el *vivarium* del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con ciclo luz/obscuridad de 12h/12h, hora de encendido 6 a.m., 22°C de temperatura y humedad de 50%. Hasta antes de las tareas conductuales se les mantuvo en una dieta de alimento (lab diet 5001) y agua *ad libitum*.

Todos los experimentos cumplieron los lineamientos del reglamento del comité para el cuidado y uso de animales del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (FBR125-18) el cual establece el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) acerca de las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2001).

La experimentadora recibió capacitación teórica y práctica en: “Taller de manejo y uso de roedores de laboratorio” que se acreditó el 1 de febrero del 2018, por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Genotipificación

Para determinar qué ratones expresaban el transgén se realizó una genotipificación por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica que permite replicar un fragmento específico de DNA (Hernández et al.,2012).

- Extracción del DNA

Se cortó 1 cm de tejido en las colas de los ratones. El tejido fue macerado mecánicamente y se agregó una solución de lisis alcalina (250µL de NaOH 10 N + 40 µl de EDTA 0.5 M; 100 ml de H₂O). Las muestras se incubaron a 95°C durante 60 min y después se les añadió una solución de neutralización (Tris-HCl 40 Mm; 100 ml de H₂O). Todas las muestras fueron centrifugadas a 12500 rpm durante 2 min a 22 °C.

- Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez extraído el DNA, se agregó a las muestras la mezcla de los siguientes reactivos:

Volúmenes por muestra	
Agua	12.07 µl
Buffer 10 x	2.0 µl
dNTPs	0.5 µl
cebador Cre FWD 10 mM	1.0 µl
cebador Cre REV 10 mM	1.0 µl
Cloruro de Magnesio (Mg Cl ₂)	1.33 µl
Taq polimerasa	0.1 µl
DNA	2 µl

La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

Cre REV 5' GGTTTCCCGCAGAACCTGAA

Cre FWD 5' AGCCTGTTTTGCACGTTCCACC

Posteriormente las muestras se colocaron en el termociclador, el cual fue programado de la siguiente manera:

94 °C	94 °C	55°C	72°C	72°C	4°C	55°C
5 min	30 s	30 s	1 min	3 min	∞	30 s


35 ciclos

- Corrimiento de las muestras en el gel de agarosa

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2%, el cual fue preparado agregando 0.8 g de agarosa a 40 ml de TAE (Tris-base 0.039M; ácido acético 0.015M; EDTA0.01M; pH 7.4). El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 µl) para marcar los sitios de presencia de DNA.

A las muestras que salieron del termociclador se les agregó el buffer de carga (50% de glicerol, 0.25 % de azul de bromofenol, 0.25% de cianol de xileno en buffer de muestra 10x QUIAGEN) para observar el corrimiento en el gel. Se cargaron 10 µL de cada muestra por carril de gel y fueron corridas en una solución amortiguadora TAE (Tris-base 0.039M; ácido acético 0.015M; EDTA0.01M; pH 7.4) a 70 V durante 50 min.

Cirugía para inyección del vector viral

Se inyectó el virus cre-dependiente AAV5/EF1a-DIO-eYFP (grupos control) y AAV5/EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP (grupos experimentales) en el VTA de ratones transgénicos TH-Cre. Los ratones del grupo control expresaron únicamente la proteína reportera (EYFP) en las neuronas dopaminérgicas que expresaban la cre-recombinasa. Mientras que los ratones del grupo

experimental expresaron el canal catiónico sensible a luz (ChR2) y la proteína reportera (EYFP) en las neuronas dopaminérgicas que expresaban la cre-recombinasa.

Los ratones fueron montados en el aparato estereotáxico y anestesiados con isoflurano (1-2 %) por vía inhalatoria. Después se realizó una incisión para exponer bregma en el cráneo de los ratones. Las infecciones fueron realizadas en el VTA y se utilizaron las siguientes coordenadas con respecto a bregma: AP: -3.0 ML: ± 0.6 DV: -4.8 (Dong, 2008). La fibra óptica fue implantada en el VTA con las siguientes coordenadas con respecto a bregma: AP: -3.0 ML: ± 0.6 DV: -4.3 (Dong, 2008) y se colocó con un ángulo de 10°. Se utilizó una micro jeringa Hamilton conectada a un inyector, a través de una tubería de polietileno y se inyectó 0.5 μL de virus por hemisferio de cada ratón a una tasa de 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$, controlado por una bomba de microinfusión. Después de la infusión, el inyector se dejó en el lugar de infección durante 3 min para permitir la difusión. Finalmente, se cubrió con acrílico toda la superficie expuesta. Después de 3 semanas de infección se pasó a realizar las tareas conductuales.

Memoria de reconocimiento al sabor

La memoria de reconocimiento al sabor es la habilidad de evaluar la familiaridad de los sabores previamente consumidos, además, permite a los organismos asociar las claves relacionadas con la comida a las consecuencias de su ingesta. Como paradigma conductual, la memoria de reconocimiento al sabor es un modelo útil para estudiar los sustratos anatómicos, celulares y moleculares de la formación de la memoria (Bermúdez, 2004).

Para evaluar la memoria de reconocimiento se realizó el siguiente protocolo. Se privó a los ratones de agua por 24 h. Después se les restringió solo presentándoles líquidos en dos periodos, uno en la mañana por 20 min y otro en la tarde durante 10 min para evitar que los ratones se deshidratarán.

Los ratones fueron habituados en burbujas de acrílico donde se realizó posteriormente la estimulación y se registraron líneas basales de consumo de agua, en este espacio se les presentaron 2 bebederos de agua purificada. Estas habituaciones duraron 20 min cada una y se realizaron por 5 días, con el fin de estabilizar los consumos basales y después compararlos con los consumos en la adquisición de la memoria de reconocimiento al sabor. En el día 6 se llevó a cabo la fase de adquisición en la que se presentaron dos bebederos con una solución de sacarina o quinina. Finalmente, en el día 7 se realizó la prueba de evocación en donde se presentó a los ratones dos bebederos uno con agua y otro con la solución utilizada en el día de la adquisición (quinina o sacarina) (Ver figura 10). Se registró el consumo de agua en mililitros, para todas las fases del protocolo conductual. Para el análisis de los datos se utilizó un índice de consumo expresado como la cantidad consumida de líquido entre el consumo total de los dos líquidos utilizados (consumo del líquido X / (consumo del líquido X + consumo del líquido Y)). Un índice de consumo de 0.5 indica que no hay preferencia por ninguno de los dos líquidos, mientras que un índice de consumo significativamente más alto que 0.5 demuestra preferencia por alguno. La fórmula que se utilizó para sacar el índice de consumo fue la siguiente:

$$\text{índice de consumo} = \frac{\text{Volumen de sacarina o quinina (ml)}}{\text{Volumen total (ml)}}$$

Volumen total = volumen de sacarina o quinina (ml) + volumen de agua (ml).

En las comparaciones del consumo de la línea base y la adquisición se promediaron los tres últimos días de la línea base y con este promedio se sacó el índice de consumo de la adquisición, expresado como la cantidad consumida en la adquisición entre el consumo total, que es el consumo de la adquisición más el consumo de la línea base. En este sentido, un índice de consumo de 0.5 indica que no hay diferencia entre el consumo de la línea base y el de la adquisición mientras que un índice de consumo significativamente más alto que 0.5 demuestra un consumo mayor en la

adquisición que en la línea base. La fórmula que se utilizó para sacar el índice de consumo de la adquisición fue la siguiente:

$$\text{índice de consumo de la adquisición} = \frac{\text{volumen consumido en la adquisición (ml)}}{\text{Volumen total (ml)}}$$

Volumen total = volumen consumido en la adquisición (sacarina o quinina) (ml) + volumen consumido en la línea base (promedio de los tres últimos días de la línea base) (agua) (ml).

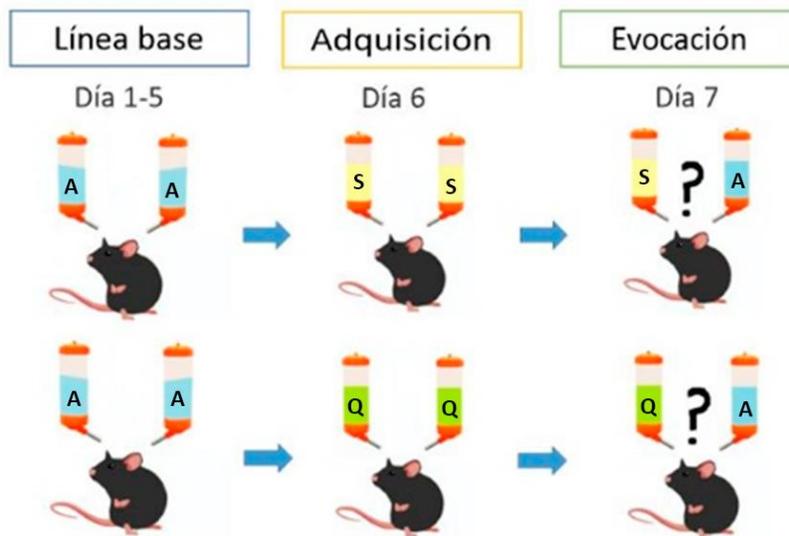


Figura 10. Protocolo conductual para evaluar la memoria de reconocimiento al sabor. En la línea base, día 1 al 5, se presentaron dos bebederos con agua; en la adquisición, día 6, dos bebederos con la solución de acuerdo al grupo experimental (sacarina o quinina) y finalmente, en la evocación, día 7, un bebedero con la solución (quinina o sacarina) y otro con agua. Los bebederos azules (A) representan agua, los amarillos (S) sacarina y los verdes (Q) quinina.

