



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**MECANISMOS NEURONALES QUE SUBYACEN AL CAMBIO EN EL VALOR HEDÓNICO DEL  
ESTÍMULO GUSTATIVO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CONTRERAS VAZQUEZ OMAR ALEJANDRO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JEAN-PASCAL MORIN**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM**

**DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MECANISMOS NEURONALES QUE SUBYACEN AL CAMBIO EN EL VALOR HEDÓNICO DEL  
ESTÍMULO GUSTATIVO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CONTRERAS VAZQUEZ OMAR ALEJANDRO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JEAN-PASCAL MORIN**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

**DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA**

**OFICIO CPCB/734/2022**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de junio de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **CONTRERAS VAZQUEZ OMAR ALEJANDRO** con número de cuenta **308165498** con la tesis titulada **“MECANISMOS NEURONALES QUE SUBYACEN AL CAMBIO EN EL VALOR HEDÓNICO DEL ESTÍMULO GUSTATIVO”**, realizada bajo la dirección del **DR. JEAN-PASCAL MORIN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN  
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO  
Vocal: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
Vocal: DR. DANIEL OSORIO GÓMEZ  
Secretario: DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de agosto de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos institucionales**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, especialmente a la Facultad de Medicina, por brindarme las herramientas necesarias y programa académico para poderme desarrollar como buen profesionista.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por recibir el apoyo de beca para poder dedicarme tiempo completo a el desarrollo de mi proyecto de investigación. 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 la Facultad de Medicina.

Agradezco mi tutor principal, el Dr. Jean-Pascal Morin, por aceptarme en su grupo de investigación, ser un excelente tutor, padre académico y amigo.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial el Dr. Óscar Prospero García y al Dr. Isaac González Santoyo por su tiempo, consejos y dedicación para encaminarme al desarrollo de este proyecto.

## **Agradecimientos personales**

Agradezco especialmente a mi familia, que siempre creyó en mí, dándome su apoyo incondicional.

Agradezco al Dr. Gabriel Roldán Roldán, por permitirme trabajar en su laboratorio, apoyarme con sus conocimientos y experiencia como investigador.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio que me siempre me brindaron su apoyo en conocimientos y en las actividades de este.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>MECANISMOS NEURONALES QUE SUBYACEN AL CAMBIO EN EL VALOR HEDÓNICO DEL ESTÍMULO GUSTATIVO</b> .....	3
<b>MEMORIA GUSTATIVA: MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN SU FORMACIÓN</b> ...	6
<b>SEÑAL GUSTATIVA Y ESTRUCTURAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL INVOLUCRADAS</b> .....	8
<b>REPRESENTACIÓN CORTICAL Y AMIGDALINA DE LA MEMORIA GUSTATIVA SEGÚN SU VALOR HEDONICO</b> .....	11
<b>SISTEMA COLINÉRGICO Y SUS FUNCIONES</b> .....	14
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	18
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>METODOLOGÍA</b> .....	20
<b>Animales</b> .....	20
<b>Cirugía</b> .....	20
<b>Pruebas conductuales</b> .....	21
<b>Fármacos e Infusión</b> .....	23
<b>Histología</b> .....	23
<b>Análisis estadístico</b> .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>Histología</b> .....	26
<b>Atenuación de la neofobia (AN) con distintas concentraciones de sacarina</b> ....	34
<b>Consumo de sacarina en animales agrupados y aislados</b> .....	35
<b>Infusión de escopolamina en AMY antes del sabor novedoso</b> .....	37
<b>Infusión de escopolamina en BLA antes del sabor novedoso</b> .....	40
<b>Infusión de escopolamina en CeA antes del sabor novedoso</b> .....	44
<b>Infusión de oxotremorina en BLA antes del sabor novedoso</b> .....	47
<b>DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	64
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65

