



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EL PAPEL DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA AMÍGDALA EN EL
CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO

PRESENTA:

EMMANUEL RODRÍGUEZ NAVA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RODRIGUEZ SOTRES ROGELIO

VOCAL: Profesor: JOSE LANDEROS VALDEPEÑA

SECRETARIO: Profesor: JEAN-PASCAL MORIN

1er. SUPLENTE: Profesor: FELIX MORALES FLORES

2° SUPLENTE: Profesor: MANUEL ESTEBAN ENRIQUEZ VILLEDA

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA CONDUCTUAL,
FACULTAD DE MEDICINA.**

ASESOR DEL TEMA: DR. JEAN-PASCAL MORIN

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JEAN-PASCAL MORIN

SUSTENTANTE: RODRÍGUEZ NAVA EMMANUEL

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por brindarme las herramientas necesarias para poderme desarrollar como un buen profesionalista.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA por el financiamiento PAPIIT IA206521 (Dr. Jean-Pascal Morin), por los recursos económicos proporcionados para la adquisición de reactivos y materiales para el desarrollo del proyecto de investigación en Facultad de Medicina.

Agradezco especialmente a mi familia, que hicieron un gran sacrificio para que pudiese lograr mis objetivos, mis amigos que me apoyaron constantemente.

Al Dr. Jean-Pascal Morin al aceptarme en su grupo de investigación, ser un excelente tutor y padre académico.

Índice

Abreviaturas.....	6
Resumen	7
Introducción	7
Aprendizaje y memoria.....	7
Procesamiento del estímulo gustativo y condicionamiento aversivo al sabor (CAS).....	10
El condicionamiento aversivo al sabor (CAS) como aprendizaje asociativo	12
Sistema colinérgico	13
Objetivo.....	18
Justificación	18
Metodología	18
Sujetos	18
Cirugía estereotáxica.....	18
Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS)	23
Fármacos	25
Histología	26
Protocolo de preparación de laminillas cubiertas de gelatina para cortes histológicos.....	27
Técnica de tinción de Nissl	28
.....	29
Análisis estadístico.....	29
Resultados.....	30
Efecto de la escopolamina pre-adquisición del CAS.....	30

Efecto de la escopolamina post-adquisición del CAS	32
Efecto de la escopolamina sobre la evocación del CAS	38
Discusión	46
Los receptores muscarínicos en la BLA y CeA son necesarios para el aprendizaje del CAS	46
La inhibición de los muscarínicos en la post-adquisición permite la formación del CAS	47
La actividad de los receptores muscarínicos en la BLA , pero no en la CeA es necesaria para la evocación del CAS.....	48
Conclusiones y perspectivas.....	49
Referencias.....	50

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AMY	Amígdala
BLA	Amígdala basolateral
CAS	Condicionamiento aversivo al sabor
CAT	Colin acetiltransferasa
CeA	Amígdala central
CG	Corteza gustativa
EC	Estimulo condicionado
EI	Estimulo incondicionado
I.P.	Índice de preferencia
i.p.	Intraperitoneal
LiCl	Cloruro de litio
mAChr	Receptores muscarínicos
MCP	Memoria a corto plazo
MLP	Memoria a largo plazo
nAChr	Receptores nicotínicos
NTS	Núcleo del tracto solitario
SCOP	Escopolamina
VEH	Vehículo

Resumen

El condicionamiento aversivo al sabor (CAS) es un modelo de aprendizaje donde los animales asocian el componente gustativo de un alimento con una intoxicación posterior, resultando en la evitación de ese sabor específico en un encuentro futuro, lo cual es crucial para la supervivencia de los animales. Dos de las principales estructuras del prosencéfalo involucradas en el aprendizaje de esta tarea son la amígdala (AMY) y la corteza gustativa (CG). El sistema neuromodulatorio más estudiado en cuanto a su papel en la formación de la memoria es el sistema colinérgico central, en particular la señalización colinérgica a través de los receptores muscarínicos, receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G. En la CG, se ha demostrado que la señalización muscarínica participa en la adquisición del CAS. Por otro lado se ha demostrado que lesiones excitotóxicas, así como la inhibición de síntesis de proteínas en el AMY, impiden la formación de la memoria aversiva al sabor. El presente proyecto evaluó la participación de la señalización muscarínica en la AMY durante las distintas etapas del CAS, inhibiendo los receptores muscarínicos con el antagonista no selectivo escopolamina (SCOP) durante la adquisición, consolidación y evocación del CAS.

Introducción

Aprendizaje y memoria

El aprendizaje es un proceso de cambio en el estado de conocimiento del sujeto y, por consecuencia, en sus capacidades conductuales: como tal, es un proceso de adquisición mediante el cual se incorporan nuevos conocimientos y/o nuevas conductas, y formas de reaccionar al entorno en el que se encuentra el organismo. (Aguado Aguilar, 2001; Kandel, *et al.*, 2014). Se asume que la función del aprendizaje ha evolucionado a la par de los constantes cambios en el ambiente, permitiendo el ajuste del comportamiento de los organismos para asegurar su supervivencia. El aprendizaje se expresa en una gran variedad de formas que dependen de las condiciones bajo las cuales se haya producido (Timberlake, 1994).

Sokolov (1970) define la memoria como la conservación de la información transmitida por una señal después de que se ha suspendido la acción de dicha señal. De hecho, fisiológicamente los recuerdos se producen por variaciones de la sensibilidad de transmisión sináptica de una neurona a la siguiente. Estas variaciones a su vez generan nuevas vías o vías de transmisión de señales facilitadas por los circuitos neuronales del cerebro. Las vías nuevas son importantes porque una vez establecidas, la mente puede activarlas para producir los recuerdos aun sin el estímulo que inició el almacenamiento (Attneave *et al.*, 1950; Bear *et al.*, 2015)

El aprendizaje y la memoria son procesos íntimamente relacionados. Aprendemos y recordamos muchas cosas distintas, pero es importante tener en cuenta que estos dos procesos fisiológicos no necesariamente son implementados por las mismas estructuras neurales (Bear *et al.*, 2015). La memoria junto con el aprendizaje, abarcan una variedad de subcomponentes. Por ejemplo, se pueden enfocar en la dimensión temporal o diferenciar varias formas de memoria en virtud a su adquisición. Por experiencia diaria, sabemos que algunos recuerdos duran más que otros, por lo tanto, existe la memoria a largo plazo (MLP), representando aquellos que se pueden mantener por días, meses o años una vez guardados, mientras que la memoria a corto plazo (MCP) tiene una duración de minutos a horas y es particularmente vulnerable a la interrupción (Fig. 1).

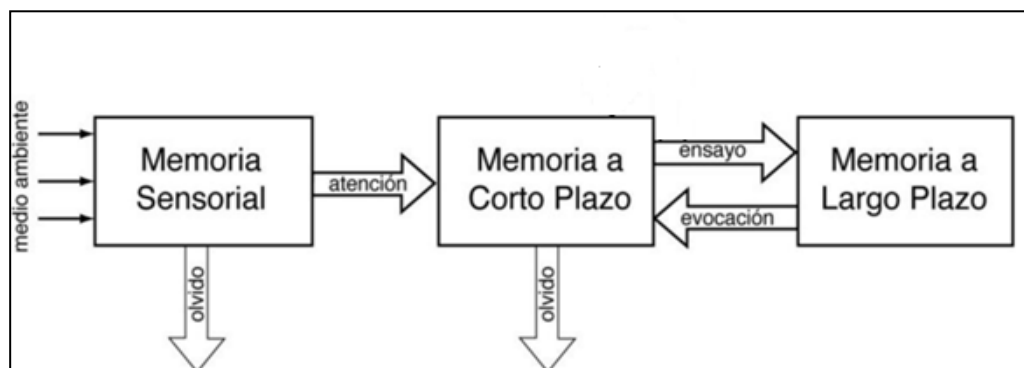


Fig. 1 Esquema de la formación de las memorias

Diversas observaciones han llevado a la idea de que los recuerdos se almacenan en la memoria reciente y se convierten selectivamente en una forma

permanente mediante un proceso llamado consolidación de la memoria. La consolidación de la memoria no requiere necesariamente de la memoria reciente como paso intermedio: ambos tipos de memoria pueden existir en paralelo (Bear *et al.*, 2015). El proceso de evocación permite la recuperación de información almacenada anteriormente y su utilización, misma que es procesada y relacionada con la información adquirida recientemente (Paller, 2009).

La estimulación sensorial procedente de estímulos externos, ya sean físicos o químicos, nos está bombardeando de forma constante. Dichos estímulos, al ser transducidos en representaciones neuronales a través de nuestros receptores sensoriales, permanecen en nuestra mente en forma de memoria sensorial (Ambrogio Lorenzini, *et al.*, 1999). Esta memoria que consiste en la representación neuronal de los estímulos externos es muy breve: dura alrededor de 300ms. Dentro de la abundancia de estímulos que llegan a la memoria sensorial, el animal distinguirá aquellos que son relevantes para su supervivencia o reproducción por un mecanismo denominado atención que, en mamíferos, depende de la actividad de la corteza prefrontal (Chandler, 2014). Sólo los estímulos atendidos de esta forma podrán ser aprendidos y recordados de forma subsecuente. Cabe mencionar que para cada modalidad sensorial (gusto, tacto visión etc.), la información está codificada y almacenada en redes neuronales que se encuentran en regiones específicas del encéfalo. Sin embargo, independientemente de la modalidad sensorial, estructuras que forman parte del lóbulo temporal medial, como la amígdala (AMY), el hipocampo y algunas regiones paleocorticales estarán involucradas en la formación del recuerdo. En el caso de la modalidad gustativa, estas también incluyen la corteza gustativa (CG), parte de la corteza insular. Este trabajo se centra en entender los procesos que ocurren en el cerebro en cuanto a cómo se forma la memoria gustativa, iniciada a partir de la interacción química que se da entre la lengua y el alimento consumido, desencadenando distintas respuestas a nivel cerebral dependiendo la percepción de dicho alimento.

Procesamiento del estímulo gustativo y condicionamiento aversivo al sabor (CAS)

Los mamíferos tenemos una preferencia innata por sabores relacionados con alimentos que presentan una buena aportación calórica y/o de nutrientes y una aversión innata hacia los sabores en alimentos potencialmente tóxicos. Además de esto, los procesos de aprendizaje gustativo nos permiten adquirir conocimientos o modificar el comportamiento, las habilidades y las preferencias existentes (Chen, *et al.*, 2018). Esta habilidad y la subsecuente formación de memorias, provee una ventaja evolutiva para el organismo que la posee, ya que puede modificar su comportamiento de manera adaptativa según su experiencia aumentando sus probabilidades de supervivencia (Walker, 2002). Concretamente, si una acción es recompensada, el comportamiento que la generó se verá reforzado. Por lo contrario, si la acción tiene consecuencias aversivas para el organismo, este corregirá su comportamiento para evitar la recurrencia de dicho acontecimiento. En el caso de la modalidad gustativa, los animales aprenden a distinguir entre los alimentos “seguros” y los tóxicos, basado en experiencias previas (Bermúdez Rattoni, 2004).

Centrándonos específicamente en la fisiología de la codificación del sabor, para el estímulo gustativo, las vías neuronales y las señales viscerales han sido ampliamente estudiados, utilizando enfoques anatómicos y electrofisiológicos su (Núñez Jaramillo *et al.*, 2010). A grandes rasgos, la codificación del estímulo gustativo comienza cuando se activan receptores gustativos en la cavidad oral, activando así receptores acoplados a proteínas G y canales iónicos expresados en células receptoras del gusto en la lengua (Staszko *et al.*, 2020). Las células que reciben la información sensorial al estimularse activan neuronas pertenecientes a los nervios craneales VII, IX y X, las cuales proyectan a su vez al núcleo del tracto solitario (NTS), ubicado en el bulbo raquídeo. Algunas neuronas de segundo orden que parten de este núcleo posteriormente hacen sinapsis en los núcleos talámicos posteromediales ventrales y otras hacen relevo en el núcleo parabraquial ubicado en el puente del tallo cerebral. De ahí, las fibras neuronales envían información gustativa al cerebro anterior, principalmente al área gustativa de la corteza insular y

a la AMY (Bermúdez-Rattoni, 2004), dos estructuras que también tienen abundantes conexiones recíprocas de tipo excitatorias (Escobar *et al.*, 1998; Fig. 2)

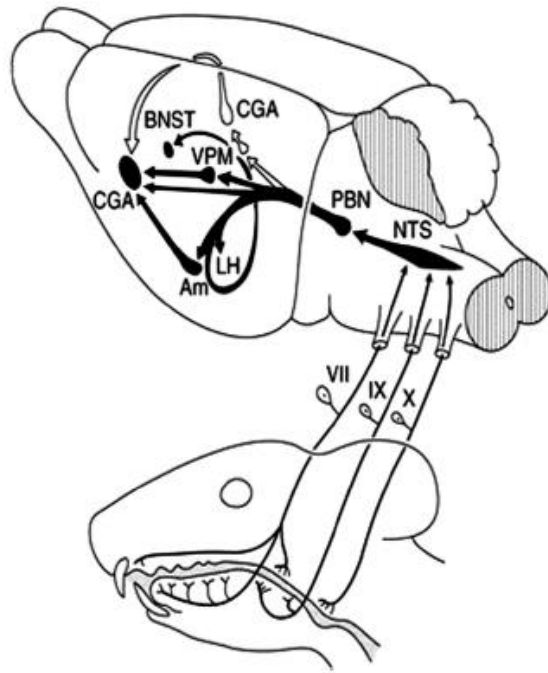


Fig. 2 Vías aferentes gustativas en la rata (Foy & Foy, 2016).

Distintas regiones de la CG, parcialmente segregadas, son activadas por cada uno de los sabores primarios. De manera interesante, dicha segregación es más pronunciada para estímulos gustativos con valores hedónicos opuestos. Por ejemplo, un sabor amargo que es innatamente aversivo producirá la activación de regiones posteriores de la CG mientras que un estímulo dulce que es innatamente apetitivo activará regiones anteriores de dicha corteza (Accolla *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2018).

Así como la CG interviene en el procesamiento del estímulo gustativo, también se ha demostrado que tiene un papel en el proceso de adquisición (Gallo *et al.*, 1994), consolidación y evocación del CAS (Reilly 2005; Yiannakas, 2017). Se ha sugerido que, por un lado, la CG es la encargada del procesamiento inicial del sabor posterior a la familiarización (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010; Yiannakas, 2017)

mientras que la amígdala es esencial para establecer asociaciones de sabor y malestar (Gallo *et al.*, 1992) y para ello, se cree que son importantes sus conexiones recíprocas con la amígdala.

La amígdala (AMY) o complejo amigdalino, es una región heterogénea que se divide en múltiples núcleos (Reilly, 2005), principalmente conformada por un complejo basolateral (BLA), éste está compuesto por neuronas piramidales glutamatérgicas. La central (CeA) que tiene proyecciones con la BLA y está compuesto por neuronas espinosas (LeDoux, 2007). La AMY cumple funciones en el procesamiento de emociones, aprendizaje y memoria (LeDoux, 2007) y está ubicada ventralmente en el lóbulo temporal.

Particularmente, existe evidencia que señala que las lesiones provocadas electrolíticamente en la región basolateral de la AMY, atenuaban o interrumpían la formación CAS (Dunn & Everitt, 1988; Yamamoto & Ueji, 2011) y estos autores sugieren que se debe a la alteración en la percepción adecuada de la señal gustativa como un sabor novedoso, lo cual pudo afectar la expresión posterior de la aversión al sabor.

El condicionamiento aversivo al sabor (CAS) como aprendizaje asociativo

Cuando un alimento es ingerido, es necesario aprender a relacionar el sabor con las consecuencias post-ingestivas y así, poder diferenciar entre lo nutritivo y lo dañino, por lo tanto, el cerebro posee la capacidad de almacenar dicha información asociada con el sabor del alimento (Miranda, 2011). Esta habilidad de reconocer un sabor familiar es llamada *memoria gustativa* y es un modelo ampliamente usado para estudiar la formación de la memoria tanto a nivel molecular, celular y de los circuitos neuronales involucrados en su formación (Bermúdez-Rattoni, 2004). Unos de los modelos experimentales de memoria gustativa cuyos mecanismos han sido descritos con mayor detalle es el *condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)*. El CAS es una habilidad innata que genera un aprendizaje como defensa contra el auto-envenenamiento y hablamos de CAS cuando un sabor novedoso resulta tener consecuencias post-ingestivas adversas; el animal aprende a evitar el sabor en encuentros posteriores (Roldan & Bures, 1994).