Curvas de dosis-respuesta de estímulos gustativos

Para la curva dosis-respuesta de sacarina se utilizaron tres concentraciones: 0.1%, 0.2% y 0.3% para lo que se requirió tener 3 grupos de ratones. En la adquisición se presentó la solución de sacarina en dos bebederos con la concentración de acuerdo con el grupo que se estaba evaluando. En la prueba de evocación se presentó un bebedero con agua y otro con sacarina para determinar si los ratones identificaban el sabor de la sacarina.

Cabe mencionar que no se utilizó una escala logarítmica para las curvas de dosis-respuesta (excepto para la curva de dosis-respuesta de glucosa) ya que las respuestas de los ratones cambiaban con respecto a diferencias muy sutiles en las concentraciones y dosis. También debido a que utilizar concentraciones más altas cambiaría la valencia de los estímulos, por ejemplo, la sacarina se volvería aversiva.

Para la curva dosis-respuesta de **quinina** se utilizaron tres concentraciones: 0.005 %, 0.01% y 0.02%, para lo que se requirió tener 3 grupos de ratones. En la adquisición se presentó la solución de quinina en dos bebederos con la concentración de acuerdo con el grupo que se estaba evaluando. En la prueba de evocación se presentó un bebedero con agua y otro con quinina para determinar si los ratones identificaban el sabor de la quinina.

Curvas de dosis-respuesta con estímulos gustativos asociados a agentes inductores

En la curva dosis-respuesta de **cloruro de litio** se utilizaron tres dosis: 48 mg/kg (0.15M), 70 mg/kg (0.2M) y 127 mg/kg (0.4M) para lo que se requirió tener 3 grupos de ratones. En este caso la solución utilizada para la adquisición fue sacarina 0.1%. En la curva dosis-respuesta de **glucosa** las tres dosis utilizadas fueron: 0.5 mg/kg (0.37mM), 5 mg/kg (3.7mM) y 50 mg/kg (37mM) por lo tanto se requirió tener 3 grupos de ratones. Las dosis utilizadas fueron determinadas experimentalmente, se realizaron pruebas con diferentes dosis y de acuerdo a las respuestas de los animales se eligieron las antes mencionadas. La solución utilizada para la adquisición fue quinina 0.005%. El protocolo conductual fue igual que en la memoria gustativa de reconocimiento al sabor, solo que ahora se inyectó cloruro de litio o glucosa 10 min después de acabada la adquisición (Ver figura 11).

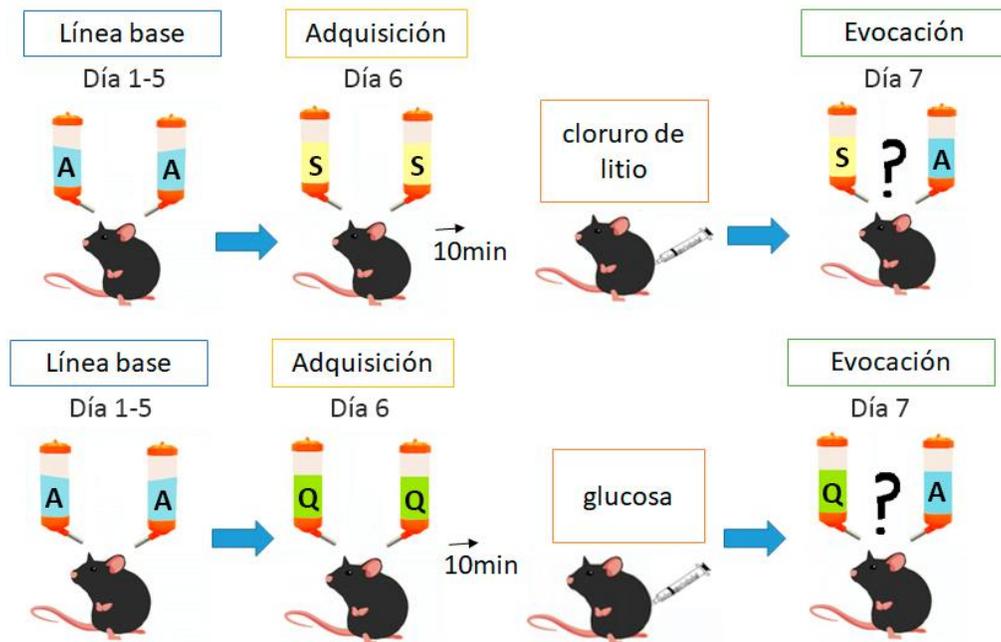


Figura 11. Protocolo conductual para evaluar la memoria de reconocimiento al sabor asociado a agentes inductores. En la línea base, día 1 al 5, se presentaron dos bebederos con agua; en la adquisición, día 6, dos bebederos con la solución de acuerdo al grupo experimental (sacarina o quinina) y después de 10 min se realizó la inyección de cloruro de litio o de glucosa, finalmente, en la evocación, día 7, un bebedero con la solución (quinina o sacarina) y otro con agua. Los bebederos azules (A) representan agua, los amarillos (S) sacarina y los verdes (Q) quinina.

Optogenética

Para estimular las neuronas dopaminérgicas del VTA se recurrió a la optogenética, técnica que utiliza proteínas sensibles a la luz (opsinas) para controlar el flujo iónico y de esta manera permite activar poblaciones neuronales, específica y diferencialmente, con precisión de milisegundos (Häusser, 2014; Herrera et al., 2014).

Para llevar a cabo esta metodología se inyectó en el VTA de los ratones un vector viral portador del gen que codifica el canal catiónico activado por luz “channelrhodopsin-2” (ChR2) en marco fusionado a una proteína fluorescente amarilla (ChR2-EYFP). Para garantizar que el canal catiónico (ChR2) solo se expresara en las neuronas dopaminérgicas se utilizó un vector viral adeno-asociado inducible por Cre (AAV) con un marco de lectura abierto invertido de doble flujo (ORF, por sus siglas en inglés), en el que la secuencia ChR2-EYFP está presente en la orientación

antisentido. De esta forma al utilizar ratones transgénicos TH-Cre se permitió la expresión específica del canal en neuronas dopaminérgicas. Tras la traducción, las células TH que expresaron Cre invierten el ORF de ChR2-EYFP de manera irreversible y, por lo tanto, activan la expresión sostenida del canal catiónico, lo que nos permitió estimular las neuronas dopaminérgicas del VTA (Buchen, 2010; Tsai et al., 2009).

Se estimuló durante la adquisición de estímulos gustativos con un láser DPSS (de estado sólido bombeado por diodos, por sus siglas en inglés) con una luz azul de longitud de onda de 473 nm, amplitud de 5mV, la frecuencia de estimulación fue de 20 Hz con pulsos de 5 ms de duración, un pulso cada 50 ms. La potencia de los cables utilizada fue de 10 a 15 mW. Los parámetros de estimulación fueron determinados gracias a trabajos previos en los que se demuestra que esta frecuencia y amplitud de estimulación son los parámetros óptimos para estimular las neuronas dopaminérgicas del VTA (Gil, et al., 2020; Tsai et al., 2009).

Inmunohistoquímicas

Al terminar las pruebas conductuales, los ratones fueron eutanasiados con pentobarbital sódico a una dosis de 75 mg/kg y fueron perfundidos con solución salina isotónica (SSI) al 0.9% y paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído 4% durante 3 días, posteriormente, se pasaron a sacarosa al 30 %, fueron cortados en un criostato a una temperatura de -20 °C (Leica CM1520). Se realizaron cortes coronales de 40 µm en el VTA, se eligieron 3 cortes por ratón, los de las coordenadas AP: -2.78, -3.08 y -3.18, aproximadamente (Dong, 2008). Los cortes coronales del VTA fueron lavados con solución de buffer trizma (TBS) 3 veces y nBS + Tritón 0.1% (TBS-T) una vez, cada lavado duró 10 min en agitación.

Se incubó el anticuerpo primario Anti-TH (PeelFreez), host rabbit (1:1000), durante 24 h a 4° C en agitación. El anticuerpo se preparó en TBS con albúmina de suero bovino al 5% (TBS-BSA).