## RESUMEN

La memoria gustativa es un mecanismo que favorece la supervivencia de un organismo permitiéndole recordar aquellos alimentos que son seguros, tras su ingesta sin consecuencias aversivas (atenuación de la neofobia), de los que no lo son, una exposición con consecuencias post-ingestivas negativas (condicionamiento aversivo al sabor). La actividad muscarínica se ha visto implicada en la formación de la memoria siendo necesaria en algunos núcleos cerebrales como la amígdala, hipocampo, entre otros. Hoy en día se desconocen las implicaciones de la actividad muscarínica en la amígdala para la formación de una memoria gustativa segura. En este trabajo buscamos identificar la función de esta actividad muscarínica mediante el bloqueo farmacológico con escopolamina en distintos subnúcleos de la amígdala en ratas antes de exponerse por primera vez a un sabor novedoso (sacarina). Observamos que la infusión de escopolamina en la amígdala total y basolateral no afecta la detección de novedad, pero sí altera la formación de la memoria pues parece generarse una memoria aversiva ya que el consumo de sacarina es menor en el segundo día que en el primer día de exposición. Por otro lado, en la amígdala central se ve alterada la detección de novedad, consumiendo grandes cantidades de sacarina en el primer día como si ya fuera familiar; y consecuentemente se ve alterada la memoria el segundo día de consumo como si ésta fuera nuevamente neofóbica. Por último, la infusión de oxotremorina, un agonista muscarínico, en la amígdala basolateral no tuvo efecto sobre la percepción ni sobre la memoria, aunque esto podría deberse a múltiples factores por lo que es necesario desarrollar una mejor técnica metodológica.

## ABSTRACT

Taste memory is a mechanism that increases the probabilities of an organism's survival by allowing them to remember those foods that are safe, after an exposure without aversive consequences (attenuation of neophobia), of those that are not, an exposure with negative post-ingestive consequences (aversive taste conditioning). The muscarinic activity has been implicated in memory formation, being necessary in some brain nuclei such as the amygdala, hippocampus, among others. Nowadays, the implication of the muscarinic activity within the amygdala for the formation of a safe taste memory are unknown. So, in this work we seek to identify the function of this muscarinic activity through the pharmacological blockade with scopolamine in different subnuclei of the amygdala in rats before being exposed for the first time to a novel taste (saccharin). We observed that the infusion of scopolamine in the total and basolateral amygdala does not affect the novelty detection, but it does affect memory formation, since it seems to generate an aversive memory since the consumption of saccharin is lower on the second day than on the first day of exposure. On the other hand, in the central amygdala novelty detection is affected, consuming large amounts of saccharin on the first day as if it were already familiar; and consequently, memory is altered on the second day of consumption as if it were neophobic again. Finally, the infusion of oxotremorine, a muscarinic agonist, in the basolateral amygdala had no effect on perception or memory, although this could be due to multiple factors, which is why it is necessary to develop a better methodological technique.

## MECANISMOS NEURONALES QUE SUBYACEN AL CAMBIO EN EL VALOR HEDÓNICO DEL ESTÍMULO GUSTATIVO

Al bien conocido refrán “el tiempo es oro” usualmente referido a la importancia de enfocarse en el trabajo para obtener mayores rendimientos económicos, también puede dársele otra acepción: que conforme pasan los años somos más ricos en experiencias debido a nuestra interacción con el mundo que nos rodea. Gracias a ello nos constituimos como humanos y nos distinguimos unos de otros. Si no tuviéramos la posibilidad de guardar en nuestra mente la enorme cantidad de experiencias cotidianas a lo largo de la vida, como degustar un corte de carne, conocer personas para intercambiar ideas o la lectura de un libro, nuestro día a día sería muy difícil. Tal es el caso del famoso paciente Henry Gustave Molaison, mejor conocido como H.M. en los años 50. Tras un accidente durante su infancia, H.M. vivió con crisis convulsivas hasta la edad de 27 años que se volvieron tan severas que afectaban negativamente sus actividades cotidianas y laborales. El Dr. Scoville, WB., tras agotar todos los recursos disponibles para tratar las convulsiones, decidió realizar una lobectomía temporal. Después de la cirugía, las convulsiones habían remitido, pero además manifestó una severa dificultad para formar nuevos recuerdos. La Dra. Milner, B., que tras haberle realizado numerosas pruebas de memoria, detectó que H.M. era incapaz de adquirir (aprender) nueva información, quedándose únicamente con los recuerdos que tenía desde antes de la cirugía, quedando así atrapado en un eterno presente. H.M. entonces fue diagnosticado con amnesia anterógrada, que consiste en la dificultad para aprender nueva información y por lo tanto la imposibilidad de formar nuevas memorias (Beecher Scoville et al., 2000; Corkin, 2002; Dávila, 2009). Toda esta información que se consolida y queda almacenada en el cerebro es lo que conocemos como *memoria*; por otro lado, el *aprendizaje*, es el proceso mediante el cual adquirimos esa información capaz de modificar nuestra manera de ser, de pensar y por supuesto, nuestro comportamiento a futuro. (Bear et al., 2015; Kandel, 2013).