En la naturaleza, la comida y sus toxinas están en conjunto, pero en el laboratorio estos elementos están separados para propósitos de análisis experimental. En el laboratorio, para medir el fenómeno de CAS experimentalmente, se utilizan como estímulos un sabor novedoso (usualmente un edulcorante acalórico como la sacarina sódica diluida en agua) que funge como estímulo condicionado (EC) y, posteriormente, se provoca un efecto de malestar gástrico, que es el estímulo incondicionado (EI; usualmente una inyección intraperitoneal de cloruro de litio, (LiCl), el cual se caracteriza por generar una consecuencia aversiva, en este caso malestar gástrico. Después del proceso asociativo, se espera que el EC provoque por sí mismo, una respuesta de rechazo, por ejemplo una disminución en el consumo de la sacarina y/o manifestaciones orofaciales de desagrado características (Welzl & Lipp, 2001). Concretamente, cuando un estímulo neutral o apetitivo se relaciona con un malestar visceral, lo percibido como apetitivo cambia a aversivo, a pesar de que la cualidad del sabor en sí no cambia (Staszko *et al.*, 2020).

Sistema colinérgico

Dentro de los sistemas de neurotransmisión que modulan la actividad de los núcleos amigdalinos, cabe resaltar al sistema colinérgico central, el cual está implicado ampliamente en procesos de aprendizaje y memoria (Hasselmo, 2006). La acetilcolina (ACh) es una molécula de colina acetilada. Se sintetiza en las vesículas de la neurona presináptica por una reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa (CAT) y existen mecanismos que regulan de manera precisa tanto su síntesis como su liberación (Fig. 3).

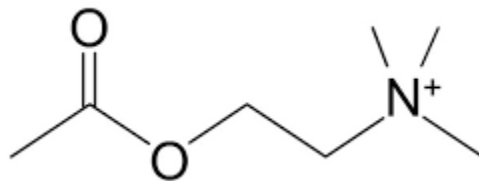


Fig. 3 Molécula de la acetilcolina

El sistema colinérgico en los mamíferos se divide en el periférico que se encarga de proyecciones eferentes viscerales (parasimpáticas) y motoras y el sistema colinérgico central que modula diversas funciones, tales como la atención, el sueño y la memoria. El sistema colinérgico central se divide principalmente en dos subsistemas o grupos de núcleo: el sistema colinérgico del cerebro basal anterior y el sistema colinérgico del tallo cerebral. En el sistema colinérgico del tallo cerebral incluye el núcleo pedúnculo pontino y el tegmento laterodorsal pontino con proyecciones al tálamo y a los ganglios basales. La vía colinérgica del sistema del cerebro basal anterior, incluye células ubicadas en el septum medial, la banda diagonal de Broca y sobre todo, el núcleo basal de Meynert. Estas estructuras mandan proyecciones colinérgicas que se extienden hasta el bulbo olfatorio, corteza, AMY y el hipocampo. Como es el caso del sistema colinérgico del sistema nervioso periférico, la acetilcolina del sistema colinérgico central actúa a través de receptores ionotrópicos (nicotínicos) o metabotrópicos (muscarínicos), siendo estos últimos los más estudiados en cuanto a su papel en el aprendizaje del gusto y los procesos de aprendizaje y memoria (Yiannakas & Rosenblum, 2017).

Abundante evidencia apunta a que la ACh juega un papel importante en funciones cognitivas. Se sospecha desde hace tiempo que la señalización colinérgica es un actor clave en trastornos neurodegenerativos que se caracterizan por deterioro cognitivo. Por ejemplo, en 1980 (Bartus *et al.*, 1982) se observó una disminución en la actividad de CAT en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con pacientes con problemas cognitivos relacionados a la edad avanzada. (Blokland, 1995), Trabajos en modelos animales también han aportado pistas sobre el papel de la ACh en la formación de la memoria. En ratones que portan tres transgenes que codifican mutaciones familiares de Alzheimer (3xTg-AD), hubo disminuciones dependientes de la edad en expresión de nAChR que se correlacionó con la deposición de beta-amiloide así como deficiencias cognitivas (Ballinger & Role, 2016).

Otro ejemplo, en investigaciones con ratas, se encontró que la liberación de ACh en el hipocampo está relacionada con la exploración de un ambiente novedoso

(Giovannini *et al.*, 2001) mientras que su liberación en la CG está relacionada con la presentación de un estímulo gustativo novedoso, más no uno familiar (Miranda, *et al.*, 2000). En la AMY, estudios previos, han identificado la abundancia de los receptores tipo M1 y M2, con una fuerte inmunoreactividad somatodendrítica M1 observada en las neuronas que expresan CamKII y receptores M2 concentrados en los neuropilos de la BLA y parte medial de la CeA (McDonald & Mascagni, 2010). Actualmente, se han identificado cinco subtipos diferentes de los receptores muscarínicos, todos acoplados a proteínas G: M1, M3 y M5 están conectados a Gq lo cual activa la fosfolipasa, mientras que M2 y M4, están acoplados a Gi/o y puede afectar a la adenilato ciclasa y, a sus vez, la conductancia de varios canales iónicos (Fig 4; Klinkenberg & Blokland, 2010).

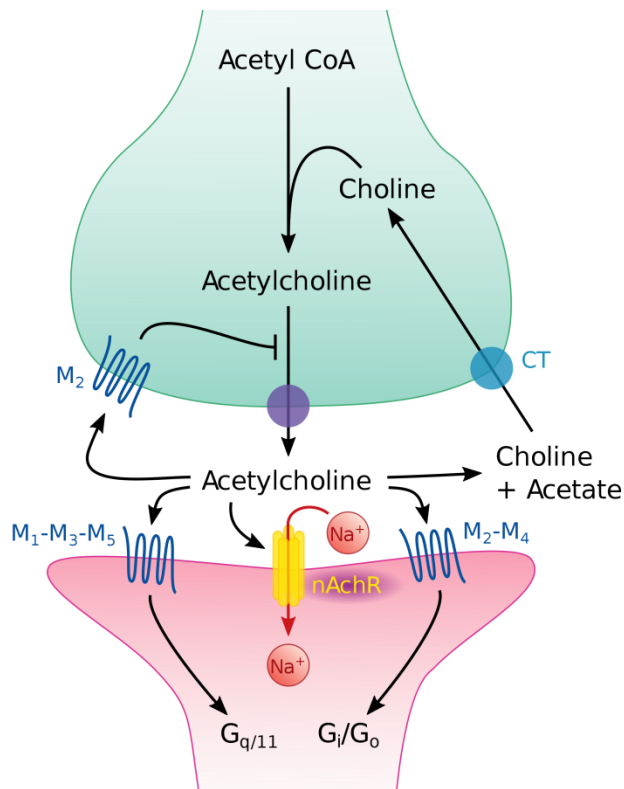


Fig. 4 Sinapsis colinérgica

Estudios relacionados de la función de los receptores muscarínicos para los procesos de aprendizaje demostraron que, con infusiones de escopolamina (antagonista no selectivo de receptores muscarínicos) en la CG antes, pero no

después de un nuevo sabor, perjudican la memoria a corto y largo plazo para el CAS (Ferreira & Bermúdez-Rattoni, 2002). Estos resultados junto a otros hallazgos del grupo del Dr. Bermúdez-Rattoni y colaboradores indican que, en las primeras etapas de procesamiento del gusto, el bloqueo de los receptores muscarínicos en la CG, interfiere con el aprendizaje del CAS, probablemente interrumpiendo el rastro en la formación de la memoria del sabor (Ranier & Bermúdez-Rattoni, 2003).

Por otra parte, en la AMY, un estudio electrofisiológico demostró que el efecto de la liberación de ACh en la BLA, específicamente a través de la activación de los receptores muscarínicos (mAChR), dependía de la actividad previa de las neuronas piramidales que estaban siendo estimuladas. Al producir de manera artificial un pulso de ACh en la BLA, los investigadores descubrieron que su efecto dependía del estado de actividad previa de las neuronas. Concretamente, en aquellas neuronas con frecuencia de disparo baja, el pulso de ACh tuvo un efecto inhibitor, mientras que en aquellas neuronas que estaban disparando con mayor frecuencia cuando se aplicó el pulso de ACh, ésta tuvo un efecto potenciador (Unal *et al.*, 2015). Estos hallazgos llevaron a los autores a sugerir que la neuromodulación colinérgica en la BLA podía actuar como un sistema de aumento de contraste, un concepto que ya se había sugerido como importante para los eventos de plasticidad neuronal que subyacen la formación de recuerdos de tipo asociativo. Considerando lo anterior, nos dimos a la tarea de evaluar el papel de la ACh, específicamente los receptores muscarínicos, en la formación de la memoria gustativa, en la adquisición, la consolidación y la evocación del CAS.

Paralelamente, también existen moléculas cuyo efecto es inactivar ciertos tipos de receptores; por ejemplo, la escopolamina es considerada como un antagonista no selectivo a los receptores muscarínicos. Su estructura está compuesta por un grupo funcional éster, un anillo aromático y nitrógeno. La afinidad de la escopolamina para unirse al receptor muscarínico es de aproximadamente 1nM en el cerebro de las ratas. Dado que la escopolamina no tiene preferencias por algún subtipo de receptor muscarínico, bloquea los efectos de la acetilcolina a nivel

de todos los subtipos de estos receptores y por lo tanto afecta varias funciones fisiológicas. Sin embargo, parece que los efectos centrales de la escopolamina podrían ser medidos por los receptores M1 y, quizá M5, debido a su distribución específica (Caulfield, 1993).

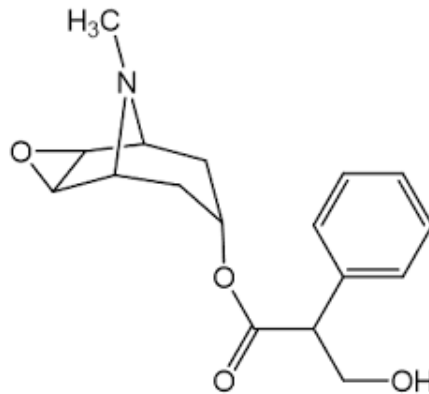


Fig. 5 Molécula de la escopolamina.

Existe una gran cantidad de evidencia que apoya la participación de los receptores muscarínicos en el aprendizaje y memoria y estas provienen tanto de distintos modelos animales como conductuales. En primer lugar, para tareas de reconocimiento espacial y de objetos, los estudios han sido consistentes en la detección de los efectos provocados por la escopolamina administrada en la corteza perirrinal (Bàron & Wenger, 1998), septum medial (Givens & Olton, 1995), e hipocampo dorsal (Brito & Brito, 1987); tiende a interferir con la memoria a corto plazo en la adquisición de dichas tareas. Por otro lado, experimentos relacionados con el CAS y la CG, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina y pirenzepina (antagonista a receptores M1 y M3) alteran la adquisición del CAS, pero no su evocación (Ramírez-Lugo *et al.*, 2003). Interesantemente, cuando los animales fueron infundidos inmediatamente después de la presentación del sabor y del LiCl, desarrollaron una fuerte aversión al sabor casi igual que los grupo de vehículo (Ranier *et al.*, 2003).

Objetivo

El objetivo de este trabajo es evaluar el rol de los receptores muscarínicos en la señalización colinérgica durante tareas de aprendizaje gustativo, inhibiendo los receptores con escopolamina, antagonista no selectivo, en la AMY y en los diferentes núcleos amigdalinos (BLA y CeA) durante la adquisición, consolidación y evocación del CAS.

Justificación

Como la AMY está involucrada en la adquisición del CAS y se desconoce el rol específico que tienen los distintos núcleos amigdalinos en el aprendizaje del CAS, queremos evaluar el papel de los receptores muscarínicos en dos regiones amigdalinas particularmente importantes para el aprendizaje: la CeA y la BLA. Dichas áreas están inervadas exclusivamente por el prosencéfalo basal del sistema colinérgico central (Aitta-aho *et al.*, 2018), vinculado a los procesos de memoria emocional (Likhtik & Johansen, 2019).

Metodología

Sujetos

Se usaron ratas de la cepa Wistar, con un peso de 250g a 300g. Dichas ratas se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina. Las ratas se mantuvieron con un ciclo de luz-obscuridad 12-12 horas (luzes se prenden a las 08:00h), con alimento y agua *ad libitum*.

Cirugía estereotáxica

Para los experimentos que tienen como objetivo determinar la participación de los receptores muscarínicos en los subnúcleos de la AMY (CeA y BLA), los animales se anestesiaron con un coctel de ketamina (100mg/Kg) y xilazina (6mg/Kg)). Una vez anestesiadas se sujetaron a un aparato estereotáxico y recibieron un antiinflamatorio no esteroide; meloxicam (2mg/kg subcutáneo) para ayudar a disminuir el dolor. Se les implantaron cánulas de 23G, 14mm de largo (Kokare,

Shelkar, Borkar, Nakhate, & Subhedar, 2011)_bilateralmente, 1mm arriba sobre el objetivo ya sea total, central o basolateral: AMY: Bregma AP: -2.3mm, L: \pm 4mm, DV: -7mm (Roldán y Bures, 1994). CeA: AP: -2.3mm de bregma; L: \pm 4mm de bregma, DV: -7mm de la superficie del cráneo (González-Sánchez, Tovar-Díaz, Morin, & Roldán-Roldán, 2019). Para BLA: AP: -2.8mm de bregma; L: \pm 5mm de bregma, DV: -7.5mm de la superficie del cráneo (Shinohara & Yasoshima, 2019). El cráneo de las ratas se trepanó con un taladro y se insertaron las cánulas guía. Posteriormente, las cánulas se fijaron mediante el uso de acrílico dental sujetado a un tornillo armado en el cráneo (Figs. 6 y 7). Finalmente, se les administró antibiótico profiláctico (penicilina) de manera tópica para evitar infecciones. Los animales recuperaron durante una semana en cajas individuales antes de iniciar los procedimientos conductuales (Fig. 8).

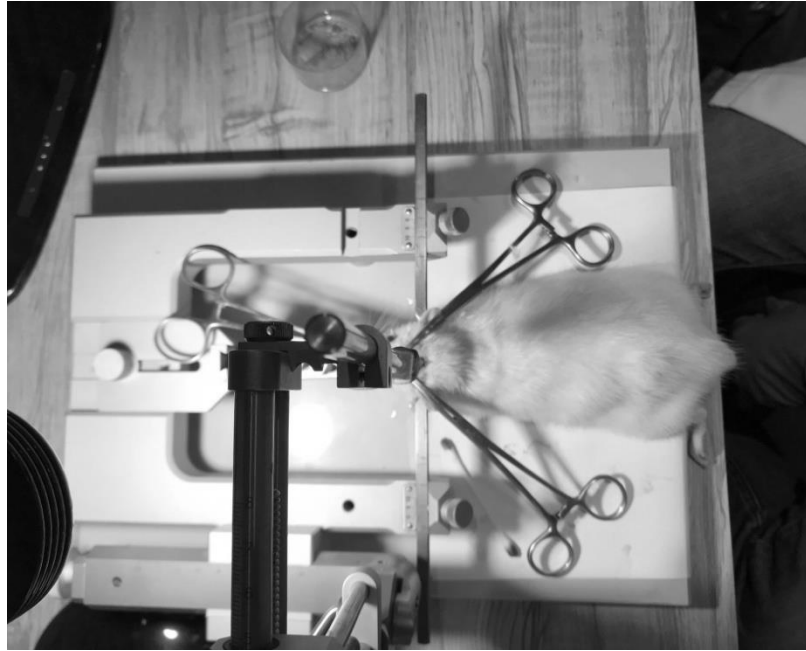


Fig. 6 Rata montada en aparato estereotáxico



Fig. 7 Sujeto a punto de ser canulado

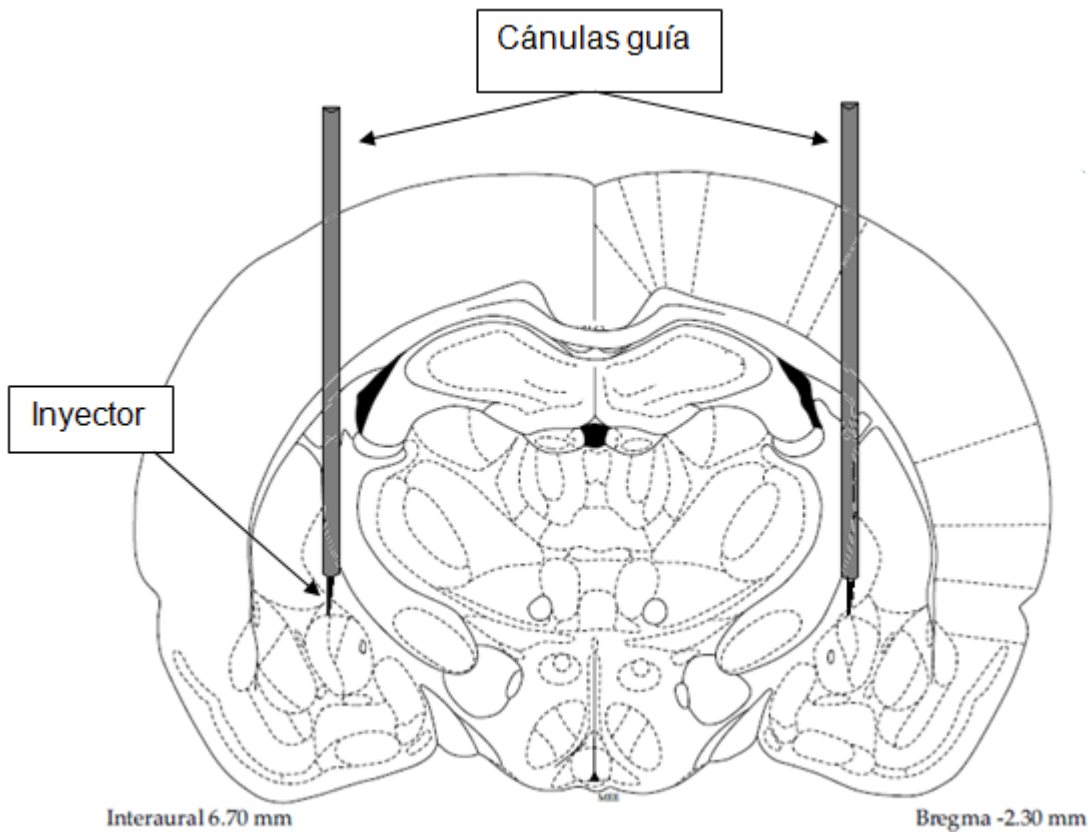


Fig. 8A Canulación representada en el cerebro de una rata Wistar en el objetivo deseado, 1 mm por arriba del área a infundir.