Al siguiente día se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con TBS en agitación y después se incubó el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit Cy3 (1:250) durante 90 min en oscuridad y agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo se preparó en TBS-BSA al 5%. Posteriormente, se realizaron otros 3 lavados en TBS de 10 min cada uno y se hizo la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM durante 3 min. Luego se montaron los cortes en laminillas silanizadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako, S3023). Finalmente se observaron las muestras con un microscopio confocal LSM800. Las imágenes fueron editadas utilizando el programa Image J.

Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar que los datos se distribuían de forma normal. Y la prueba de Levene para comprobar que los datos tuvieran homogeneidad de varianzas. Ya que todos los datos se distribuían de forma normal y existía homogeneidad de varianzas se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas para analizar los datos. Se utilizó una prueba *t* de *Student* pareada con una $p < 0.05$ en la que se comparó el índice de consumo de agua y el índice de consumo de sacarina o quinina dependiendo del experimento. Incluso en las curvas dosis-respuesta se realizó este análisis para cada uno de los grupos, comparando el índice de consumo de sacarina o quinina y el índice de consumo de agua. Lo que permitió analizar si había preferencia por algún líquido y por lo tanto esto demostraría que los ratones habían establecido una memoria de reconocimiento al sabor.

Resultados

Infección de los somas de neuronas dopaminérgicas en el VTA

Con el objetivo de analizar la correcta infección de las neuronas dopaminérgicas se realizó una inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (TH) en cortes coronales del VTA de ratones

transgénicos TH-cre que expresan la proteína cre-recombinasa bajo el promotor de la enzima TH. Se observó que la señal de la enzima tirosina hidroxilasa colocalizó con la proteína reportera EYFP en los somas del VTA. Por lo tanto, las neuronas dopaminérgicas del VTA expresaron el canal catiónico acoplado a la proteína reportera EYFP, la infección fue observada con microscopia confocal (Ver figura 12).

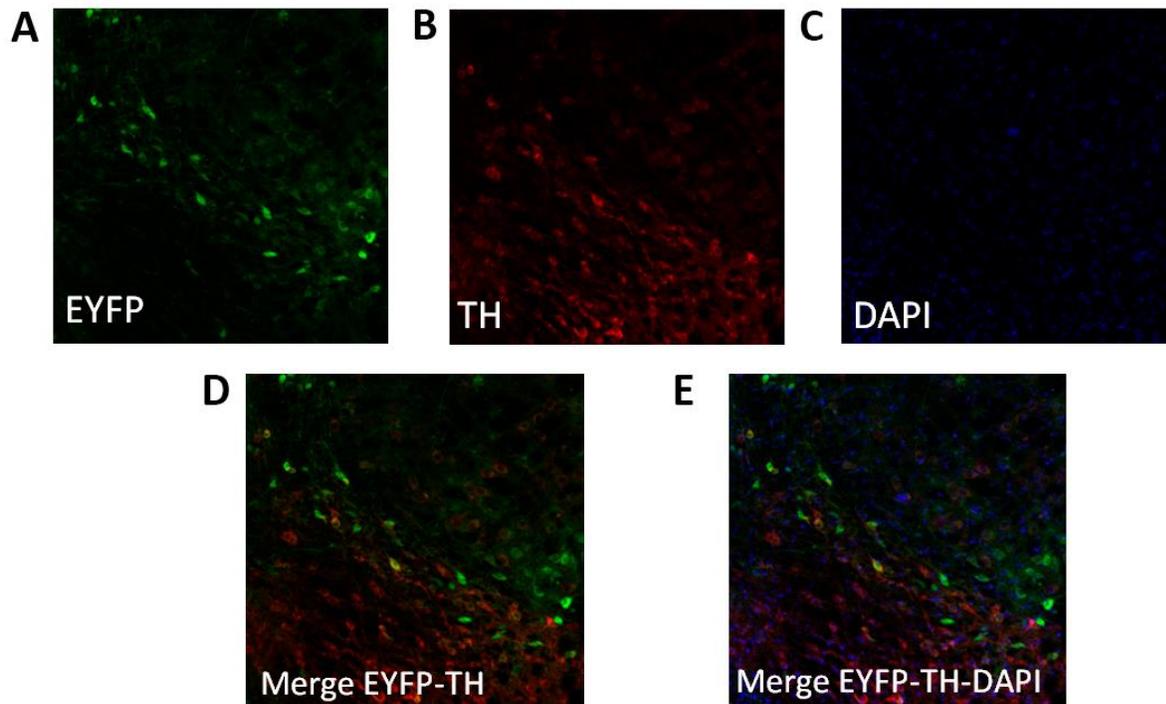


Figura 12. Infección de los somas de neuronas dopaminérgicas del VTA. En A se muestra la proteína mejorada amarilla fluorescente (EYFP). En B la inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH). En C los núcleos de las neuronas que son teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). En D la colocalización (Merge) de las neuronas que expresan EYFP y TH. En E la colocalización (Merge) de las neuronas que expresan EYFP, TH y DAPI.

Respuesta de reconocimiento a diferentes concentraciones de sacarina y quinina

Para la curva dosis-respuesta de sacarina, durante la adquisición se presentaron dos bebederos con sacarina a diferentes concentraciones 0.1%, 0.2% y 0.3% y en la evocación se presentó un bebedero con sacarina y otro con agua (Ver figura 13 A). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el índice de consumo de agua y el de sacarina en la prueba de evocación para

ninguna de las concentraciones utilizadas (0.01% $t_{(4)} = 0.1499$ $p > 0.05$, 0.2 % $t_{(4)} = 2.562$ $p > 0.05$ y 0.3 % $t_{(4)} = 1.758$ $p > 0.05$). Por lo tanto, la concentración de 0.1% es la concentración más baja que no permite que los ratones discriminen entre el agua y la sacarina (Ver figura 13 B). Para la curva dosis-respuesta de quinina, durante la adquisición se presentaron dos bebederos con quinina a diferentes concentraciones 0.005%, 0.01% y 0.02% y en la evocación se presentó un bebedero con quinina y otro con agua (Ver figura 13 C). Los ratones que bebieron quinina a una concentración de 0.005% no discriminaron el sabor amargo de la quinina y el del agua ($t_{(5)} = 0.1371$ $p > 0.05$) al igual que los ratones que bebieron quinina a una concentración de 0.01% ($t_{(4)} = 2.251$ $p > 0.05$) mientras que a la concentración de 0.02% los ratones si discriminaron el sabor, ya que prefirieron beber agua y evitaron el consumo de quinina ($t_{(5)} = 9.498$ $p < 0.01$). Por lo tanto, la concentración de 0.005% es la concentración más baja que no permite que los ratones discriminen entre el agua y la quinina (Ver figura 13 D). Consecuentemente, las concentraciones bajas de 0.1% de sacarina y 0.005% de quinina fueron usadas como estímulos gustativos débiles debido a que los ratones no discriminan el sabor dulce o amargo respecto al agua bajo estas concentraciones.

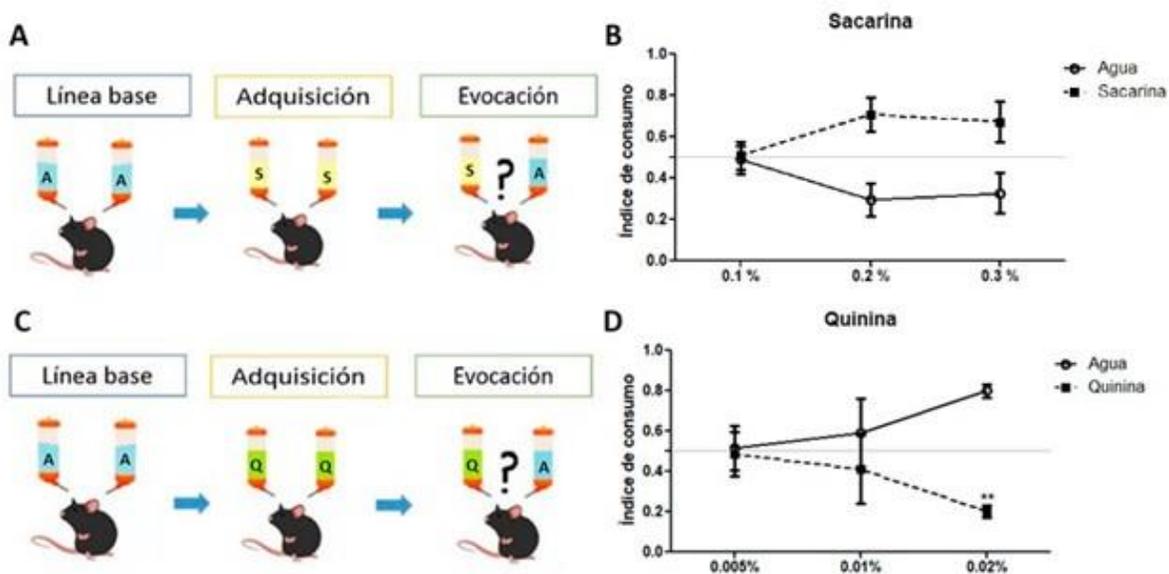


Figura 13. Respuesta de reconocimiento a diferentes concentraciones de sacarina y quinina. En A se muestra el esquema del protocolo conductual que se utilizó para la curva dosis-respuesta de sacarina. En la línea base se

presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con sacarina y finalmente en la evocación un bebedero con agua y otro con sacarina. En **B** se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación para las tres concentraciones de sacarina propuestas: 0.1% (n=4) 0.2% (n=4) y 0.3% (n=4). En **C** se muestra el esquema del protocolo conductual que se utilizó para la curva dosis-respuesta de quinina. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con quinina y finalmente en la evocación un bebedero con agua y otro con quinina. En **D** se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación para las tres concentraciones de quinina propuestas: 0.005% (n=5), 0.01% (n=4) y 0.02% (n=5). La línea gris representa el azar 0.5. ** $p < 0.01$.