Para su mejor entendimiento y estudio, la memoria se ha clasificado de distintas formas. Según su temporalidad se puede dividir en memoria de corto plazo (Short Term Memory – STM, por sus siglas en inglés) y memoria de largo plazo (Long Term Memory – LTM). La primera se distingue por lo siguiente: no hay un tiempo establecido para definir una STM, se caracteriza por decaer en función del tiempo y por tener una capacidad limitada de almacenamiento. La segunda, la LTM, se distingue de la primera por no decaer en función del tiempo, incluso se puede retener información de años o décadas atrás, y la cantidad de información que se puede retener en ella parece no tener límite (Cowan, 2009).

Otra forma de clasificar a la memoria es según el tipo de información que almacena, dividiéndose así en declarativa y no declarativa. La memoria declarativa, también conocida como explícita, está constituida por la información que entendemos y manejamos de manera consciente. Por otro lado, la memoria no declarativa es aquella que de forma inconsciente integra las modificaciones de nuestro comportamiento derivadas de la experiencia con el medio (Almaraz-Espinoza & Grider, 2020; Davis, 2001). Este tipo de memoria es la base para desarrollar habilidades, reflejos y asociaciones emocionales y requiere múltiples exposiciones a los estímulos para su consolidación (p. ej. aprender a andar en bicicleta o tocar un instrumento musical); de ahí que también se le conoce como memoria implícita y/o procedimental (Almaraz-Espinoza & Grider, 2020; Kandel, 2013; Lum et al., 2012).

La memoria declarativa se puede subdividir a su vez en episódica y semántica. La memoria episódica es aquella que se construye a partir de las vivencias individuales, es decir, de la interacción del sujeto con el medio que lo rodea (contexto) y tiene como característica fundamental que está situada espaciotemporalmente; de ahí que también sea denominada autobiográfica. Cuando revivimos este tipo de memoria somos capaces de visualizar en nuestra mente múltiples fotogramas de ese momento específico de nuestras vidas. Por otro lado, la memoria semántica es independiente de contexto, es decir, no requiere de la interacción del sujeto con el medio y está constituida de los hechos que

conocemos sobre el mundo. Un ejemplo de ésta última es poder recordar tanto las fechas de eventos históricos como las de los cumpleaños de familiares y amigos, las capitales y ciudades importantes de diferentes países o las colonias y barrios de la ciudad (Almaraz-Espinoza & Grider, 2020; Bird & Burgess, 2008; Knierim, 2015).

Finalmente, la memoria también se ha clasificado según su modalidad sensorial, es decir, según el tipo de información que recibe el sujeto, ya que existe evidencia que sugiere que los receptores sensoriales y neuronas que responden al estímulo, así como estructuras y núcleos cerebrales que procesan dicha información participan en su almacenamiento (Mesulam, 1998; Small & Prescott, 2005). Con base en lo anterior podemos intuir que las estructuras anatómicas implicadas en el procesamiento y almacenamiento, o memoria, de un estímulo (p.ej. gustativo) son distintas a aquellas encargadas del procesamiento y almacenamiento de un estímulo diferente (p.ej. auditivo). Aunque por supuesto, un episodio de vida que queda almacenado en un recuerdo autobiográfico representa el recuerdo de una experiencia compleja, a menudo involucrando la interacción entre distintas modalidades sensoriales (Small & Prescott, 2005).