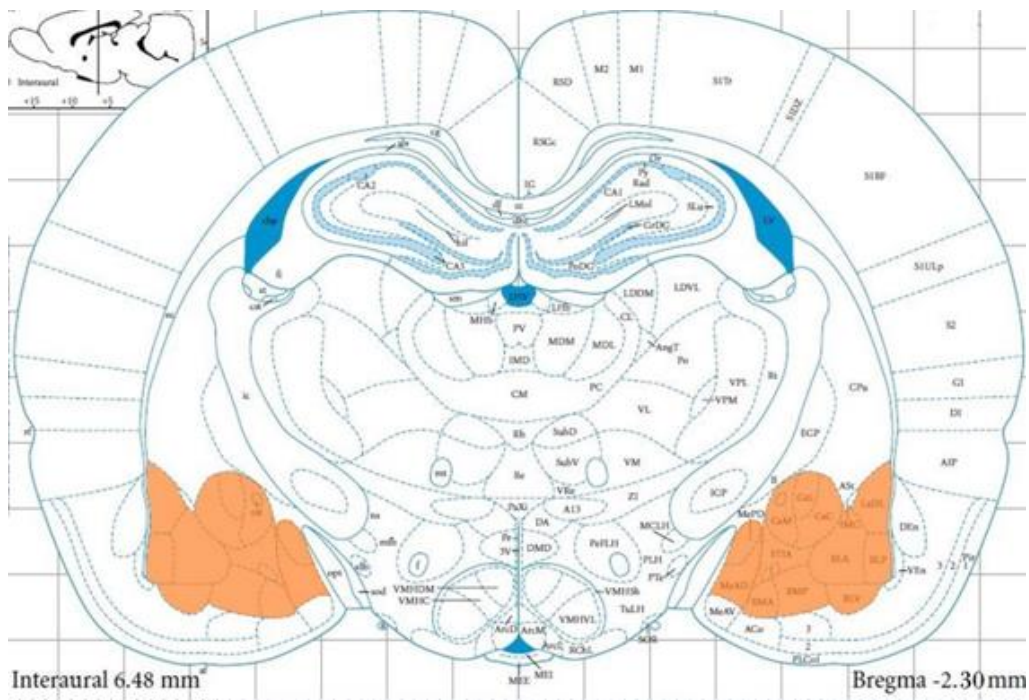


Fig. 8B Representación del área de la AMY.

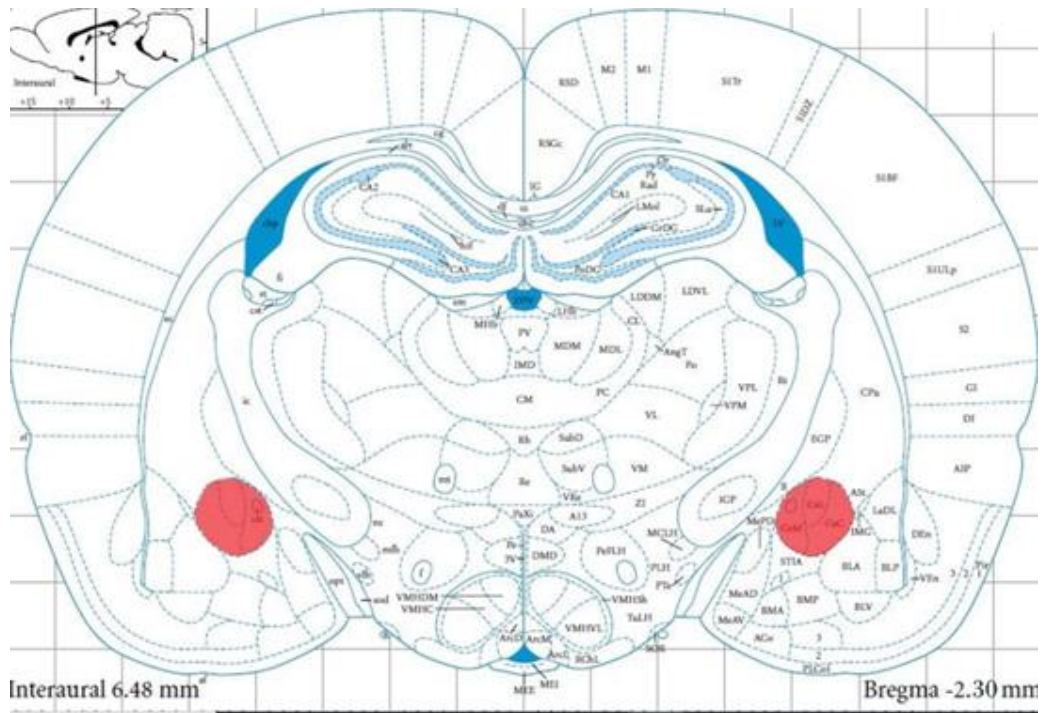


Fig. 8C Representación del área de CeA

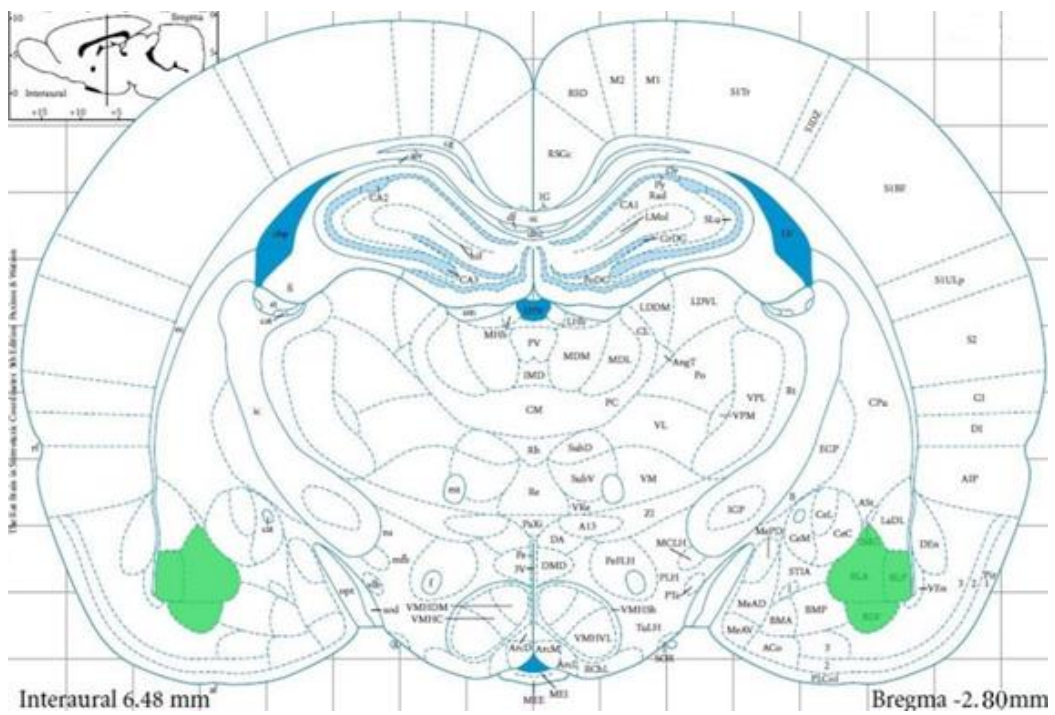


Fig. 8D Representación del área de BLA

Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS)

Tras los siete días de recuperación, las ratas operadas se privaron de agua *overnight* (D0) y al día siguiente (D1) entre las 10 y 12 a.m. se colocaron en una caja experimental para medir los consumos de agua equipada con 10 bebederos de 3mL (5 bebederos en cada extremo de la caja); y los animales consumieron agua durante 10 minutos. Este consumo se repite en la tarde. El procedimiento D1 se repite al día siguiente (D2) en la mañana y tarde. En la mañana del 3er día (D3; adquisición), el agua de la caja de consumos se substituye por una solución de sacarina sódica (SIGMA) al 0.1% (w/vol.) e inmediatamente de que los animales que terminan sus 10 min reciben una inyección de LiCl i.p. (0.15M, 2% del peso corporal). En la tarde de ese mismo día se colocaron 5 bebederos con agua y 5 con la solución de sacarina, alternados de manera aleatoria para medir la memoria a corto plazo (MCP). Para el 4to día (D4) se repitió el mismo procedimiento de D1 y D2. El último día (D5), en la mañana los animales se colocaron en la caja de consumos con 5 bebederos agua y 5 de sacarina alternados para medir la evocación de la memoria a largo plazo (MLP; Figs. 9).

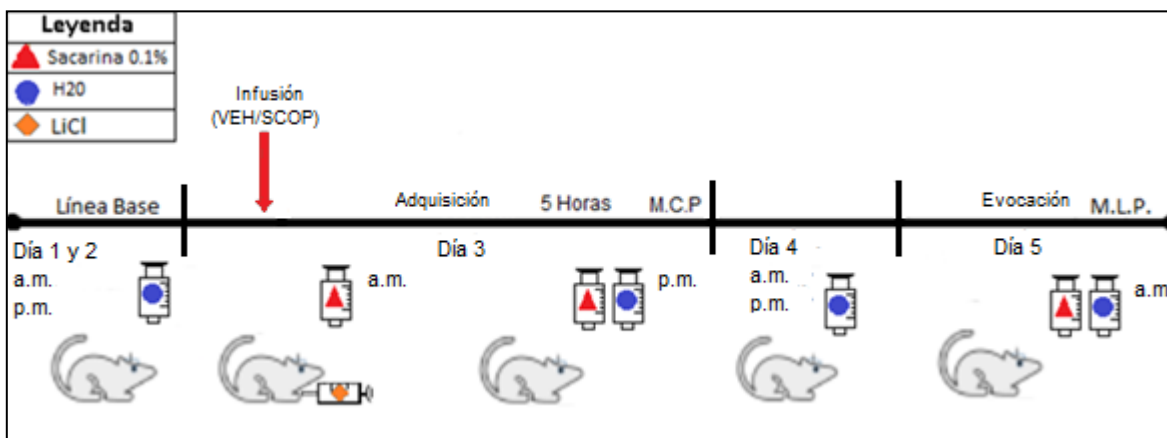


Fig. 9A Representación del procedimiento del CAS en los animales post-operados, donde se observan los días D1 a D5, la infusión de intra-AMY VEH/SCOP en el D3 pre-adquisición.

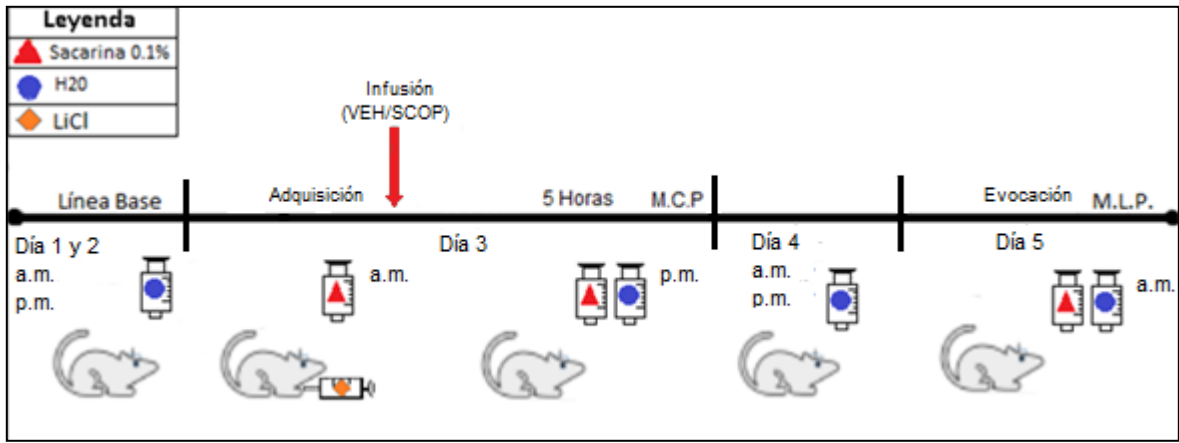


Fig. 9B Representación del procedimiento del CAS en los animales post-operados, donde se observan los días D1 a D5, la infusión de intra-AMY VEH/SCOP en el D3 post-adquisición.

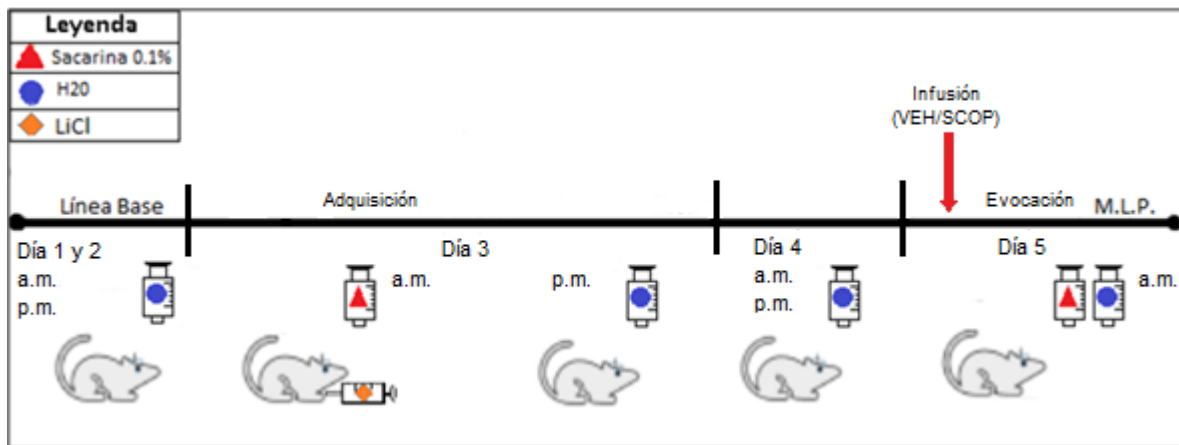


Fig. 9C Representación del procedimiento del CAS en los animales post-operados, donde se observan los días D1 a D5, la infusión de intra-AMY VEH/SCOP en el D5 pre-evocación a largo plazo.