Respuesta de reconocimiento a sabores asociados a agentes inductores

Para la curva dosis-respuesta de cloruro de litio, durante la adquisición se presentaron dos bebederos con sacarina a una concentración baja de 0.1% y 10 min después se administró por vía intraperitoneal tres dosis diferentes: 48 mg/kg, 70 mg/kg y 127 mg/kg; de cloruro de litio (Ver figura 14 A). Se observó que los ratones que fueron administrados con la dosis de 48 mg/kg de cloruro de litio no formaron la asociación entre el sabor dulce y el malestar gástrico, ya que consumieron de forma similar agua y sacarina ($t_{(4)} = 1.481$ $p > 0.05$) al igual que los ratones que fueron administrados con una dosis de 70 mg/kg ($t_{(4)} = 0.1825$ $p > 0.05$). Mientras que los ratones que fueron administrados con una dosis de 127 mg/kg prefirieron el agua y evitaron la sacarina, ya que asociaron el sabor de la sacarina con el malestar gástrico que provoca el cloruro de litio ($t_{(4)} = 4.433$ $p < 0.05$). Por lo tanto, la dosis de 48 mg/kg es la dosis más baja de cloruro de litio que no permite que los ratones asocien el sabor de la sacarina con el malestar gástrico que provoca la inyección de cloruro de litio (Ver figura 14 B). Por otro lado, para la curva dosis-respuesta de glucosa durante la adquisición se presentaron dos bebederos con quinina a una concentración baja de 0.005% y 10 min después se administró por vía intraperitoneal tres dosis diferentes: 0.5 mg/kg, 5 mg/kg y 50 mg/kg; de glucosa (Ver figura 14 C). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el índice de consumo de agua y el de quinina en la prueba de evocación para ninguna de las dosis de glucosa utilizadas (0.5 mg/kg $t_{(4)} = 0.196$ $p > 0.05$, 5 mg/kg $t_{(4)} = 2.677$ $p > 0.05$ y 50mg/kg $t_{(4)} = 1.987$ $p > 0.05$). Por lo tanto, la dosis de 0.5 mg/kg es la dosis más baja de

glucosa que no permite que los ratones asocien el sabor amargo de la quinina con la recompensa nutricional que implica la administración de glucosa (Ver figura 14 D). Consecuentemente, las dosis bajas de 48 mg/kg de cloruro de litio y 0.5 mg/kg de glucosa fueron usadas como estímulos inductores débiles debido a que los ratones no asociaron el sabor dulce (sacarina) y el malestar gástrico (cloruro de litio), o el sabor amargo (quinina) y la consecuencia nutricional recompensante (glucosa) bajo estas dosis.

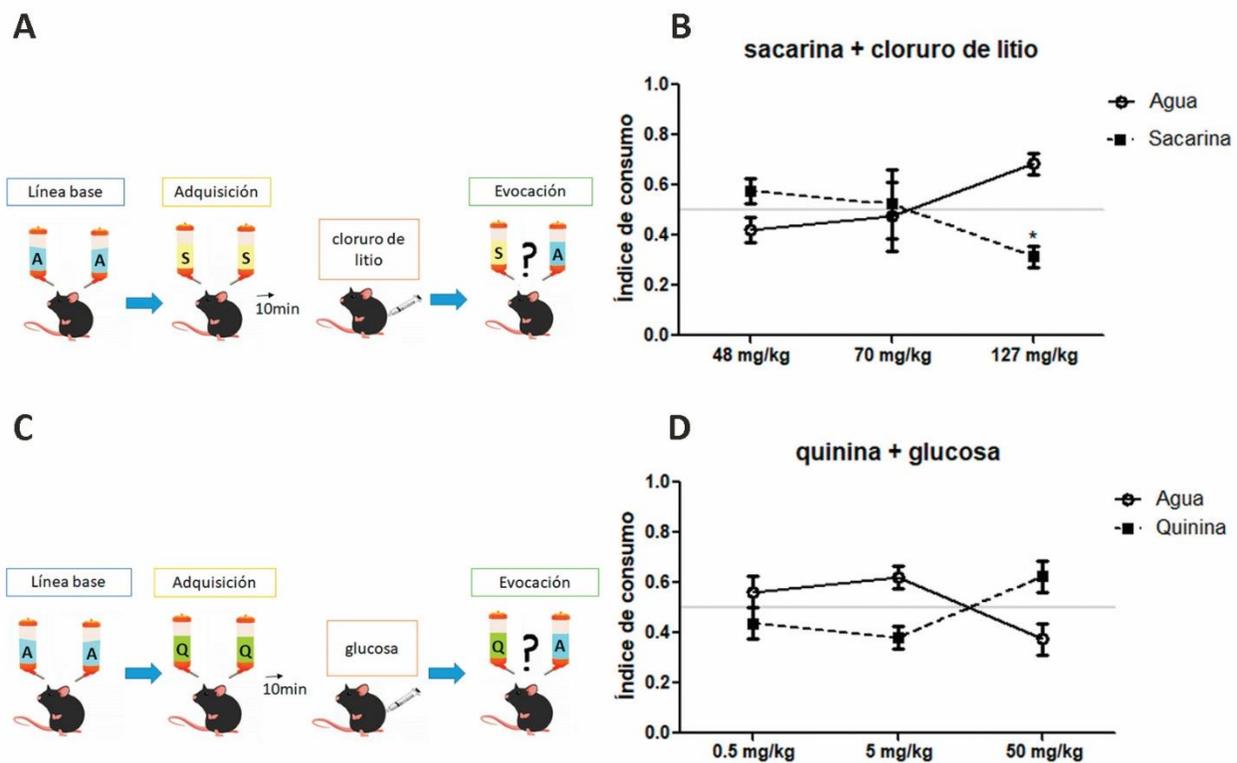


Figura 14. Respuesta gustativa a sabores asociados a agentes inductores. En A se muestra el esquema del protocolo conductual que se utilizó para la curva dosis-respuesta de cloruro de litio. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con sacarina 0.1% y después de 10 min se inyectó cloruro de litio, finalmente en la evocación se presentó un bebedero con agua y otro con sacarina 0.1%. En B se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación para las tres dosis de cloruro de litio propuestas: 48 mg/kg (n=4) 70 mg/kg (n=4) y 127 mg/kg (n=4). En C se muestra el esquema del protocolo conductual que se utilizó para la curva dosis-respuesta de glucosa. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con quinina 0.005% y después de 10 min se inyectó glucosa, finalmente en la evocación se presentó un bebedero con agua y otro con quinina 0.005%. En D se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación para las tres dosis de glucosa propuestas: 0.5 mg/kg (n=4), 5 mg/kg (n=4) y 50 mg/kg (n=4). La línea gris representa el azar 0.5. * p< 0.05.

Respuesta de reconocimiento al sabor después de la estimulación optogénética de las neuronas dopaminérgicas del VTA

En la evocación se evaluaron dos grupos, uno que solo expresaba la proteína reportera (EYFP) y otro que expresaba el canal catiónico (ChR2). El grupo ChR2 que recibió la estimulación optogénica de las neuronas dopaminérgicas del VTA durante la adquisición de sacarina 0.1% aumentó su consumo de sacarina durante la prueba de evocación ($t_{(6)} = 35.00$ $p < 0.001$), mientras que el grupo EYFP consumió de forma similar agua y sacarina ($t_{(6)} = 1.548$ $p > 0.05$) (Ver figura 15 B). Por otro lado, el grupo ChR2 que recibió la estimulación durante la adquisición de quinina 0.005% disminuyó su consumo de quinina durante la prueba de evocación ($t_{(6)} = 3.225$ $p < 0.05$), mientras que el grupo EYFP consumió de forma similar agua y quinina ($t_{(6)} = 0.3224$ $p > 0.05$) (Ver figura 15 D). Por lo tanto, la estimulación de los somas de neuronas dopaminérgicas en el VTA aumentó la intensidad de los estímulos y permitió que se estableciera una memoria de reconocimiento al sabor, independientemente de la valencia del estímulo.