Ya que hemos señalado las distintas clasificaciones de la memoria, podemos identificar a qué rubros pertenece la memoria gustativa, eje central de este trabajo. En primer lugar, la memoria gustativa se clasifica así, según su modalidad sensitiva, ya que para su formación son necesarias estructuras periféricas como la lengua, así como estructuras cerebrales relacionadas con el procesamiento de estímulos gustativos como la parte parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo o “tálamo gustativo” y la corteza insular, los cuales detallaremos más adelante. También podemos ubicar a esta memoria como una LTM ya que se pueden almacenar un número ilimitado de sabores (*items*) durante largos periodos de la vida de un individuo. Por último, esta memoria se puede clasificar como declarativa ya que está caracterizada por la capacidad de reconocer el estímulo y tomar decisiones justificadas ante su experiencia previa con el mismo (contexto).

## MEMORIA GUSTATIVA: MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN SU FORMACIÓN

La supervivencia de un organismo implica el uso continuo de materia y energía obtenidos a partir de los nutrientes adecuados para realizar todas las funciones fisiológicas y así mantener la homeostasis (McKee & McKee, 2012). Dichos nutrientes se encuentran en la naturaleza en múltiples y variadas conformaciones de alimentos. Debido a esto, mecanismos evolutivos como la selección natural, ha dotado a los organismos de la capacidad para identificar, distinguir y recordar los alimentos a los que se expone a lo largo de su vida, promoviendo así su supervivencia. Este proceso se logra de dos maneras:

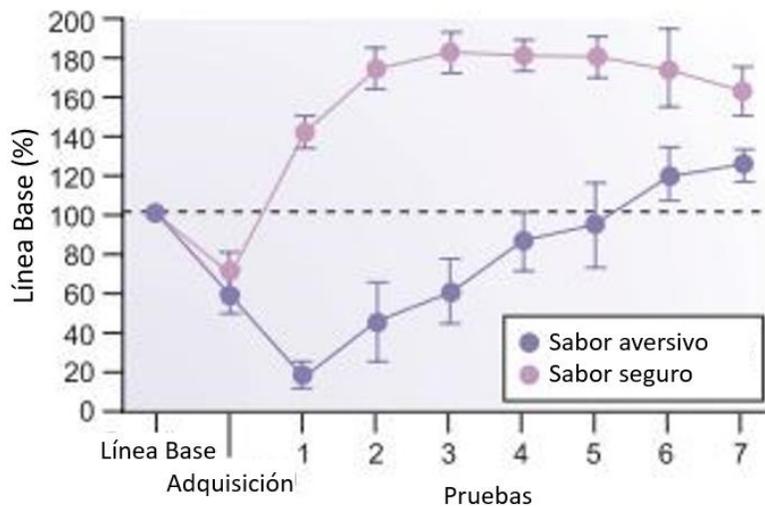
En primer lugar, los mamíferos tienen una preferencia innata por aquellos compuestos dulces y umami (asociados a tener una alta densidad calórica y proteínica respectivamente), mientras que presentan una aversión innata por los compuestos agrios o sobre todo amargos (asociados a ser compuestos tóxicos o en descomposición) (Chen et al., 2011). Por lo tanto, se infiere que los estímulos reconocidos de forma innata como preferidos, provocan un valor hedónico positivo y aquellos que producen rechazo provocan un valor hedónico negativo. Entendemos por valor hedónico a la capacidad del cerebro del sujeto de reaccionar ante algún estímulo (un objeto, una actividad, una persona, el sabor de un alimento, etc.) y procurar su búsqueda para obtener placer (Brosch et al., 2016).