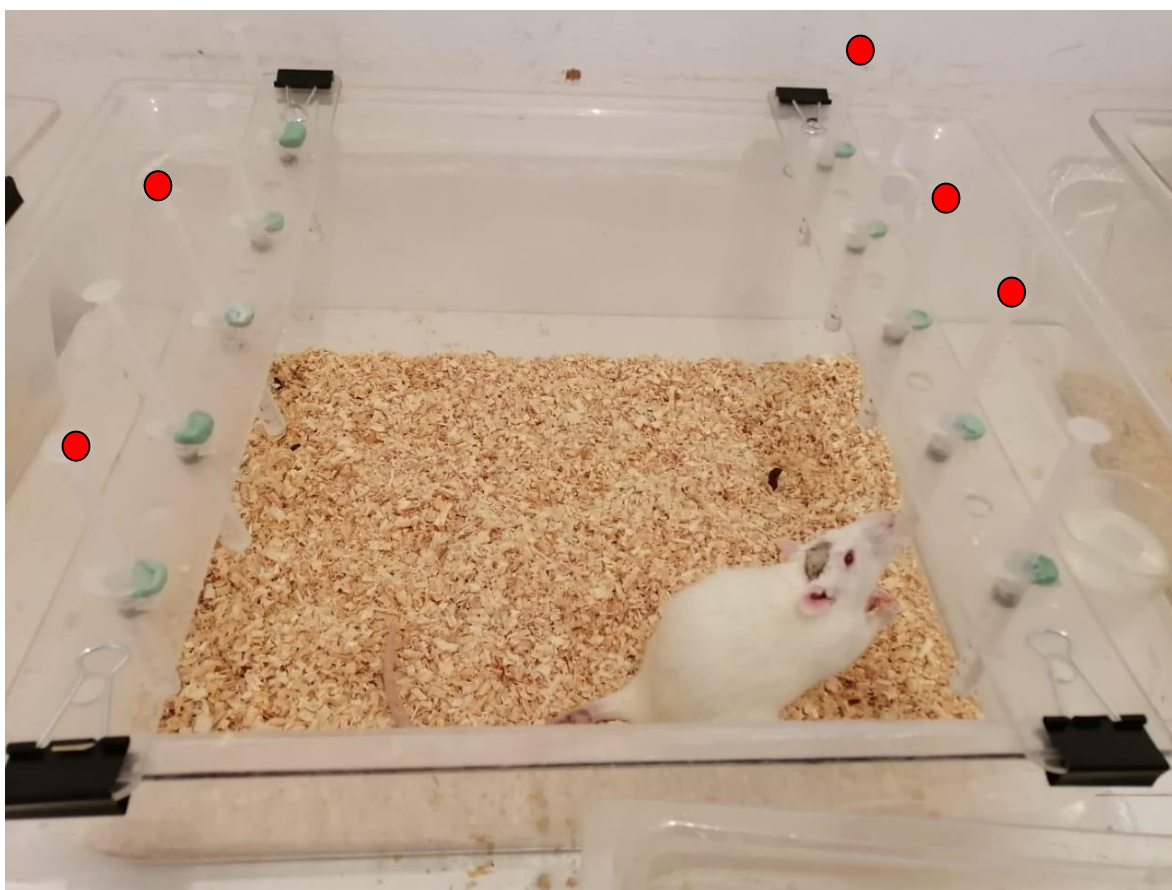


Fig. 10 Caja experimental donde las ratas tienen acceso a raciones de agua y sacarina en las pruebas de MCP y MLP. En rojo se muestra bebederos con sacarina 0.1%.

Fármacos

Las infusiones del antagonista muscarínico escopolamina (SCOP)/vehículo (VEH) en las regiones AMY total, CeA y BLA se realizan en distintas etapas de la formación (pre-adquisición, post-adquisición y pre-evocación a largo plazo) del CAS. De acuerdo a estudios preliminares dosis-respuesta, se escogió una concentración de $30\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Ramírez-Lugo *et al.*, 2003), infundiendo $1\mu\text{L}$ para la AMY y $0.5\mu\text{L}$ para CeA y BLA.

Histología

Después de haber concluido los procedimientos farmacológico-conductuales, se preparó la disolución PB 0.1M (disolución amortiguadora PH=7.4) utilizando un amortiguador de fosfatos de sodio (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4) cuya composición se determinó empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch ($\text{pH}=\text{pK}_a + \log [\text{OH}]/[\text{H}]$).

Para preparar paraformaldehído (PFA) al 4% se disuelven 40g de paraformaldehído en 400mL de agua previamente calentada a 55-60°C y para disolver totalmente se le agregó dos perlas de NaOH. Una vez disuelto el PFA se añadió 400mL de PB 0.2M y posteriormente se aforó con agua destilada hasta 1L.

A las ratas se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/mL i.p.) y fueron perfundidas con 250mL de PB 0.1M (4°C) seguido de PFA al 4%. Se disecaron los cerebros se fijaron toda la noche en PFA y al día siguiente se cambió la disolución por una crioprotectora (sacarosa 30%, azida de sodio 0.02%, en PBS 0.1M) (Fig. 11).

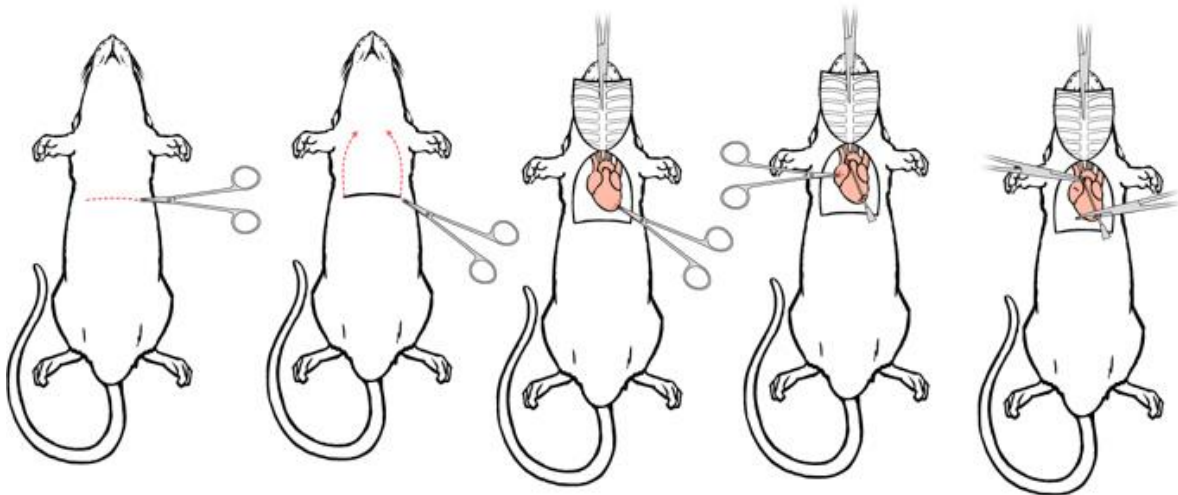


Fig. 11A Procedimiento de perfusión de las ratas Wistar empleado en este trabajo. Tomado de Gregory J. *Animal entero fijación por perfusión de los roedores*.

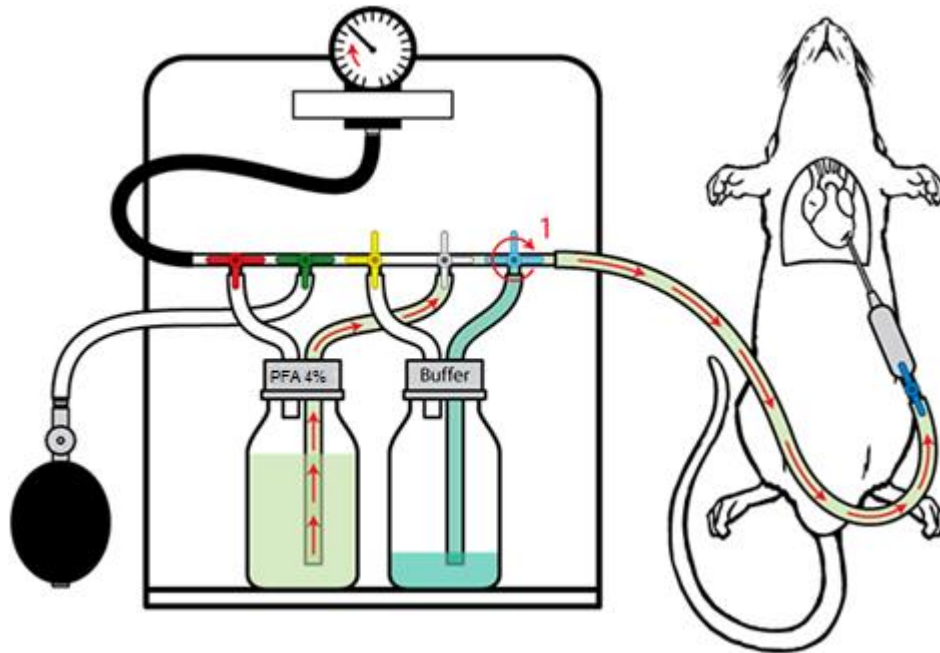


Fig. 11B Procedimiento de perfusión de las ratas Wistar empleado en este trabajo. En la imagen se describe el paso de PB 0.1M y posteriormente el PFA 4%. Tomado de Gregory J. *Animal entero fijación por perfusión de los roedores.*

Protocolo de preparación de laminillas cubiertas de gelatina para cortes histológicos

Para obtener cortes histológicos es necesario preparar laminillas que estén recubiertas con compuestos adhesivos. La gelatina es uno de los más frecuentes y usados para propósitos histológicos.

Se preparó de la siguiente manera:

- Se disolvieron 5 g de gelatina en 1L de agua destilada y se calentó a una temperatura que no excedió los 45°C.
- Una vez disuelto, se añadieron 0.5g de sulfato de potasio y cromo (III) ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$). El sulfato de potasio y cromo sirve para cargar las laminillas permitiéndoles atraer negativamente el corte del tejido.
- Se filtró y se guardó a temperatura 2-8°C hasta que se usara.

Cuando se tiene preparada la gelatina con cromo, se sumergen portaobjetos en la gelatina 10 minutos y las dejamos secar por 48h en temperatura ambiente para posteriormente utilizarlas. Las laminillas aguantan temperaturas para su uso en el criostato hasta de -20°C, listo para obtener cortes coronales de 40 micras de grosor y los tejidos pasaron por una tinción con violeta de cresilo llamada técnica de Nissl (Corthell & Corthell, 2014).

Técnica de tinción de Nissl

La disolución de ácido acético y violeta de cresilo se usa para teñir en el citoplasma de las neuronas en paraformaldehído o en tejido ya fijo con formalina. Las neuronas se tiñeron de color azul-violeta. Para su preparación se añadieron 6mL de ácido acético a 994mL de agua destilada que hacen la disolución A. Por otra parte, se pesaron 13.6g de acetato de sodio y se disolvieron en 1L de agua para hacer la disolución B. Se combinaron las disoluciones A y B en una proporción 9:1 y de esta disolución C se combina con 1% de violeta de cresilo en proporción 1:1 y así se obtuvo el violeta de cresilo para la tinción de Nissl. (Paoletti & Zhou, 2013). La localización de los trazos de cánula fue determinada con un microscopio estereoscópico con ambos trazos de inyector con ayuda de un papel filtro haciendo más fácil la localización de la zona de interés.



Fig. 12 Ejemplo de cortes coronales con tinción de Nissl, obtenidas de ratas operadas e infundidas con SCOP.

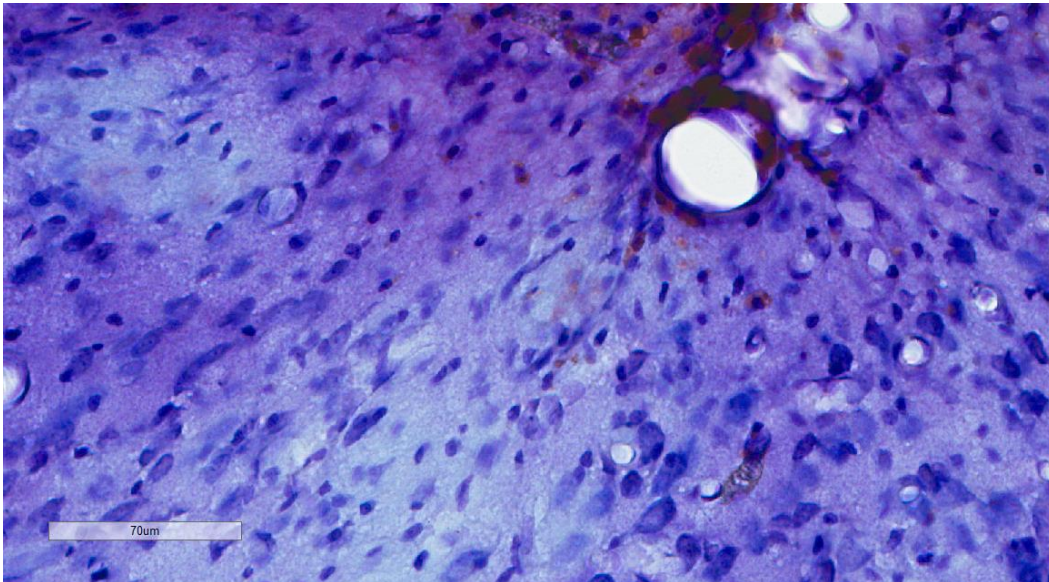


Fig. 12A 12 Ejemplo de cortes coronales con tinción de Nissl, obtenidas de ratas operadas e infundidas con SCOP a 30x, con ayuda de microscopio óptico.

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos de los consumos (mL) de cada animal, los datos fueron recopilados en Excel donde se midió el índice de preferencia (I.P.) utilizando la

siguiente fórmula; $(\text{Vol. Sac}/\text{Vol. Total consumido}) * 100$, obteniendo así el índice de preferencia y para el análisis son ingresados al programa *Graph Pad Prism 8*. La distribución normal se confirmó en todos los grupos usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se realizaron las pruebas indicadas (*t* de Student no apareadas) para así obtener los gráficos correspondientes. También, en algunos casos se realizaron pruebas de *t* de una muestra del índice de preferencia vs. un valor arbitrario de 50 (preferencia similar entre el agua y sacarina). En todos los casos, se aceptó la significancia cuando $p < 0.05$.

Resultados

Efecto de la escopolamina pre-adquisición del CAS

Para el primer experimento se infundió SCOP intraparenquimalmente previo a su consumo de sacarina, para medir MCP fue 5 h después de probarla, se observó una diferencia entre I.P. de los animales administrados con SCOP en comparación a los de VEH ($t_{(13)} = 4.38$, $p < 0.001$). Se observa que, efectivamente, los animales administrados con solución salina desarrollaron CAS (I.P. = $4.7 \pm 0.9\%$) mientras que los animales infundidos con SCOP (I.P. = $49.1 \pm 8\%$) mostraron amnesia (Fig. 13A).

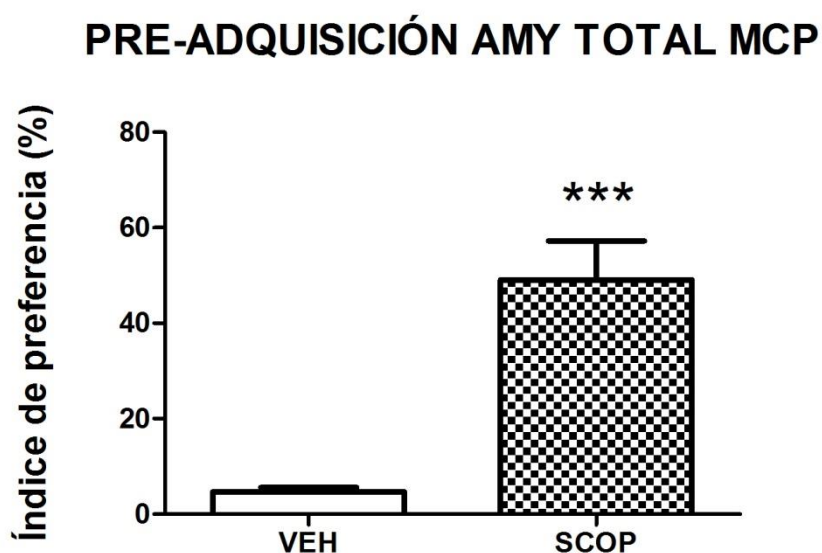


Fig. 13A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-AMY de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente antes del CAS para la MCP. ***: $p < 0.001$

Después, se probó la MLP en los mismos animales 48h después del CAS. Se obtuvieron datos similares de los que se observó la MCP, la SCOP suprimió el CAS a comparación de animales infundidos con VEH (I.P.= $1.40 \pm 0.5\%$ VEH y $52.51 \pm 11.0\%$ SCOP; $t_{(13)} = 5.02$, $p < 0.001$; Fig. 13B) Con ambos experimentos, se sugiere que la inhibición de los receptores muscarínicos con SCOP en la AMY durante la pre-adquisición afecta la formación del CAS.