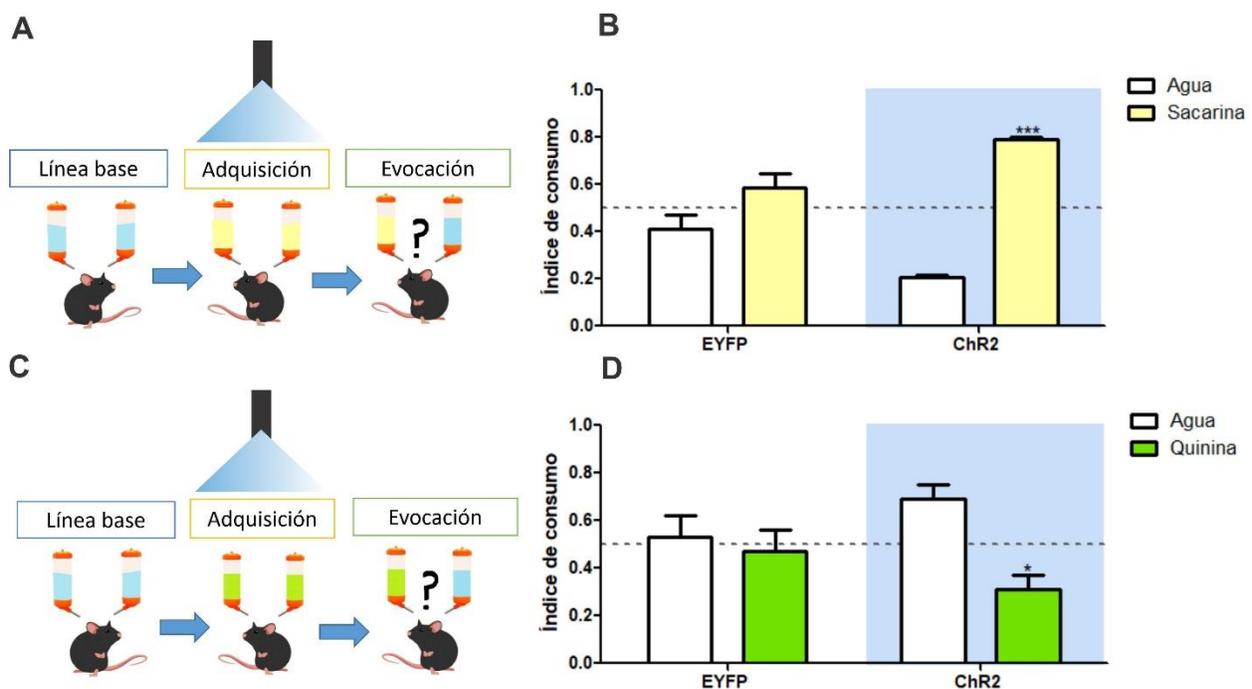


Figura 15. Respuesta de reconocimiento al sabor después de la estimulación de las neuronas dopaminérgicas del VTA. En A se muestra un esquema del protocolo conductual que se utilizó para la memoria de reconocimiento a sacarina. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con sacarina 0.1%

y finalmente en la evocación un bebedero con agua y otro con sacarina 0.1%. En **B** se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación del grupo con la proteína reportera (EYFP n=6) y del grupo con el canal catiónico (ChR2 n=6). En **C** se muestra un esquema del protocolo conductual que se utilizó para la memoria de reconocimiento a quinina. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con quinina 0.005% y finalmente en la evocación un bebedero con agua y otro con quinina 0.005%. En **D** se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación del grupo con la proteína reportera (EYFP n=6) y del grupo con el canal catiónico (ChR2 n=6). La línea punteada representa el azar 0.5. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.

Respuesta de reconocimiento a estímulos asociados a agentes inductores después de la estimulación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del VTA

En la evocación se evaluó si los ratones establecieron una memoria de reconocimiento al sabor, se evaluaron dos grupos, uno que solo expresaba la proteína reportera (EYFP) y otro que expresaba el canal catiónico (ChR2). El grupo ChR2 que recibió la estimulación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del VTA durante la adquisición de sacarina 0.1% seguida de la administración de cloruro de litio 48 mg/kg disminuyó su consumo de sacarina durante la prueba de evocación ($t_{(6)} = 4.719$ $p < 0.01$) ya que asoció el malestar gástrico producido por el cloruro de litio con el sabor de la sacarina. Mientras que el grupo EYFP consumió de forma similar agua y sacarina ($t_{(6)} = 0.8407$ $p > 0.05$) (Ver figura 16 B). Por otro lado, el grupo ChR2 que recibió la estimulación durante la adquisición de quinina 0.005% seguida de la administración de 0.5 mg/kg de glucosa consumió de forma similar agua y quinina ($t_{(6)} = 0.05873$ $p > 0.05$) al igual que el grupo EYFP ($t_{(6)} = 0.2324$ $p > 0.05$) (Ver figura 16 D). Por lo tanto, la estimulación de los somas de neuronas dopaminérgicas en el VTA aumentó la intensidad de los estímulos y permitió que se estableciera una memoria de condicionamiento aversivo al sabor, pero no fue suficiente para permitir que se estableciera una memoria de preferencia al sabor. Aunque si bien no se estableció una memoria de preferencia por la quinina no se observa una aversión por la misma como en el experimento anterior.

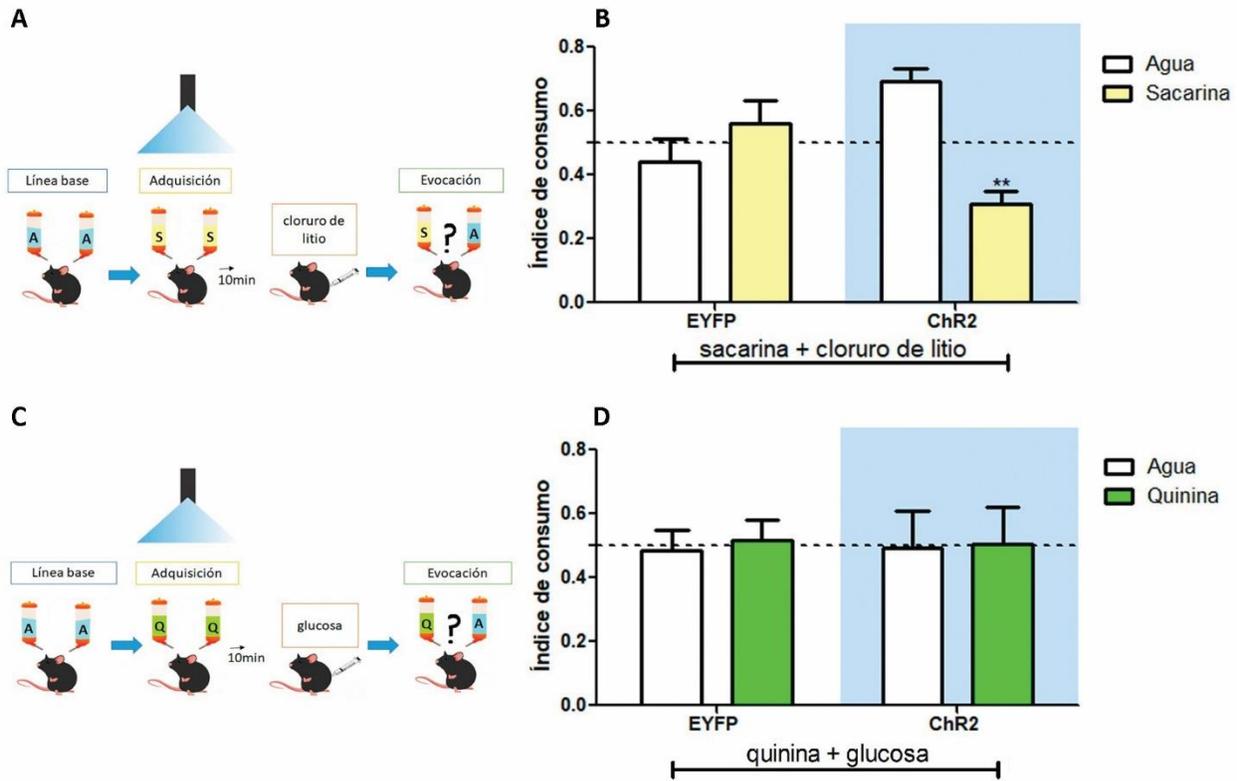


Figura 16. Respuesta gustativa a estímulos asociados a agentes inductores después de la estimulación de las neuronas dopaminérgicas del VTA. En A se muestra el esquema del protocolo conductual que se utilizó para la memoria gustativa a sacarina 0.1%. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con sacarina 0.1% y después de 10 min se inyectó cloruro de litio a una dosis de 48 mg/kg, finalmente en la evocación se presentó un bebedero con agua y otro con sacarina 0.1%. En B se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación del grupo con la proteína reportera (EYFP n=6) y del grupo con el canal catiónico (ChR2 n=6). En C se muestra un esquema del protocolo conductual que se utilizó para la memoria gustativa de quinina 0.005%. En la línea base se presentaron dos bebederos con agua, en la adquisición dos bebederos con quinina 0.005% y después de 10 min se inyectó glucosa a una dosis de 0.5 mg/kg, finalmente en la evocación se presentó un bebedero con agua y otro con quinina 0.005%. En D se muestra el índice de consumo en la prueba de evocación del grupo con la proteína reportera (EYFP n=6) y del grupo con el canal catiónico (ChR2 n=6). La línea punteada representa el azar 0.5. ** p < 0.01.