En segundo lugar, los animales cuentan con la capacidad de evaluar el valor hedónico de una comida con base en sus experiencias. De este modo, cuando se exponen por primera vez a un alimento ocurren dos fenómenos: el primero se conoce como neofobia (del griego *neos* [nuevo] y *phobos* [miedo], es decir: “miedo a lo nuevo”), el cual consiste en el consumo cauteloso y en pequeñas cantidades de un alimento novedoso, ya que, en ausencia de experiencias previas con el mismo, el organismo ignora sus consecuencias post-ingestivas, las cuales podrían ser dañinas o incluso fatales. El segundo fenómeno se basa en el aprendizaje: si el estímulo gustativo no tiene consecuencias negativas, el sujeto consumirá mayor

cantidad de alimento en la próxima ocasión; a este tipo de aprendizaje se le conoce como atenuación de la neofobia (AN). Sin embargo, si la ingesta del alimento se acompaña de consecuencias desagradables (p.ej., intoxicación, dolor abdominal, náusea, etc.), el sujeto evitará su consumo en un futuro; a este fenómeno se le conoce como condicionamiento aversivo al sabor (CAS) (Yiannakas et al., 2021). La importancia de evaluar el valor hedónico en base a experiencia recae en si el sujeto tuvo una experiencia sin consecuencias aversivas o incluso una experiencia agradable (p. ej. una taza de café), éste estímulo tendrá un valor hedónico positivo a pesar de ser innatamente aversivo (el café es una bebida amarga que debería generar rechazo de forma innata).

Los fenómenos de neofobia, AN y CAS se pueden replicar en el laboratorio para estudiar la memoria gustativa de forma eficaz, ya que han demostrado ser modelos conductuales capaces de formar una memoria robusta y perdurar a través del tiempo (Molero-Chamizo & Rivera-Urbina, 2020; Núñez-Jaramillo et al., 2010). Estos fenómenos están representados en la Figura 1. En la gráfica se representa el consumo de sacarina expresada como porcentaje del consumo de línea basal de agua durante la primera (adquisición) y subsecuentes presentaciones de solución de sacarina al 0.25%. El consumo de línea base de agua se encuentra en porcentaje (Eje Y) pero también observamos que el consumo de agua (línea base) de ambas condiciones experimentales se encuentra en 100% (Eje X) y su representación subsecuente como la línea punteada. En el día de “adquisición” (véase Fig. 1) se observa el fenómeno de neofobia en ambas condiciones tras ofrecerse un sabor novedoso (sacarina). Durante la neofobia los dos grupos consumen poco volumen de sacarina, a pesar de que sea innatamente positivo, ya que desconocen sus consecuencias post ingestivas. En la condición experimental “sabor aversivo” tras consumir sacarina se le aplicó una inyección intraperitoneal de LiCl que causa dolor gastrointestinal; mientras que a la condición “sabor seguro” se le inyectó solución salina. El fenómeno de AN se observa en la condición de sabor seguro (puntos de color rosa) desde la prueba 1 y cómo éste llega a una asíntota tras varias exposiciones al sabor; mientras que el fenómeno de CAS está representado por la condición sabor aversivo (puntos de color morado) en la prueba 1 en donde se

observa que el consumo de sacarina es todavía menor que en la primera exposición pues se hizo una asociación entre la sacarina (estímulo condicionado) con el dolor gastrointestinal (estímulo incondicionado); por último, el fenómeno de extinción se observa en esta misma condición experimental a partir de la prueba 2 en donde el consumo de sacarina va en aumento, ya que no se volvió a aplicar la inyección de LiCl en los días subsiguientes.



**Figura 1.** Gráfica modificada de Bermúdez-Rattoni, 2004. La línea punteada se refiere a la relación con el 100% de consumo de línea base de agua. Los puntos rosas representan el grupo que mostró AN y que fueron inyectados con solución salina 15 minutos después de haber consumido sacarina. Los puntos morados representan al grupo que mostró CAS que recibió inyección de LiCl en lugar de solución salina.