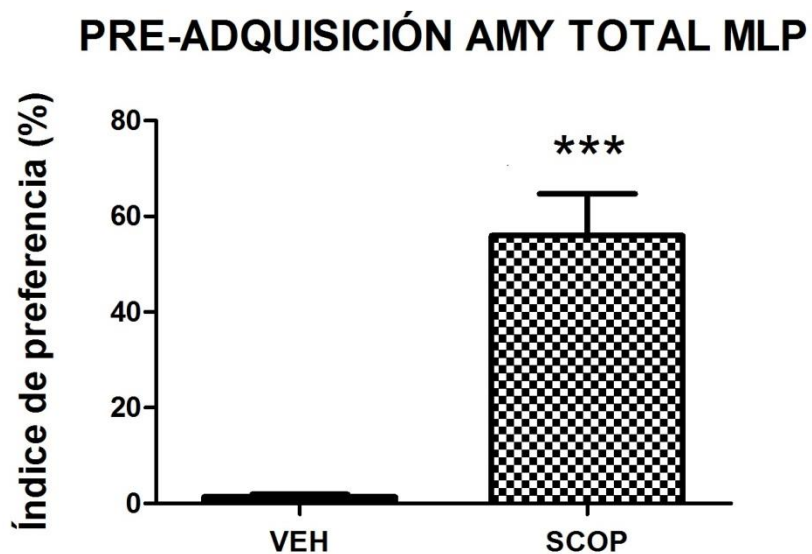


Fig. 13B Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-AMY de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente antes del CAS para la MLP. ***: $p < 0.001$

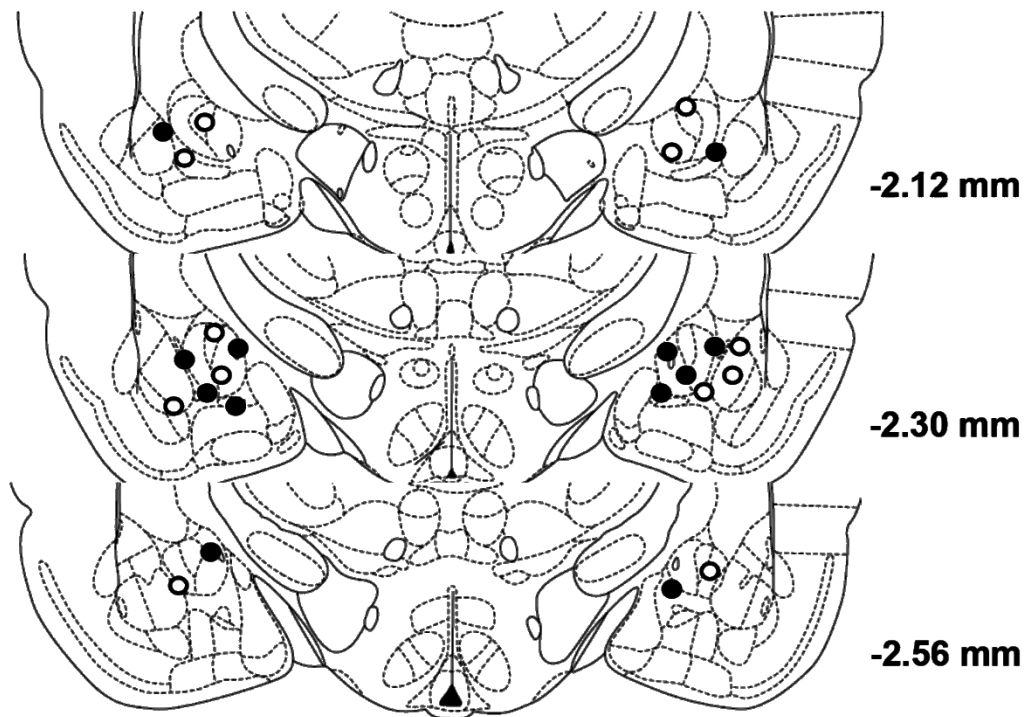


Fig. 13C Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de AMY para los experimentos de pre-adquisición en MCP y MLP.

Efecto de la escopolamina post-adquisición del CAS

En estudios anteriores mostraron que la inhibición post-condicionamiento de receptores muscarínicos impide la formación del condicionamiento de preferencia al lugar, al inhibir los receptores muscarínicos en la post-adquisición en el AMY en la tarea del CAS, se observa que este tratamiento no tuvo efecto, es decir, se observó un CAS tanto en los animales infundidos con vehículo como aquellos que recibieron escopolamina y no se observaron diferencias entre los dos grupos tanto en la MCP (Fig. 14A: VEH I.P.= $4.54 \pm 3.4\%$ y SCOP I.P.= $9.97 \pm 7.1\%$; $t_{(12)}=0.69$, $p>0.50$) o en la MLP (Fig. 14B: I.P.= $2.08 \pm 1.6\%$ y $1.36 \pm 1.0\%$; $t_{(12)}=0.38$, $p>0.71$), por lo tanto se sugiere después de la adquisición los receptores muscarínicos no son necesarios tanto en MCP ni MLP.

POST-ADQUISICIÓN AMY TOTAL MCP

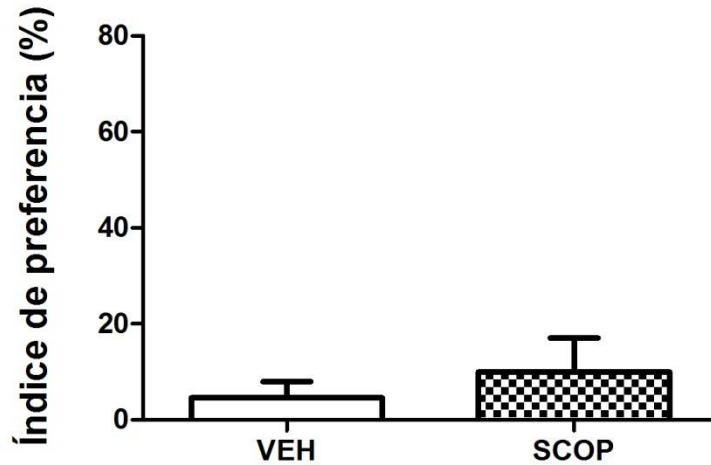


Fig. 14A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-AMY de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente después de la inyección de LiCl para probar la MCP.

POST-ADQUISICIÓN AMY TOTAL MLP

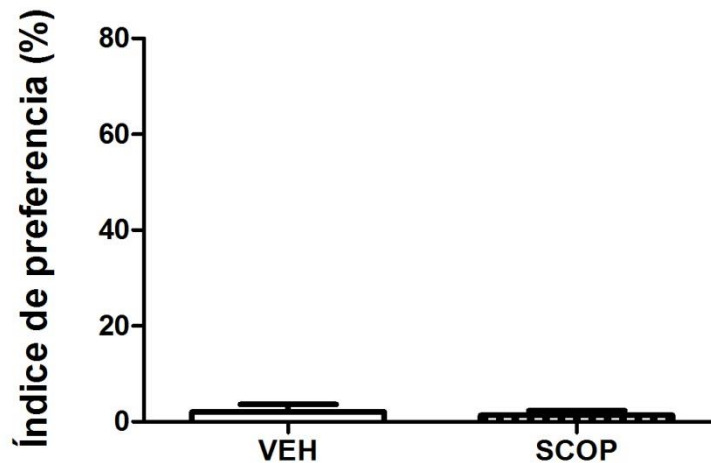


Fig. 14B Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-AMY de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente después de la inyección de LiCl para probar la MLP.

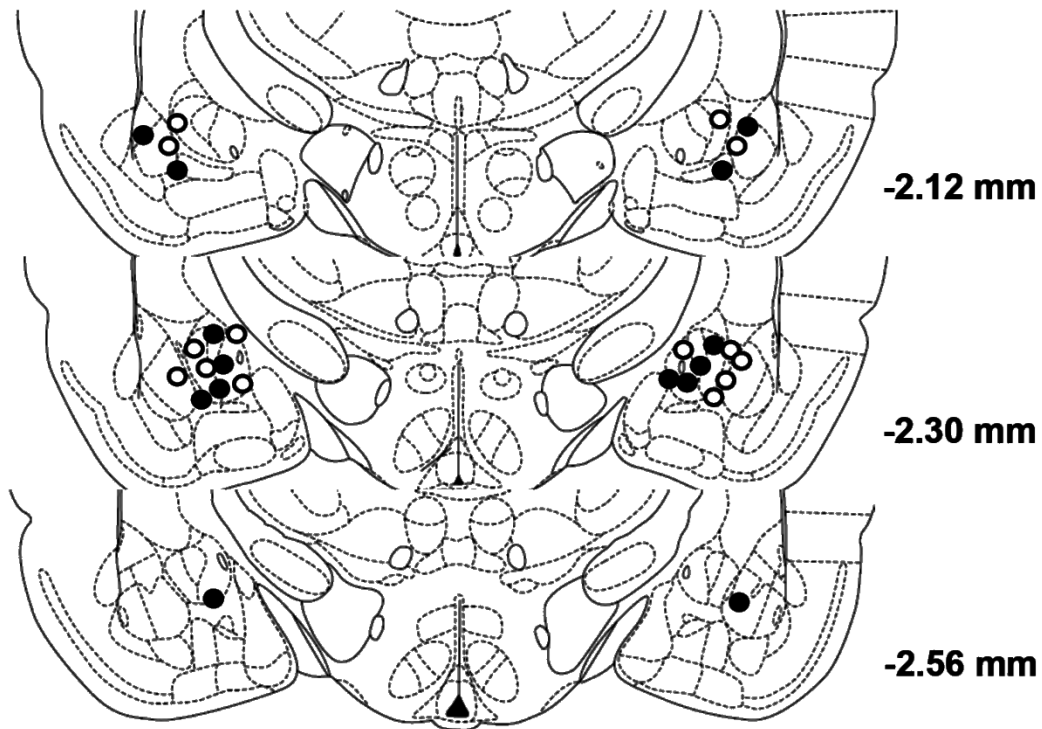


Fig. 14C Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de la AMY para los experimentos de post-adquisición en MCP y MLP.

De igual manera se realizaron los experimentos post-adquisición en las subestructuras CeA (Fig. 15: MCP; SCOP I.P.= $1.8 \pm 1.1\%$ y VEH I.P.= $9.8 \pm 8.4\%$; $t_{(12)}=0.94$, $p>0.3$; MLP; SCOP I.P.= $0.17 \pm 1.1\%$ y VEH I.P.= $1.1 \pm 0.8\%$ $t_{(12)}=0.94$, $p>0.3$) y BLA (Fig. 14) (MCP: SCOP I.P.= $5.1 \pm 1.6\%$ y VEH I.P.= $6.4 \pm 3.7\%$; $t_{(12)}=0.33$, $p>0.3$; MLP: SCOP I.P.= $2.4 \pm 0.5\%$ y VEH I.P.= $2 \pm 0.6\%$ $t_{(12)}=0.47$, $p>0.3$); obteniendo mismos resultados que en la AMY, observando un CAS tanto en VEH y SCOP, en la MCP y la MLP.

POST-ADQUISICIÓN CeA MCP

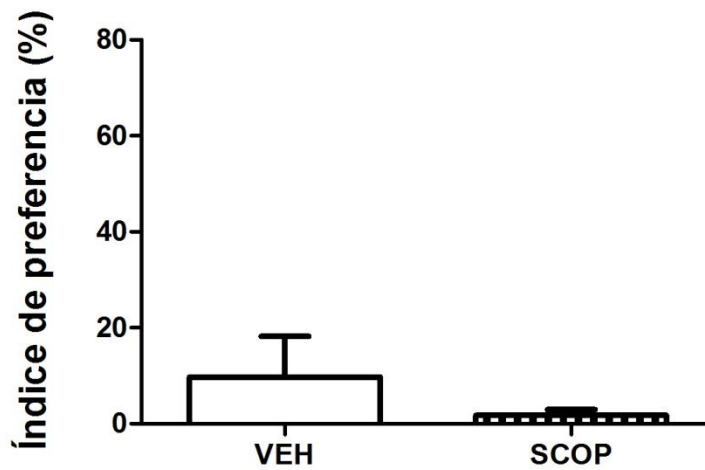


Fig. 15A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-CeA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente después de la inyección de LiCl para probar la MCP.

POST-ADQUISICIÓN CeA MLP

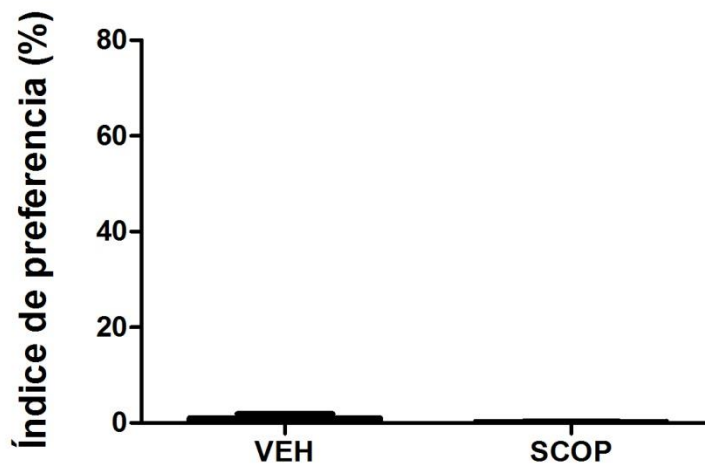


Fig. 15B Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-CeA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente después de la inyección de LiCl para probar la MLP.

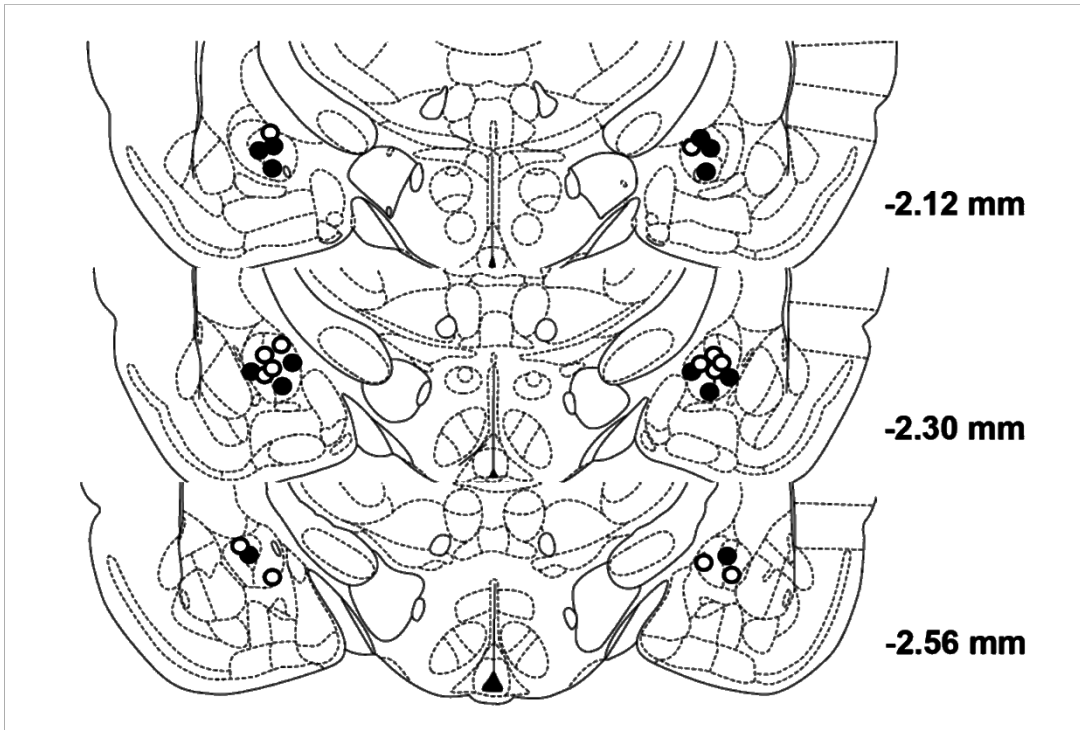


Fig. 15C Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de CeA para los experimentos de post-adquisición en MCP y MLP.