Discusión

En este trabajo encontramos que la activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del VTA permite que los ratones codifiquen los estímulos como si tuvieran una mayor intensidad, independientemente de la valencia del estímulo, y con esto permite el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor, cuando se presenta un solo estímulo. Observamos que los ratones que fueron estimulados en los somas del VTA desarrollaron una preferencia por la sacarina

0.1% (condición débil) y una aversión por la quinina 0.005% (condición débil), es decir los ratones se comportaron como si estos estímulos fueran de una alta intensidad, ya que los resultados en la prueba de evocación de los ratones estimulados (ChR2) fueron similares a los obtenidos en la curva dosis respuesta ante estímulos de alta intensidad como sacarina 0.3% y quinina 0.02% en donde los ratones preferían la sacarina y tenían aversión por la quinina. Estos resultados a su vez concuerdan con estudios que mencionan que las neuronas dopaminérgicas no solo codifican estímulos recompensantes, sino también estímulos aversivos (Bromberg et al., 2010; Cho et al., 2017; Horvitz, 2000).

Al estimular los somas de neuronas dopaminérgicas del VTA aumentamos la intensidad tanto de estímulos aversivos como de estímulos recompensantes, quizás debido a que estimulamos todo el VTA y no una región en específico ya que se ha demostrado que la población específica de neuronas que se active en el VTA, así como sus proyecciones y en general el circuito en el que estén inmersas, determina la codificación de la aversión o la recompensa del estímulo (Lammel et al., 2012). Se ha visto que si se estimula el tegmentum dorsalateral quien conecta con neuronas dopaminérgicas del VTA lateral quienes a su vez proyectan a la parte lateral del núcleo accumbens shell se puede causar un condicionamiento de preferencia al lugar, mientras que, si se estimulan las neuronas de la habénula lateral quienes hacen sinapsis con neuronas dopaminérgicas del VTA medial y proyectan a la corteza prefrontal medial se puede causar un condicionamiento de aversión al lugar, lo que demuestra que diferentes poblaciones dopaminérgicas del VTA señalizan la preferencia o la aversión (Lammel et al., 2012).

Una vez establecido el modelo conductual en donde la estimulación de los somas dopaminérgicos del VTA aumentaba la intensidad de los estímulos gustativos (sacarina o quinina) y permitía el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor nos preguntamos si un agente inductor como cloruro de litio o glucosa, asociado al primer estímulo (sacarina o quinina)

también podía ser potenciado como consecuencia de la activación de las neuronas dopaminérgicas en el VTA y de esta forma permitir el establecimiento de una memoria aversiva o de preferencia al sabor. En la presentación de sacarina 0.1% y 48 mg/kg de cloruro de litio encontramos que la estimulación permitió que ambos estímulos fueran codificados con mayor intensidad y por lo tanto se estableciera una memoria asociativa. Afirmamos que aumentó la intensidad de los estímulos ya que los resultados en la prueba de evocación de los ratones estimulados (ChR2) fueron similares a los obtenidos en la curva dosis-respuesta ante cloruro de litio a una dosis de 127 mg/kg, en donde los ratones tenían aversión por la sacarina ya que había sido asociada al malestar gástrico que provoca la inyección de cloruro de litio. Los ratones que fueron inyectados con una dosis baja de cloruro de litio gracias a la estimulación optogenética fueron capaces de establecer una memoria de condicionamiento aversivo al sabor.

En la presentación de quinina 0.005 % y 0.5 mg/kg de glucosa encontramos que la estimulación aumentó la intensidad de los estímulos, pero no se pudo establecer una memoria asociativa de preferencia. Podemos decir que aumentó la intensidad de los estímulos puesto que si bien no se hizo apetitiva la quinina 0.005% los ratones no presentaron aversión por ella como cuando solo se presentó quinina 0.005% y se estimuló optogenéticamente. Proponemos que quizás la memoria de los estímulos gustativos que causan consecuencias negativas es más importante para los organismos que la memoria de estímulos que causan consecuencias nutricionales positivas, ya que la supervivencia depende altamente de la capacidad de aprender a evitar sustancias dañinas de la dieta. Por lo tanto, resulta más fácil formar una asociación entre un sabor dulce como la sacarina y un malestar gástrico inducido por el cloruro de litio, que una asociación entre un sabor amargo como la quinina y una consecuencia nutricional positiva como la glucosa. También es preciso mencionar que existen menos estudios de los circuitos neurales que median la memoria de

preferencia al sabor, en comparación con los estudios sobre la memoria de aversión al sabor (Touzani y Sclafani, 2001).

La probable explicación para describir los resultados obtenidos en el aprendizaje asociativo es que la información de los estímulos gustativos y de los agentes inductores que se procesa es aumentada gracias a la estimulación de los somas de neuronas dopaminérgicas del VTA, la estimulación aumenta la comunicación y permite que llegue la información a la corteza insular (corteza gustativa). El circuito que sigue la información gustativa y visceral relacionada con la memoria gustativa es el siguiente: la información de los estímulos gustativos entra al sistema a través de las papilas gustativas se dirige al núcleo del tracto solitario (NTS) a través de los nervios craneales y posteriormente, las neuronas del NTS proyectan al núcleo parabrancial posteromedial (PBN), quien distribuye la información a diferentes estructuras como: el hipotálamo lateral (HL), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), la amígdala basolateral (BLA) y central (CEA), el área tegmental ventral (VTA) y la parte parvocelular del núcleo posteromedial ventral del tálamo (VPMpc) quien proyecta a la corteza insular gustativa. La información de los inputs viscerales causados por los agentes inductores llega al cerebro a través de dos vías, por el nervio vago o por agentes inductores que viajan a través de la sangre que llegan al área postrema, región con una barrera hematoencefálica más débil que el resto del cerebro. Estas dos vías proyectan a la parte caudal del NTS y este a su vez proyecta a la subdivisión lateral externa del PBN, a la CEA y al núcleo hipotalámico paraventricular. La integración de los estímulos gustativos y de los agentes inductores se logra gracias a la convergencia de las estructuras que conforman el circuito (Bermúdez, 2004).

Proponemos que el circuito que estamos potenciando al activar las neuronas dopaminérgicas del VTA, comienza desde el PBN y continúa con conexiones dopaminérgicas hacia el VTA que es el núcleo que codifica la información de estímulos recompensantes y aversivos por medio de

neuronas dopaminérgicas (Lammel et al., 2012; Matsumoto y Hikosaka, 2009). Posteriormente, la información viaja a través de una vía dopaminérgica directa entre el VTA y la IC, puesto que se ha demostrado que si se estimula optogenéticamente los somas dopaminérgicos del VTA hay una fuerte liberación de dopamina en la corteza insular anterior (Gil et al., 2020). También es probable que la información viaje a través de una vía indirecta que conecta el VTA con el núcleo accumbens (nAcc), quien modula el núcleo basal magnocelular (NBM) quien finalmente conecta con la corteza insular (corteza gustativa) (Ramírez et al., 2007). O bien, a través de otra vía indirecta del VTA hacia la amígdala quien también conecta con la corteza insular (CI), se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas de la vía VTA-amígdala basal son activadas por consecuencias tanto apetitivas como aversivas (Guzmán y Bermúdez, 2012; Lutas et al., 2019). (Ver figura 17).