POST-ADQUISICIÓN BLA MCP

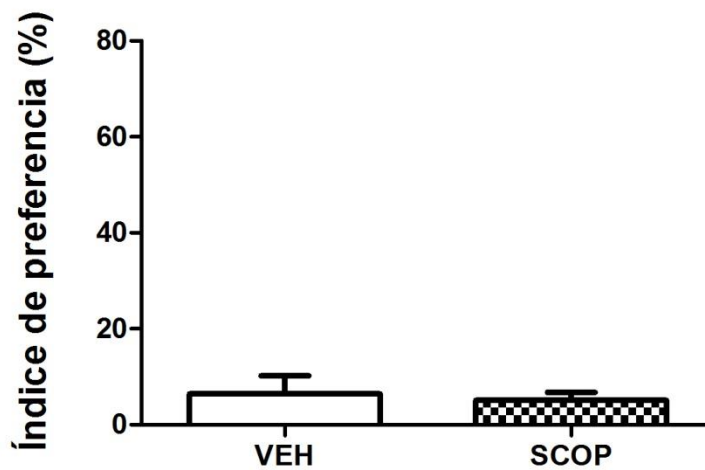


Fig. 16A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-BLA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente después de la inyección de LiCl para probar la MCP.

POST-ADQUISICIÓN BLA MLP

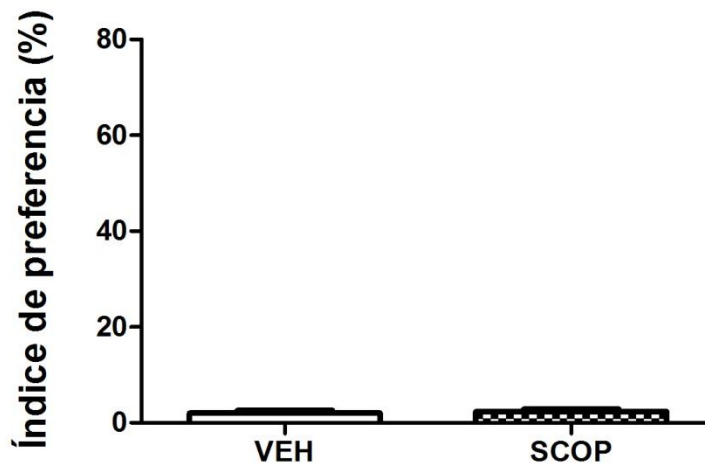


Fig. 16B Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-BLA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente después de la inyección de LiCl para probar la MLP.

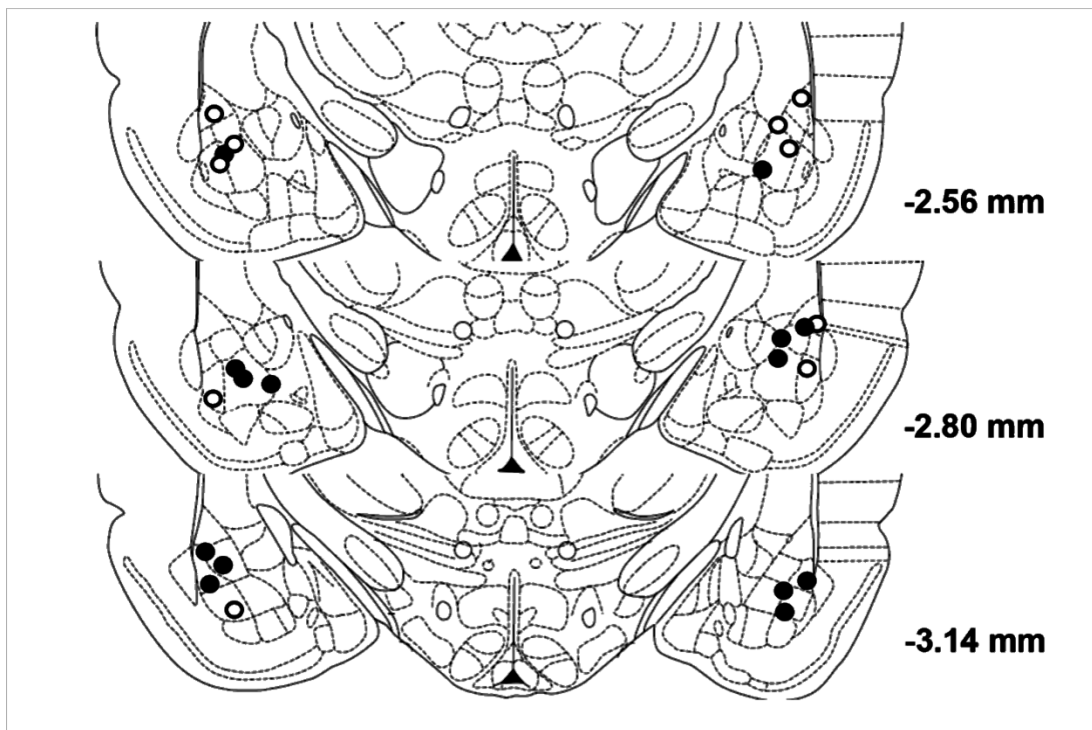


Fig. Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área BLA para los experimentos de post-adquisición en MCP y MLP.

Efecto de la escopolamina sobre la evocación del CAS

También se probó la infusión de SCOP/VEH antes de la evocación del CAS. Después probar varias réplicas independientes del experimento, se obtuvo una gran dispersión de los datos en el grupo de SCOP; la infusión del fármaco antes de la evocación produjo una reducción en el CAS en algunos animales, mientras que, por otro lado, la otra población se comportó como los animales infundidos con vehículo, teniendo un fuerte CAS (Fig. 17) (I.P.= $0.69 \pm 0.7\%$ y $13.07 \pm 8.1\%$, para VEH y SCOP respectivamente; $t_{(11)}=1.40$, $p>0.1$), interesantemente, no hay diferencia significativa pese a la tendencia que se observa en la gráfica, debido a que la AMY es una estructura grande y algunas infusiones de SCOP pudieran afectar tanto la CeA como la BLA, afectando así dicha variación.

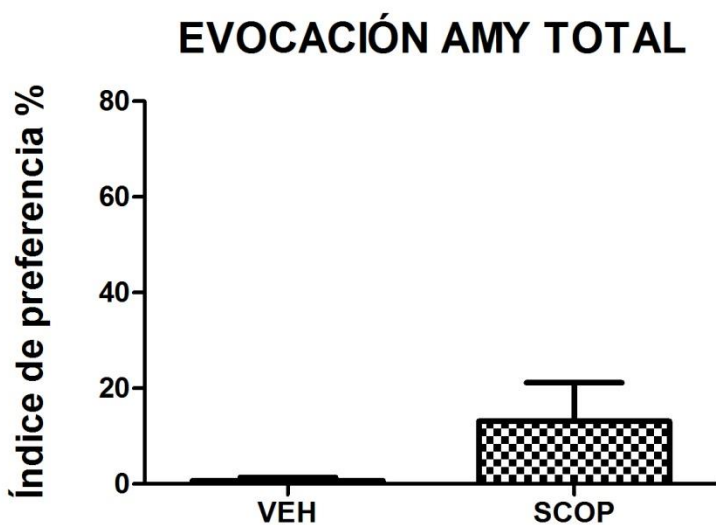


Fig. 17A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-AMY de SCOP o VEH en ratas Wistar antes de la evocación del CAS, realizada 48h después del condicionamiento.

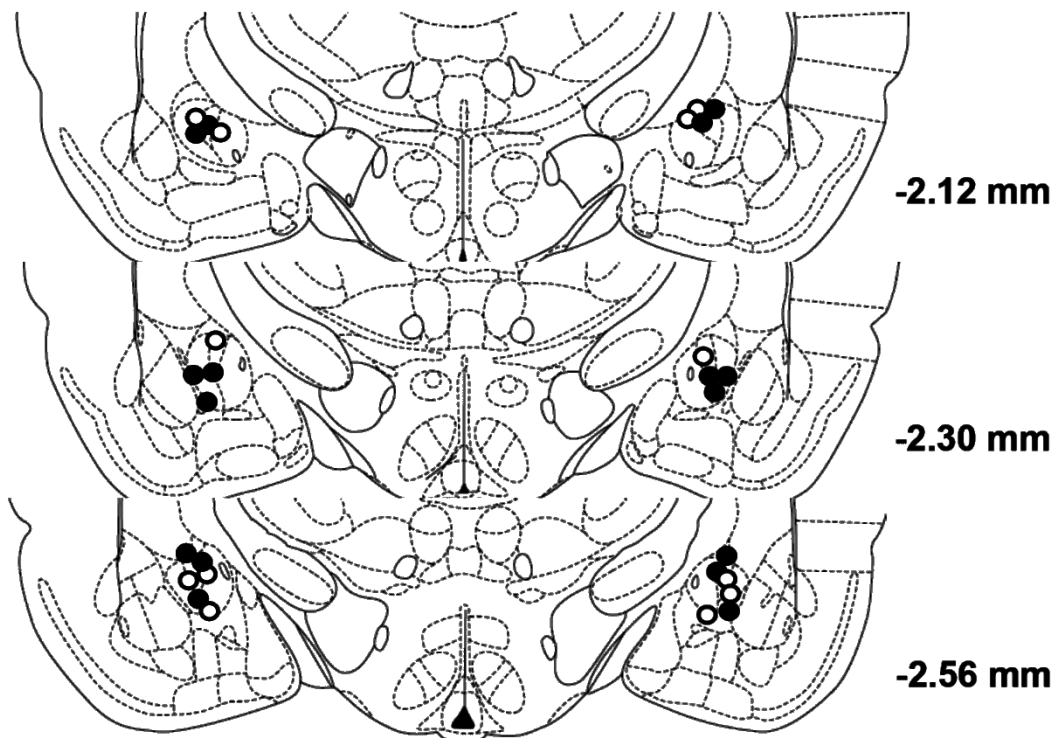


Fig. 17B Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de la AMY para los experimentos de evocación.

Del experimento de evocación, al obtener la figura 17B, el experimento lo dividimos en dos poblaciones y nos dimos a la tarea de averiguar si la presencia de estas dos poblaciones se debía a una contribución distinta de la BLA versus la CeA. Al probar el efecto de las infusiones de SCOP en la CeA, se observó que tuvo efecto ya que al igual que las ratas VEH el grupo de SCOP tuvo un fuerte CAS, por lo tanto, la memoria no se ve afectada una vez que se inhibieron los receptores en la evocación (Fig. 18; I.P.= $0.50 \pm 0.3\%$ y $5.6 \pm 3.1\%$, VEH y SCOP; $t_{(12)}=1.64$, $p>0.1$).

EVOCACIÓN CeA

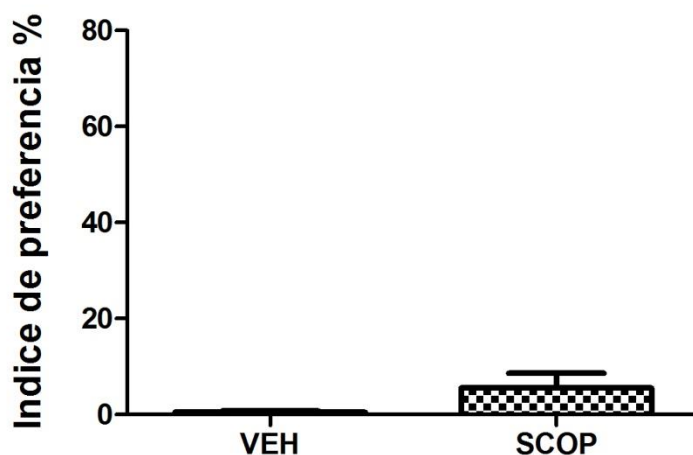


Fig. 18A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-CeA de SCOP o VEH en ratas Wistar antes de la evocación del CAS, realizada 48h después del condicionamiento.

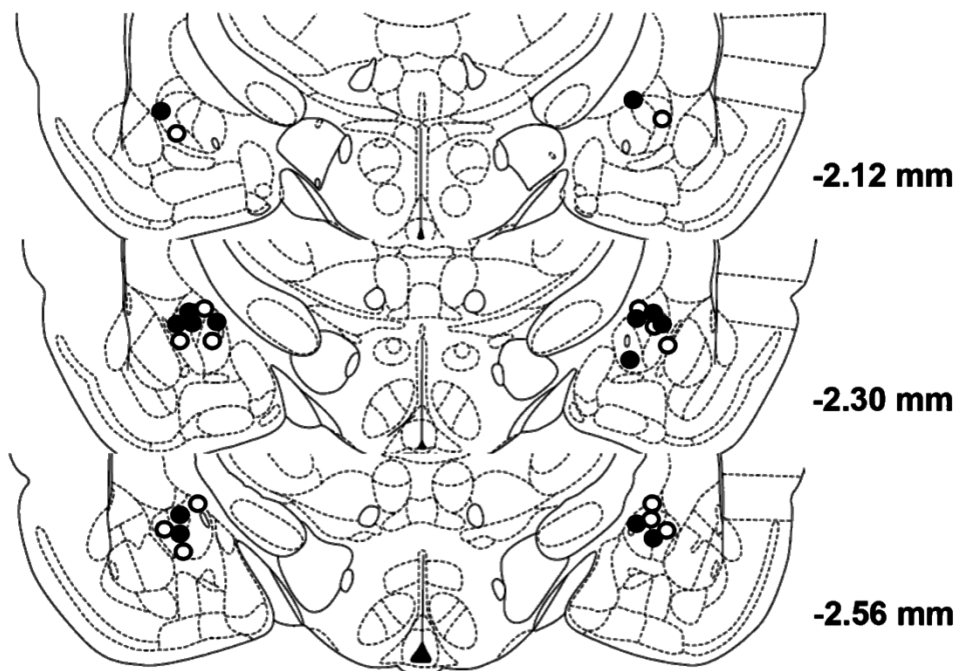


Fig. 18B Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de la CeA para los experimentos de evocación.

Por lo contrario, aquellos animales que recibieron SCOP en la BLA tuvieron significativamente menos CAS que los animales VEH en la misma región (Fig. 19) (I.P.= Veh: $3.5 \pm 1.6\%$; SCOP: $17.6 \pm 5.4\%$; $t_{(11)} = 2.7$, $p < 0.05$) aunque una prueba de t de un grupo *versus* un índice de preferencia de 50% (mostrando una preferencia similar de la sacarina a comparación del agua) también mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) lo que sugiere que si bien la inhibición previa de los receptores muscarínicos en la BLA sí afecta la evocación del CAS, no la anula completamente.

EVOCACIÓN BLA

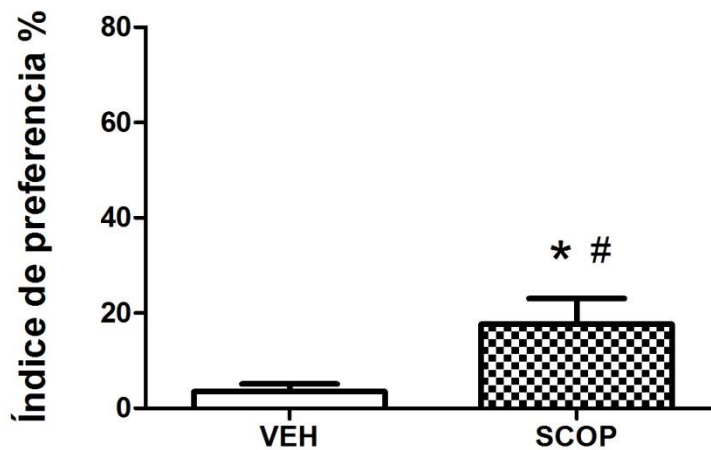


Fig. 19A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-BLA de SCOP o VEH en ratas Wistar antes de la evocación del CAS, realizada 48h después del condicionamiento.. *: $p < 0.05$ vs. VEH; #: $p < 0.05$ vs. 50%.

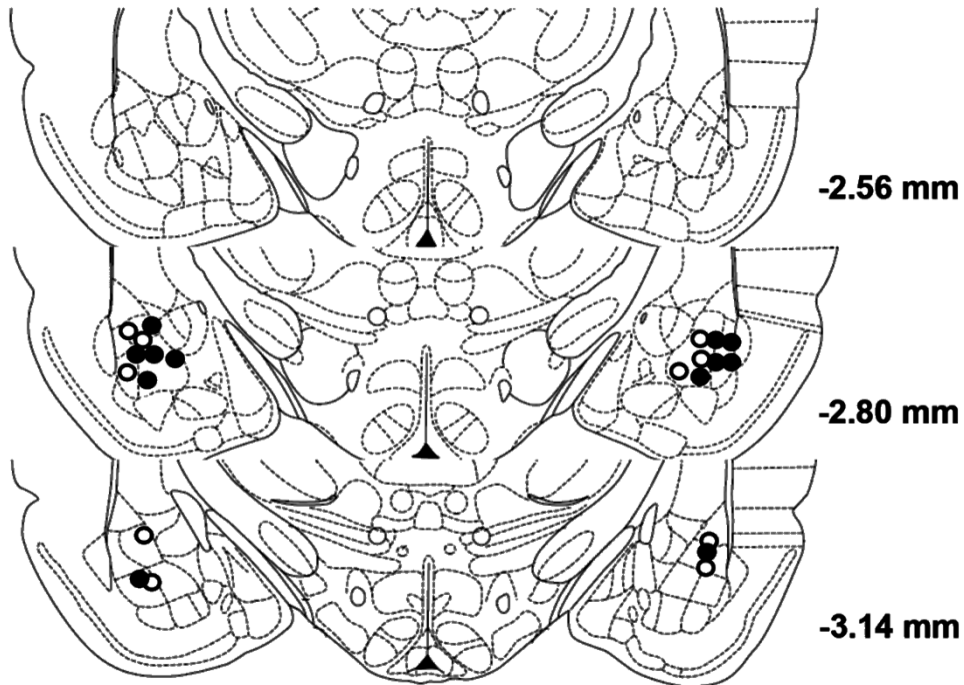


Fig. 19B Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de la BLA para los experimentos de evocación.

Dado que obtuvimos efectos diferenciales en el papel de los muscarínicos en la CeA y la BLA en la evocación del CAS, retomamos nuestros procedimientos de infusión de SCOP pre-adquisición, pero ahora con infusiones específicas dirigidas a la BLA o la CeA. Al parecer la inhibición de los receptores muscarínicos en la BLA antes de la adquisición del CAS afecta su retención tanto a corto (I.P.= VEH y SCOP: $9.90 \pm 7.1\%$ vs. $46.15 \pm 13.6\%$; $t_{(13)} = 2.54$, $p < 0.03$) (Fig. 20) como a largo plazo (I.P.= $4.99 \pm 2.8\%$ y $41.75 \pm 13.6\%$, VEH vs. SCOP; $t_{(14)} = 2.99$, $p < 0.01$)

En la CeA ocurre lo mismo, al inhibir los receptores muscarínicos antes de la adquisición del CAS afecta su retención en MCP (Fig. 21A) (I.P.= SCOP: $61.15 \pm 11.2\%$ y VEH: $11 \pm 7.4\%$; $t_{(13)} = 3.81$, $p < 0.01$) y MLP (Fig. 21B) (I.P.= SCOP: $28.6 \pm 9.7\%$ and $1.68 \pm 0.7\%$; $t_{(12)} = 2.8$, $p < 0.05$).

PRE-ADQUISICIÓN BLA MCP

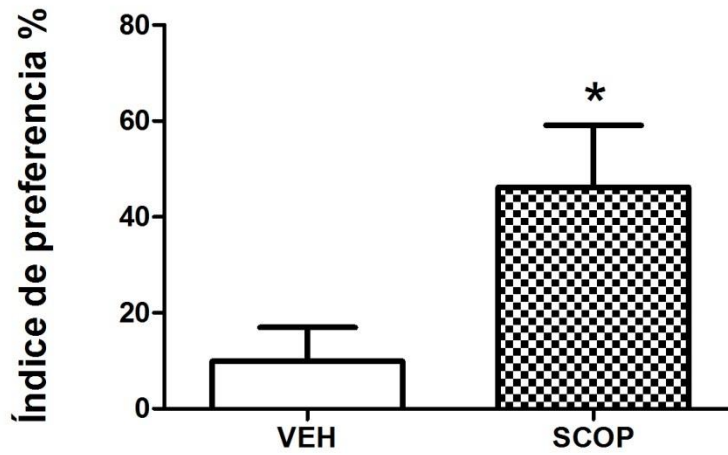


Fig. 20A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-BLA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente antes del CAS para la MCP. *: $p < 0.05$

PRE-ADQUISICIÓN BLA MLP

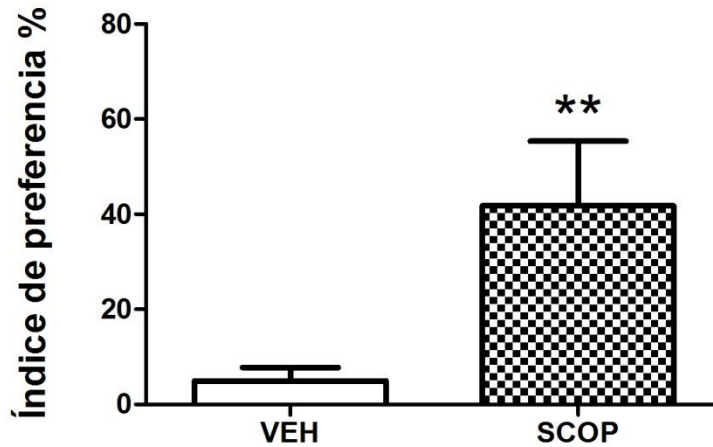


Fig. 20B Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-BLA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente antes del CAS para la MLP. **: $p < 0.01$

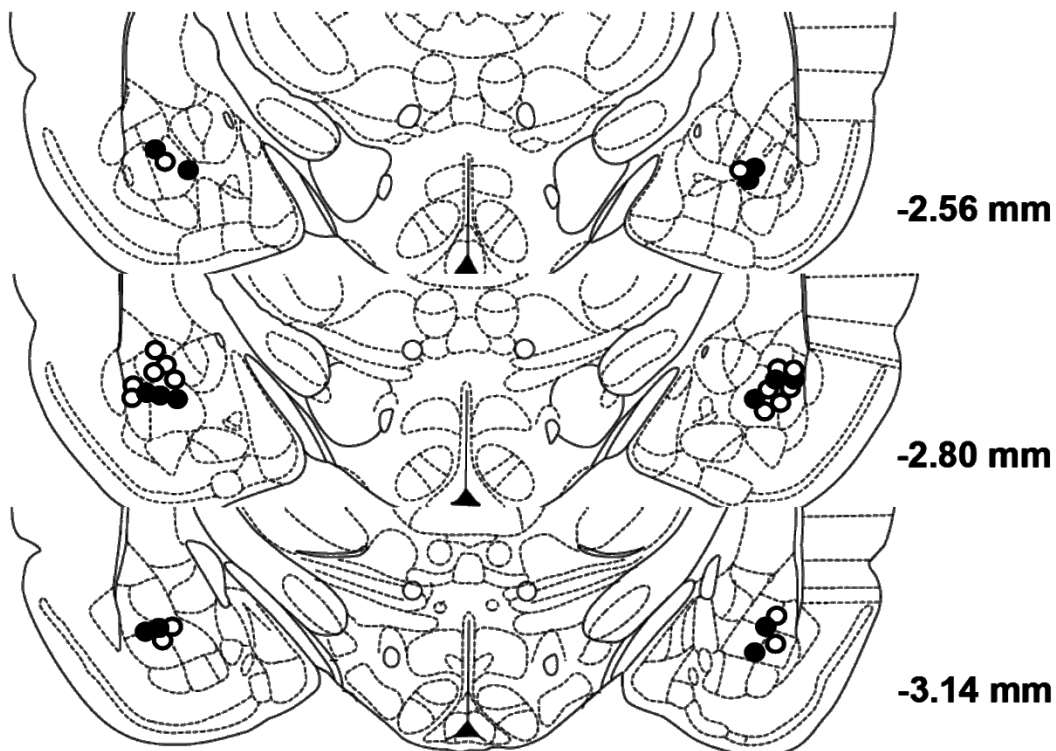


Fig. 20C Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de BLA para los experimentos de pre-adquisición en MCP y MLP.

PRE-ADQUISICIÓN CeA MCP

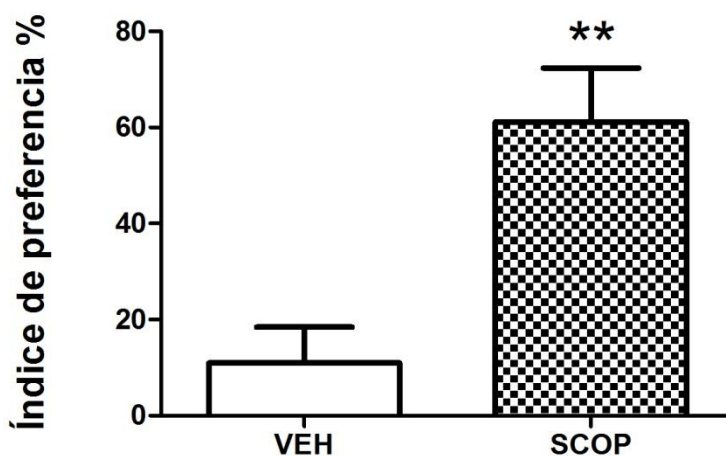


Fig. 21A Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-CeA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente antes del CAS para la MCP. **: $p < 0.01$

PRE-ADQUISICIÓN CeA MLP

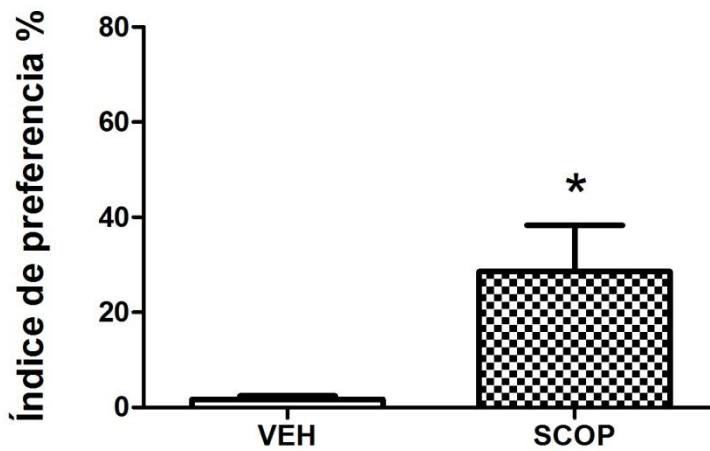


Fig. 21B Diferencia de índice de preferencia ocasionada por efecto de la infusión intra-CeA de SCOP o VEH en ratas Wistar inmediatamente antes del CAS para la MLP. *: $p < 0.05$

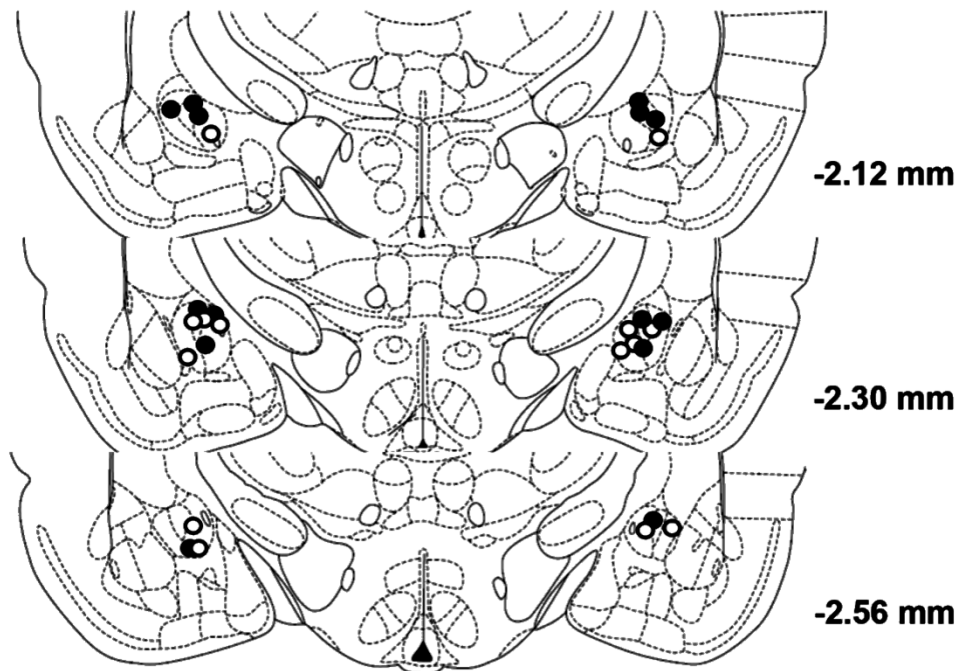


Fig. 21C Esquema de los sitios de micro-inyección en ratas, donde se observan las diferentes infusiones con ●Escopolamina y ○Vehículo en el área de CeA para los experimentos de pre-adquisición en MCP y MLP.

Discusión

Los receptores muscarínicos en la BLA y CeA son necesarios para el aprendizaje del CAS

Dado que la investigación se centra en el papel de los receptores muscarínicos en la AMY cuando se realiza la tarea del CAS, los resultados obtenidos mostraron que la actividad de estos receptores en el AMY previo a la adquisición es necesaria para dicho aprendizaje. Investigaciones previas reportan que en la CG (Ranier *et al.*, 2003), la infusión de escopolamina previa a la tarea en el AMY, impide la formación de la MCP y MLP del CAS. Esto sugiere que, la actividad de los receptores muscarínicos es esencial para que el aprendizaje ocurra, pero solo por un breve periodo, ya que no se observó ningún efecto con el mismo tratamiento después del condicionamiento.

Se sabe que las aferentes colinérgicas del prosencéfalo basal hacia la AMY desempeñan un papel en el aprendizaje de condicionamiento al miedo (Wilson & Fadel, 2017), posiblemente a través del aumento en la relación señal/ruido inducido por los receptores muscarínicos en neuronas glutamatérgicas de la BLA (Unal *et al.*, 2015). Se ha identificado recientemente que la actividad de las neuronas de la CI que proyectan BLA es necesaria y suficiente para el aprendizaje y la evocación del CAS (Wilson & Fadel, 2017). Además, durante el CAS, se produce una reasignación en la población que responde al gusto de neuronas de la CI que proyectan BLA, de modo que la respuesta de la población provocada por el gusto condicionado aversivamente se correlaciona con una aversión innata (Lavi & Lüthi, 2018).

Estos datos discrepan con investigaciones anteriores en las cuales la inhibición de la síntesis proteica en la BLA durante la adquisición del CAS no afectó la formación del mismo (De la Cruz *et al.*, 2008). Estas discrepancias se pueden deber a que el método de consumo es forzado del sabor utilizado en ese experimento pudo haber enmascarado algún efecto del inhibidor de síntesis proteica empleado (anisomicina), además de que dicha droga tiene efectos colaterales aparte de la inhibición de la síntesis proteica que pueden complicar su

interpretación (Canal & Gold, 2007; González *et al.*, 2019). Sin embargo, estudios más recientes demostraron que lesiones circunscritas a la BLA, pero no a la AMY medial ni a la CeA impiden la formación del CAS. Por otra parte, un estudio reciente reveló que las proyecciones de neuronas piramidales a la BLA son necesarias y suficientes para la formación del CAS en ratones (Kayyal *et al.*, 2019) al igual que dichas proyecciones ocurren en una inmensa red neuronal. Además, recientemente se sugiere que el efecto de la ACh es prologar postdespolarización en neuronas de la BLA lo cual permite la asociación entre dos estímulos durante el aprendizaje asociativo, y este efecto es dependiente de la actividad de los receptores muscarínicos (Unal *et al.*, 2015).