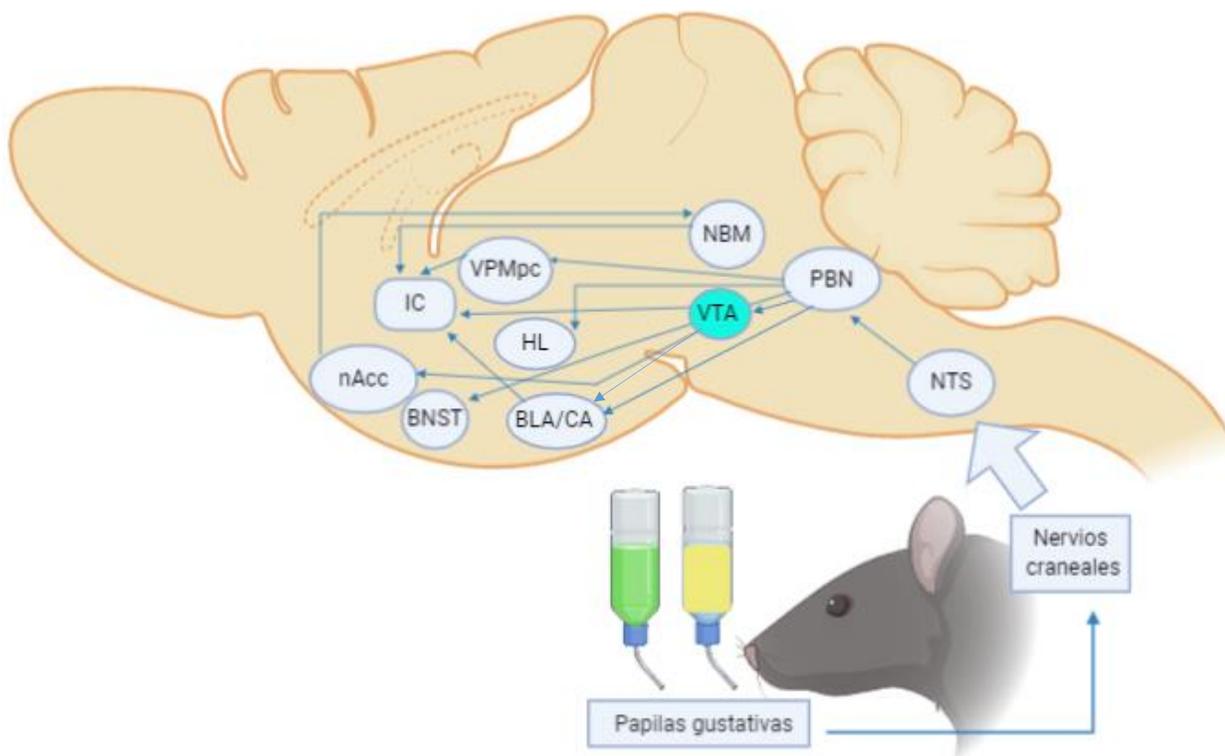


Figura 17. Circuito memoria de reconocimiento al sabor. Esquema del camino que sigue la información gustativa. Comienza desde la entrada de la información al organismo, desde las papilas gustativas, posteriormente, por medio de los nervios craneales llega al primer relevo en el cerebro el núcleo del tracto solitario (NTS), después pasa al núcleo parabrancial (PBN) y de allí se distribuye a diferentes núcleos cerebrales: a la amígdala central (CA) y basolateral

(BLA), al hipotálamo lateral (HL) al núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), al área tegmental ventral (VTA) y a la parte parvocelular del núcleo posteromedial del tálamo (VPMpc) quien después proyecta a la corteza insular gustativa (IC). La vía que hipotetizamos estamos manipulando, de forma natural comenzaría en el núcleo parabrancial (NPB) después estimulamos las neuronas dopaminérgicas del VTA quienes se comunican directamente con la corteza insular a través de una vía dopaminérgica. O a través de una vía indirecta conectando con el núcleo accumbens (nAcc) estructura que modula el núcleo basal magnocelular (NBM) que finalmente conecta con la corteza insular (CI). O bien, a través de otra vía indirecta, del VTA hacia la amígdala quien también conecta con la corteza insular (CI) (Modificado de Bermúdez, 2004).

Se ha encontrado que muchas células del núcleo parabrancial (PBN) hacen contacto directo con neuronas dopaminérgicas en el VTA y el consumo de quinina o sacarosa puede activar esta vía, demostrando que la información de sabores tanto recompensantes como aversivos es enviada a una interface clave relacionada con la recompensa (Boughter et al., 2019). Esto nos ayuda a explicar porque al estimular neuronas dopaminérgicas del VTA vemos un aumento en la intensidad procesada de estímulos gustativos aversivos y recompensantes, lo que genera una preferencia por la sacarina 0.1% (condición débil) y una aversión por la quinina 0.005% (condición débil).

Pensamos que la información gustativa del VTA pasa al nAcc ya que independientemente de que esta es una vía dopaminérgica ampliamente estudiada, se ha reportado que las neuronas de este núcleo responden de forma diferencial a infusiones intraorales de quinina y sacarosa (Roitman, et al., 2005). También se ha demostrado que en el nAcc los niveles extracelulares de dopamina incrementan de forma dependiente a la concentración de sacarosa que se administre a los animales (Hagnal et al., 2004), Extrapolando esta información es posible que la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA aumente los niveles extracelulares de dopamina en el nAcc y esto permita que los ratones codifiquen la sacarina a una mayor concentración, lo que les permite a su vez identificarla y establecer la memoria gustativa correspondiente. Además, en este circuito hipotético también consideramos al nAcc porque se ha visto involucrado en la asociación del sabor con las consecuencias viscerales, es decir está implicado en el establecimiento de memorias gustativas aversivas y memorias gustativas seguras (Ramírez et al., 2007). Resulta importante resaltar que

nuestra aproximación experimental solo nos permite hipotetizar acerca de estas vías, ya que en el presente trabajo solo se manipuló el VTA y no se abordó ninguna otra estructura.

Por otro lado, la memoria de condicionamiento de preferencia al sabor se ha visto relacionada con el hipotálamo lateral, lesiones o la inyección de un antagonista de receptores D1 en esta área reduce el condicionamiento de preferencia al sabor (CPS) (sabor-nutriente), inducido por una inyección de glucosa. Ratas con una lesión en el hipotálamo lateral no adquieren una memoria de preferencia al sabor mientras que si aprenden a evitar sabores apareados con una infusión de cloruro de litio es decir si adquieren una memoria de condicionamiento aversivo al sabor (Touzani et al., 2013). También se ha demostrado que coadministrar antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA y dopaminérgicos D1 en la amígdala eliminan la adquisición de CPS (sabor-nutriente) mediado por una inyección de glucosa (Amador et al., 2014). Por lo tanto, quizá para poder lograr que los ratones formaran una memoria de preferencia al sabor, se hubiera necesitado aparte de la estimulación de los somas de neuronas dopaminérgicas en el VTA, otras manipulaciones que permitieran modificar más mecanismos neuroquímicos en diferentes estructuras.

A nivel celular, probablemente el aumento en la intensidad de los estímulos y el establecimiento de la memoria gustativa pudiese deberse a que, la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA permite que aumente la cantidad de dopamina liberada al medio extracelular lo que a su vez, ya que la dopamina funciona como un input que modula, estimula a la adenilato ciclasa gracias a la unión de la dopamina con receptores acoplados a proteínas G, permitiendo con esto que se active la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) debido a la disociación de las subunidades catalíticas de esta enzima de sus subunidades regulatorias (Bernabeu, 1997). Lo que permite que se fosforilen receptores NMDA glutamatérgicos y así su tiempo de apertura sea mayor. La activación de la PKA inhibe la actividad de fosfatasas lo que aumenta la fosforilación de la calcio/calmodulina proteína quinasa tipo II (CAMKII) (Bermudez, 2004). Y también causa que las

subunidades catalíticas recluten a las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y después ambas se transloquen a núcleo donde pueden fosforilar targets nucleares como otras quinasas, que a su vez fosforilan factores de transcripción, como CREB, lo que regula la expresión génica e implica síntesis de nuevas proteínas y aumento de la cantidad de receptores glutamatérgicos en sinapsis preexistentes como en nuevas sinapsis, lo que permite que se establezca una memoria de largo plazo (Abel y Lattal, 2001). Este mecanismo celular hipotético explicaría el incremento de la intensidad de los estímulos gracias al aumento de receptores glutamatérgicos o un aumento de los receptores glutamatérgicos fosforilados, debido al aumento de dopamina liberada en el VTA y por lo tanto un aumento en la comunicación celular explica a su vez la llegada de la información a estructuras clave para la memoria gustativa como la corteza insular.

Conclusiones

- La activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral durante la presentación de sacarina y quinina en concentraciones subumbrales permite el establecimiento de la memoria de reconocimiento al sabor.
- La activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral durante la presentación de sacarina asociada con cloruro de litio, en concentración y dosis subumbrales, permite el establecimiento de una memoria de aversión al sabor, sin embargo, la activación de las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral durante la presentación de quinina asociada con glucosa, en concentración y dosis subumbrales, no permite el establecimiento de una memoria de preferencia al sabor.

Referencias

Abel, T. y Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-X)

Amador, N. J., Rotella, F. M., Bernal, S. Y., Malkusz, D., Cruz, J. A. D., Badalia, A., Duenas, S. M, Hossain, M., Gerges, M., Kandov, S., Touzani, K., Sclafani, A., Bodnar, R. J. (2014). Effect of dopamine D1 and D2 receptor antagonism in the lateral hypothalamus on the expression and acquisition of fructose-conditioned flavor preference in rats. *Brain Research*, 1542, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.030>.

Ayano, G. (2016) Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment*, 2, 120. <https://doi.org/10.4172/2471-271X.1000120>

Baars, B. J. y Gage, N. M. (2010). *Cognition, brain, and consciousness: introduction to cognitive neuroscience*. Elsevier Academic Press.

Baddeley, A. D. (1999). *Essential of human memory*. Hove: Psychology.

Barik, A. y Krashes, M. J. (2018). Remembering a Bad Taste. *Neuron*, 100(4), 765–767. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.012>

Batsell, R.W. J. y George, J. W. (1996). Unconditioned stimulus intensity and retention interval effects. *Physiology y Behavior*, 60 (6), 1463-1467.

Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A., Fraire Martínez, M. I., Hernández Cruz, A., Calvo i Graells, M., Urra, X., Vizcaíno, X. y Del Sol M.J. (2016). *Neurociencia: la exploración del cerebro*. Wolters Kluwer.

Bermudez, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 209–217.

Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I. y Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (13), 7041–7046. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7041>

Bodnar, R. J. (2018). Conditioned flavor preferences in animals: merging pharmacology, brain sites and genetic variance. *Appetite*, 122, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.015>

Brancato, A., Cavallaro, A., Lavanco, G., Plescia, F., & Cannizzaro, C. (2017). Reward-related limbic memory and stimulation of the cannabinoid system: An upgrade in value attribution? *Journal of Psychopharmacology*, 32(2), 204–214. <https://doi.org/10.1177/0269881117725683>

Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M. y Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>

Boughter, J. J. D., Lu, L., Saites, L. N. y Tokita, K. (2019). Sweet and bitter taste stimuli activate VTA projection neurons in the parabrachial nucleus. *Brain Research*, 1714, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.02.027>

Buchen, L. (2010). Neuroscience: Illuminating the brain. *Nature*, 465 (7294), 26–28. <https://doi.org/10.1038/465026a>

Carlson, N. R. (2014). *Fisiología de la conducta*. Pearson Educación.

Chaudhari, N. y Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *The Journal of Cell Biology*, 190(3), 285-296.

Cho, J. R., Treweek, J. B., Robinson, J. E., Xiao, C., Bremner, L. R., Greenbaum, A. y Gradinaru, V. (2017). Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron*, 94(6), 1205–1219.

Coizet, V., Dommett, E. J., Redgrave, P. y Overton, P. G. (2006). Nociceptive responses of midbrain dopaminergic neurons are modulated by the superior colliculus in the rat. *Neuroscience*, 139(4), 1479–1493. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.030>

Ding, H. K., Teixeira, C. M. y Frankland, P. W. (2008) Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning and Memory*, 15(5), 290–293. <https://doi.org/10.1101/lm.905008>

Dong, H. W. (2008). The Allen reference atlas: A digital color brain atlas of the C57Bl/6J male mouse. John Wiley & Sons Inc.

Dudai Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Rev Psychology*, 55, 51–86.

Dudas, B. (2014). *The central catecholaminergic system: anatomy, functions and disorders*. Nova Science Publishers

Fields, L., Hjelmstad, G.O., Margolis, E. B. y Nicola, S. M. (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annual Review of Neuroscience.*, 30 (2007), 289-316.

Gil, E., Balderas, I., Moreno, P., Luis, J., McDevitt, R. A., Tecuapetla, F., Gutierrez, R., Bonci, A. y Bermúdez, F. (2020). Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory. *Communications Biology*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0862-z>

Goldstein, D. S., Eisenhofer, G. y McCarty, R. (1998). *Catecholamines: bridging basic science with clinical medicine*. Academic Press.

Guzmán, K. y Bermúdez, F. (2012). Interplay of amygdala and insular cortex during and after associative taste aversion memory formation. *Reviews in the neurosciences*, 23(5-6), 463–471. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0056>

Hajnal, A., Smith, G. P. y Norgren, R. (2004). “Oral Sucrose Stimulation Increases Accumbens Dopamine in the Rat.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286 (1), R31–37.

Häusser, M. (2014). Optogenetics: the age of light. *Nature Methods*, 11(10), 1012–1014. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3111>

Hawkins, R. D. y Byrne, J. H. (2015). Associative Learning in Invertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1-17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021709>

Hernández, A. L., Cortés, I. A., y Ríos, G. E. (2012). Evaluación del método de diagnóstico molecular de bordetella pertussis y bordetella parapertussis por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (QPCR) [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México] TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2012/agosto/0682286/Index.html>

Herrera, C. G., Adamantidis, A., Zhang, F., Deisseroth, K., y de Lecea, L. (2014). Optogenetic Dissection of Neural Circuit Function in Behaving Animals. *Neuromethods*, 143–160. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1963-5_7

Holly, E. y Miczek, K. (2016). Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology*, 233(2), 163–186. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4151-3>

Horvitz, J. (2000). Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience*, 96(4), 651–656.

Iwata, S., Yoshida, R. y Ninomiya, Y. (2014). Taste transductions in taste receptor cells: basic tastes and moreover. *Current Pharmaceutical Design*, 20(16), 2684–2692.

Kandel, E. R. (2006). *In search of memory: the emergence of a new science of mind*. John Wiley y Sons.

Kudo, E. y Fujii, Y. (2012). *Dopamine: functions regulation and health effects*. Nova Science Publishers.

Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., y Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–217.

Lechner, H. A. y Byrne, J. H. (1998). New Perspectives on Classical Conditioning: a Synthesis of Hebbian and Non-Hebbian Mechanisms. *Neuron*, 20(3), 355–358.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80977-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80977-0)

Lutas, A., Kucukdereli, H., Alturkistani, O., Carty, C., Sugden, A. U., Fernando, K., Diaz, V., Flores-Maldonado, V. y Andermann, M. L. (2019). State-specific gating of salient cues by midbrain dopaminergic input to basal amygdala. *Nature neuroscience*, 22(11), 1820–1833.
<https://doi.org/10.1038/s41593-019-0506-0>

Matsumoto, M. y Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, 459, 837–841.

Miranda, M. I. (2007). Changes in Neurotransmitter Extracellular Levels during Memory Formation. In F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. CRC Press/Taylor & Francis.

Mongia, S., Yamaguchi, T., Liu, B., Zhang, S., Wang, H., y Morales, M. (2019). The Ventral Tegmental Area has calbindin neurons with the capability to co-release glutamate and dopamine into the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 50(12), 3968–3984.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14493>

Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *CIC. Cuadernos de Información y Comunicación*, 10, 221-233.

Moriya, S., Yamashita, A., Kawashima, S., Nishi, R., Kuwaki, T. y Yamanaka, A. (2018). Acute Aversive Stimuli Rapidly Increase the Activity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Awake Mice. *Neuroscience*, 386, 16–23.

Murty, V. P., Tompary, A., Adcock, R. A., & Davachi, L. (2016). Selectivity in Postencoding Connectivity with High-Level Visual Cortex Is Associated with Reward-Motivated Memory. *The Journal of Neuroscience*, 37(3), 537–545. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4032-15.2016>

Overton, P. G., Vautrelle, N. y Redgrave, P. (2014). Sensory regulation of dopaminergic cell activity: phenomenology, circuitry and function. *Neuroscience*, 282, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.023>

Namburi, P., Al-Hasani, R., Calhoon, G. G., Bruchas, M. R., & Tye, K. M. (2016). Architectural Representation of Valence in the Limbic System. *Neuropsychopharmacology*, 41, 1697-1715. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.358>

Poirazi, P. y Mel, B. W. (2001). Impact of Active Dendrites and Structural Plasticity on the Memory Capacity of Neural Tissue. *Neuron*, 29 (3), 779–796. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00252-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00252-5)

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., Mooney, R. D. y White, L. E. (2018). *Neuroscience*. Oxford University Press.

Ramírez, L., Núñez, L. y Bermúdez, F. (2007). Taste Memory Formation: Role of Nucleus Accumbens. *Chemical Senses*, (1), 93-97.

Roitman, M. F., Wheeler, R. A. y Carelli, R. M. (2005). Nucleus Accumbens Neurons Are Innately Tuned for Rewarding and Aversive Taste Stimuli, Encode Their Predictors, and Are Linked to Motor Output. *Neuron*, 45(4), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.055>

Touzani K., Bodnar R. J., Sclafani A. (2013). Glucose-conditioned flavor preference learning requires co-activation of NMDA and dopamine D1-like receptors within the amygdala.

Neurobiology of Learning and Memory, 106, 95–101

Tsai, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., y Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning.

Science, 324 (5930), 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>

Ventura, R., Morrone, C. y Puglisi-Allegra, S. (2007). Prefrontal/Accumbal Catecholamine System Determines Motivational Salience Attribution to Both Reward- and Aversion-Related Stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (12), 5181–5186. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610178104>

Wang, H.-L., Zhang, S., Qi, J., Wang, H., Cachope, R., Mejias-Aponte, C. A., Gomez, J. A., Mateo-Semidey, G. E., Beaudoin, G. M. J., Paladini, C. A., Cheer, J. F., & Morales, M. (2019). Dorsal Raphe Dual Serotonin-Glutamate Neurons Drive Reward by Establishing Excitatory Synapses on VTA Mesoaccumbens Dopamine Neurons. *Cell Reports*, 26(5), 1128–1142. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.014>

Wang, S. H. y Morris, R. G. M. (2010). Hippocampal-Neocortical Interactions in Memory Formation, Consolidation, and Reconsolidation. *Annual Review of Psychology*, 61(1), 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.1005>

Wise, R., A (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *Journal of Comparative Neurology*, 493(1), 115–121. <https://doi.org/10.1002/cne.20689>