La inhibición de los muscarínicos en la post-adquisición permite la formación del CAS

La falta de efecto de las infusiones intra-AMY posteriores al aprendizaje documentada aquí, aunada al hecho de que las infusiones previas al entrenamiento deterioraron la MCP y MLP, sugiere que los receptores muscarínicos en el AMY están involucrados en la adquisición inicial, pero no en la consolidación de la tarea del CAS. Estos hallazgos son contrarios a lo que se ha observado con la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas posteriores al entrenamiento (De la Cruz *et al.*, 2008) o de antagonistas de los receptores NMDA (Guzmán & Bermúdez-Rattoni, 2012), que afectan específicamente la MLP y, por lo tanto, pueden perjudicar específicamente la fase de consolidación del CAS. El período de requerimiento muscarínico durante el aprendizaje y la formación de la memoria también parecen depender de la modalidad y la estructura. Por ejemplo, se demostró que las infusiones de SCOP posteriores al entrenamiento en la corteza perirral deterioraron la formación de la memoria a corto y largo plazo de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos, mientras que los efectos de las infusiones intrahipocampales se restringieron solo a la MCP (Balderas, & Morin, 2012). Además, las infusiones de escopolamina en la CI después de la presentación del gusto novedoso anula el aprendizaje incidental del gusto (atenuación de la neofobia), pero no el CAS (Gutiérrez, *et al.*, 2003). En la AMY, las infusiones de

SCOP intra-BLA posteriores al entrenamiento deterioraron el condicionamiento del miedo contextual, mientras que las infusiones posteriores al entrenamiento del agonista muscarínico oxotremorina lo mejoraron (Bucherelli *et al.*, 2006; Cangioli *et al.*, 2002; Wilson & Fadel, 2017). Además, los experimentos de evitación inhibitoria mostraron que la consolidación de la memoria para esta tarea está modulada por los subtipos de receptores muscarínicos M1 y M2 en el BLA (Power & McGaugh, 2003). Por lo tanto, la resistencia de la formación de la memoria al CAS tras la infusión de SCOP post-adquisición, tanto en la AMY como se informa aquí, en la CI (Gutiérrez *et al.*, 2003), parece ser particular de la memoria gustativa aversiva y puede sugerir un mecanismo de codificación de la memoria más redundante. Dada su ubicación distinta y las cascadas de señalización, otros estudios deberían evaluar el papel de los subtipos de receptores muscarínicos específicos en el CeA y BLA durante el aprendizaje de la CAS.

La actividad de los receptores muscarínicos en la BLA , pero no en la CeA es necesaria para la evocación del CAS

Mientras que la infusión de SCOP intra-CeA antes de la prueba no afectó la evocación del CAS, el mismo tratamiento en la BLA sí produjo un deterioro, en contraste con lo que se informó en la CI donde no se observó ningún efecto de las infusiones de SCOP previas a la prueba (Ramírez-Lugo *et al.*, 2003). La evidencia en las tareas de memoria episódica dependientes del hipocampo, así como los modelos computacionales, tradicionalmente han atribuido un papel específico para los receptores muscarínicos en la codificación pero no en la evocación de la memoria (Hasselmo, 2006). Sin embargo, existe evidencia creciente que sugiere que los receptores muscarínicos también están involucrados en la evocación de ciertos tipos de memoria. Por ejemplo, un estudio reciente encontró que las infusiones de SCOP intra-BLA previas a la prueba impedían la recuperación de una tarea de evitación inhibitoria, efecto que fue prevenido por infusiones intra-BLA de NMDA pre-entrenamiento de (Nazarinia & Yazdanbakhsh, 2017). Por lo tanto, la participación de la AMY en la evocación parece ser altamente dependiente del tipo

de tarea (Soares & Oliveira, 2006), de la estructura cerebral y del subtipo de receptor (Leaderbrand *et al.*, 2016). De manera similar, en el caso de la AMY, recientemente se ha sugerido que las fallas en la recuperación de la memoria desempeñan un papel importante en los déficits cognitivos que ocurren en las primeras etapas de afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Roy *et al.*, 2016). Otros estudios que aborden el papel preciso del sistema colinérgico en la recuperación de la memoria podrían contribuir a revelar enfoques terapéuticos más refinados para estas afecciones.

Gracias a los experimentos de este trabajo, podemos inferir que la actividad de los receptores muscarínicos en la BLA parece requerirse, al menos parcialmente, para la evocación del CAS dado que, aunque el CAS se atenúa por infusiones de SCOP intra-BLA antes de la evocación, éste no elimina completamente. Por lo tanto, podemos decir que la actividad de los receptores muscarínicos es necesaria hasta cierto punto también para la evocación del CAS en la BLA pero no en la CeA. Varios estudios han mostrado que la inhibición sistémica de los receptores muscarínicos afecta la evocación de la memoria, por ejemplo en tareas de aprendizaje contextual dependiente de hipocampo (Patricio, Soares, & Oliveira, 2017) sugiriendo que uno de los papeles de la modulación colinérgica a nivel central es la recuperación de la información previamente almacenada.

De manera adicional, el hecho que se sigue observando CAS aunque atenuado en los animales con SCOP en la BLA sugiere que los procesos de recuperación de la información dependientes de acetilcolina pueden funcionar de manera redundante por vías basocorticales y basoamigdalinas, tal como había sido sugerido anteriormente (Gutiérrez *et al.*, 1999).

Conclusiones y perspectivas

A pesar de que en la literatura se reporta que hay una mayor densidad de receptores muscarínicos tipo M1 y M2 en la BLA (McDonald & Mascagni, 2010), falta por

descubrir cuál es la participación diferencial de dichos receptores, ya que la SCOP inhibe ambos por igual; la tarea ahora es, utilizar antagonistas específicos de los receptores M1 y M2 en las distintas etapas del CAS.

Ahora bien, poco se sabe de los efectos específicos de la SCOP. En el cerebro, también hay receptores 5-HT₃ están extensamente distribuidos en la AMY e hipocampo, regiones que como describí anteriormente son importantes para la memoria y atención espacial, pero además están involucradas en el control emocional y son asociados a desordenes como ansiedad y depresión (Barnes *et al.*, 1990; Chugh & Datta, 1991). Si bien la dosis administrada de SCOP pudiese tener un efecto colateral a receptores 5HT₃, una perspectiva a futuro es probar con agonistas específicos a receptores muscarínicos con un CAS leve, pudiendo así descartar los efectos provocados por la inhibición de receptores 5HT₃ sobre el CAS.

Por último, se ha descrito un fenómeno llamado memoria dependiente de estado o aprendizaje dependiente de estado, el cual consiste en que se recuerda más fácilmente la información cuando el estado físico y mental del sujeto experimental es el mismo que cuando adquirieron dicha información. Entonces, atendiendo a lo anterior quedaría por descartar este fenómeno en nuestro estudio, administrando SCOP tanto al momento de la adquisición como antes de la evocación.

Referencias

- Accolla, R., Bathellier, B., Petersen, C. C. H., & Carleton, A. (2007). Differential Spatial Representation of Taste Modalities in the Rat Gustatory Cortex. *Journal of Neuroscience*, 27(6), 1396–1404.
- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32(4), 373–381.
- Aitta-aho, T., Hay, Y. A., Phillips, B. U., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Paulsen, O., & Apergis-Schoute, J. (2018). Basal Forebrain and Brainstem Cholinergic Neurons Differentially Impact Amygdala Circuits and Learning-Related Behavior. *Current Biology*, 28(16), 2557-2569.e4.

- Ambrogio Lorenzini, Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of learning and memory*, 71(1), 1–18.
- Attneave, F., B., M., & Hebb, D. O. (1950). The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory. *The American Journal of Psychology*.
- Balderas, I., Morin, J. P., Rodriguez-Ortiz, C. J., & Bermudez-Rattoni, F. (2012). Muscarinic receptors activity in the perirhinal cortex and hippocampus has differential involvement in the formation of recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*.
- Ballinger, E. C., Ananth, M., Talmage, D. A., & Role, L. W. (2016). Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron*, 91(6), 1199–1218.
- Barnes, J. M., Costall, B., Coughlan, J., Domeney, A. M., Gerrard, P. A., Kelly, M. E., ... Tyers, M. B. (1990). The effects of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on cognition in rodents and primates. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. (35) 955-962
- Bàron, S. P., Wright, D., & Wenger, G. R. (1998). Effects of drugs of abuse and scopolamine on memory in rats: Delayed spatial alternation and matching to position. *Psychopharmacology*, 137(1), 7–14.
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, 217(4558), 408–414.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience: exploring the brain*. Fourth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 252-255.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(3), 209–217.
- Blokland, A. (1995). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews*, 21(3), 285–300.
- Brito GN, Brito LS. Lesions in the septo-hippocampal system or prelimbic cortex of rats do not alter the performance of a T-maze visual discrimination task but disrupt the performance of a T-maze alternation task. *Braz J Med Biol Res*. 1987;20(3-4):461-5.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B., & Blandina, P. (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning and Memory*, 13(4), 426–430.
- Canal, C. E., Chang, Q., & Gold, P. E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12500–12505.
- Cangioll, I., Baldi, E., Mannaioni, P. F., Bucherelli, C., Blandina, P., & Passani, M. B. (2002). Activation of histaminergic H₃ receptors in the rat basolateral amygdala

- improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. *European Journal of Neuroscience*, 16(3), 521–528.
- Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic Receptors-Characterization, coupling and function. *Pharmacology and Therapeutics*, 58(3), 319-379.
- Chandler, D. J., Waterhouse, B. D., & Gao, W. J. (2014). New perspectives on catecholaminergic regulation of executive circuits: Evidence for independent modulation of prefrontal functions by midbrain dopaminergic and noradrenergic neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, 8 (53), 1-10.
- Chen, J. Y., Campos, C. A., Jarvie, B. C., & Palmiter, R. D. (2018). Parabrachial CGRP Neurons Establish and Sustain Aversive Taste Memories. *Neuron*, 100(4), 891-899.e5.
- Chugh, Y., Saha, N., Sankaranarayanan, A., & Datta, H. (1991). Enhancement of Memory Retrieval and Attenuation of Scopolamine-Induced Amnesia Following Administration of 5-HT₃ Antagonist ICS 205-930. *Pharmacology & Toxicology*, 69(2), 105-106.
- Corthell, J. T., & Corthell, J. T. (2014). Chapter 10 – Immunohistochemistry. *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*. Elsevier Science, 2014. 124
- De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *The European journal of neuroscience*, 28(7), 1377–1381.
- Dunn, L. T., & Everitt, B. J. (1988). Double Dissociations of the Effects of Amygdala and Insular Cortex Lesions on Conditioned Taste Aversion, Passive Avoidance, and Neophobia in the Rat Using the Excitotoxin Ibotenic Acid. *Behavioral Neuroscience*. 102(1), 3-23.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division. Igarss 2014.
- Escobar, M. L., Chao, V., & Bermudez-Rattoni, F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*, 779(1–2), 314–319.
- Ferreira, G., Gutiérrez, R., De la Cruz, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 16(6), 1139–1145.
- Foy, M. R., & Foy, J. G. (2016). Conditioned taste aversion. *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, (December 2015), 35–41.
- Gallo, M., Roldan, G., & Bureš, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research*, 52(1), 91–97.
- Giovannini, M. G., Rakovska, A., Benton, R. S., Pazzagli, M., Bianchi, L., & Pepeu, G. (2001). Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and

- glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*, 106(1), 43–53.
- Givens, B., & Olton, D. S. (1995). Bidirectional modulation of scopolamine-induced working memory impairments by muscarinic activation of the medial septal area. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63(3), 269-273.
- González-Franco, D. A., Bello-Medina, P. C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2019). Effects of anisomycin infusions into the dorsal striatum on memory consolidation of intense training and neurotransmitter activity. *Brain Research Bulletin*, 150, 250–260.
- González-Sánchez, H., Tovar-Díaz, J., Morin, J. P., & Roldán-Roldán, G. (2019). NMDA receptor and nitric oxide synthase activity in the central amygdala is involved in the acquisition and consolidation of conditioned odor aversion. *Neuroscience Letters*, 707, 1-6.
- Gutiérrez, H., Gutiérrez, R., Ramírez-Trejo, L., Silva-Gandarias, R., Ormsby, C. E., Miranda, M. I., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Redundant basal forebrain modulation in taste aversion memory formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(17), 7661–7669.
- Gutiérrez, R., Rodríguez-Ortiz, C. J., De La Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2003). Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiology of learning and memory*, 80(3), 323–331.
- Gutiérrez, R., Téllez, L. A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, 17(8), 1556–1562.
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learning and Memory*, 19(6), 231–238.
- Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), 710–715.
- Kayyal, H., Yiannakas, A., Kolatt Chandran, S., Khamaisy, M., Sharma, V., & Rosenblum, K. (2019). Activity of Insula to Basolateral Amygdala Projecting Neurons is Necessary and Sufficient for Taste Valence Representation. *The Journal of Neuroscience*, 39(47), 0752–19.
- Klinkenberg, I., & Blokland, A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1307–1350.
- Kokare, D. M., Shelkar, G. P., Borkar, C. D., Nakhate, K. T., & Subhedar, N. K. (2011). A simple and inexpensive method to fabricate a cannula system for intracranial injections in rats and mice. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 64(3), 246–250.
- Lavi, K., Jacobson, G. A., Rosenblum, K., & Lüthi, A. (2018). Encoding of

- Conditioned Taste Aversion in Cortico-Amygdala Circuits. *Cell Reports*, 24(2), 278–283.
- Leaderbrand, K., Chen, H. J., Corcoran, K. A., Guedea, A. L., Jovasevic, V., Wess, J., & Radulovic, J. (2016). Muscarinic acetylcholine receptors act in synergy to facilitate learning and memory. *Learning and Memory*, 23(11), 631–638.
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Current Biology*, 17(20), 868–874.
- Likhtik, E., & Johansen, J. P. (2019, octubre 1). Neuromodulation in circuits of aversive emotional learning. *Nature Neuroscience*, Vol. 22, pp. 1586–1597.
- McDonald, A. J., & Mascagni, F. (2010). Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. *Brain structure & function*, 215(1), 37–48.
- Miranda, M I. (2011). El sabor de los recuerdos : Formación de la memoria gustativa. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 1–14.
- Miranda, María Isabel, Ramírez-Lugo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, 882(1–2), 230–235.
- Nazarinia, E., Rezayof, A., Sardari, M., & Yazdanbakhsh, N. (2017). Contribution of the basolateral amygdala NMDA and muscarinic receptors in rat's memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 139, 28–36.
- 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.
- Paller, K. A. (2009). Memory consolidation: Systems. En *Encyclopedia of Neuroscience*, 741-749
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(6), 383–400.
- Patricio, R. R., Soares, J. C. K., & Oliveira, M. G. M. (2017). M1 muscarinic receptors are necessary for retrieval of remote context fear memory. *Physiology and Behavior*, 169, 202–207.
- Power, A. E., McIntyre, C. K., Litmanovich, A., & McGaugh, J. L. (2003). Cholinergic modulation of memory in the basolateral amygdala involves activation of both m1 and m2 receptors. *Behavioural Pharmacology*, 14(3), 207–213.
- Ramírez-Lugo, L., Miranda, M. I., Escobar, M. L., Espinosa, E., & Bermúdez-Rattoni, F. (2003). The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79(2), 184–193.
- Reilly, S., & Bornovalova, M. A. (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: A critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(7), 1067–1088.
- Roldan, G., & Bures, J. (1994). Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with

- poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research*, 65(2), 213–219.
- Roy, D. S., Arons, A., Mitchell, T. I., Pignatelli, M., Ryan, T. J., & Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, 531(7595), 508–512.
- Shinohara, K., & Yasoshima, Y. (2019). Inactivation of the basolateral amygdala suppresses the expression of taste neophobia but not the retrieval process in attenuation of neophobia. *Behavioural Brain Research*, 372(June), 112010.
- Soares, J. C. K., Fornari, R. V., & Oliveira, M. G. M. (2006). Role of muscarinic M1 receptors in inhibitory avoidance and contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(2), 188–196.
- Sokolov, E. N. (1970). Mecanismos de la memoria. *Editorial Universidad Estatal de Moscú*, (1), 265-270.
- Staszko, S. M., Boughter, J. D., & Fletcher, M. L. (2020). Taste coding strategies in insular cortex. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 448–455.
- Timberlake, W. (1994). Behavior systems, associationism, and Pavlovian conditioning. *Psychonomic Bulletin & Review*.
- Unal, Cagri T., Pare, D., & Zaborszky, L. (2015). Impact of basal forebrain cholinergic inputs on basolateral amygdala neurons. *Journal of Neuroscience*, 35(2), 853–863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2706-14.2015>
- Walker, J. (2002). *Psychology: The Science of Mind and Behaviour* (4th edition). *Nurse Education Today*. 1000 (4)
- Wang, L., Gillis-Smith, S., Peng, Y., Zhang, J., Chen, X., Salzman, C. D., ... Zuker, C. S. (2018). The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature*, 558(7708), 127–131.
- Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H. P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125, 205-213.
- Wilson, M. A., & Fadel, J. R. (2017). Cholinergic regulation of fear learning and extinction. *Journal of Neuroscience Research*, 95(3), 836–852.
- Yamamoto, T., & Ueji, K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Frontiers in systems neuroscience*, 5(September), 76.
- Yiannakas, A., & Rosenblum, K. (2017). The Insula and Taste Learning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(November), 1–24.