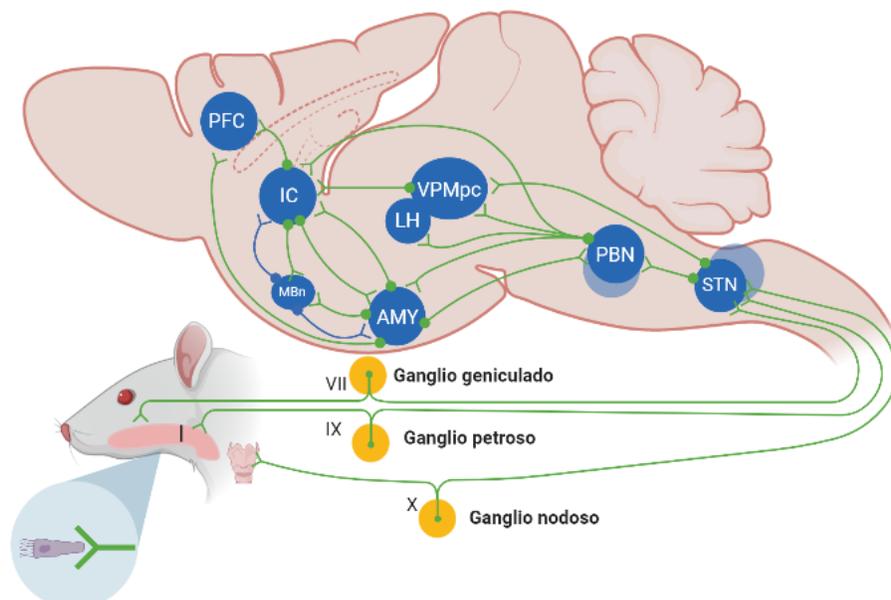
## SEÑAL GUSTATIVA Y ESTRUCTURAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL INVOLUCRADAS

Para entender cómo se forma una memoria gustativa es necesario describir las principales conexiones neuronales involucradas. La señal gustativa inicia con el estímulo gustativo activando los receptores ubicados en los cilios de las células gustativas que se encuentran en la lengua (Figura 2). Dichas células son excitables y al ser estimuladas, liberan neurotransmisores que actúan sobre los receptores

postsinápticos de las neuronas que inervan la lengua. La inervación de la lengua está dada en la siguiente configuración: las 2/3 partes anteriores por la cuerda del tímpano que es rama del nervio facial (VII) cuyos cuerpos neuronales residen en el ganglio geniculado, el 1/3 posterior de la lengua es inervado por el glossofaríngeo (IX) cuyos cuerpos neuronales residen en el ganglio petroso y finalmente el nervio vago (X) que inerva la región de la epiglotis y cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el ganglio nodoso. Las proyecciones axonales de dichas neuronas entran al tallo cerebral hasta llegar a la cara anterior del Núcleo del Tracto Solitario (STN) ubicado en la médula oblongada donde hacen la primera sinapsis (véase Fig. 2). Se ha determinado que hay neuronas en STN que mandan proyecciones axonales hacia el Núcleo Parabraquial (PBN) donde hacen su segunda sinapsis; también existen proyecciones axonales de las neuronas del STN hacia el tálamo, específicamente en el Núcleo Ventral Posteromedial en su porción parvo celular (VPMpc) [también llamado “tálamo gustativo”]. Desde el PBN las neuronas mandan múltiples proyecciones hacia: 1. la parte anterior de la corteza insular (IC) [también conocida como corteza gustativa primaria, ya que se piensa que ahí es donde se encuentran las representaciones o “engramas” de los estímulos gustativos], 2. al VPMpc, 3. al hipotálamo lateral (LH) y 4. La amígdala (AMY). Por otro lado, existen neuronas del VPMpc que mandan proyecciones hacia la corteza gustativa primaria. Se sabe que AMY e IC tienen proyecciones axonales recíprocas como una forma de comunicación directa, pero también se identificó que ambas estructuras mandan proyecciones axonales a la corteza prefrontal (PFC) donde pueden tener algún tipo de comunicación indirecta. En cuanto a las proyecciones entre AMY e IC, se ha demostrado que el subnúcleo central de la amígdala (CeA) manda sus proyecciones axonales hacia la corteza insular posterior (pIC) mientras que el subnúcleo basolateral de la amígdala (BLA) manda sus proyecciones hacia la corteza insular anterior (aIC) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gibbons & Sadiq, 2019; Molero-Chamizo & Rivera-Urbina, 2020; Wang et al., 2018; Yamamoto & Ueji, 2011).

Por otro lado, es importante explicar también algunas conexiones neuronales de los sistemas colinérgicos que se encuentran en el cerebro, pues se ha visto que

están implicados sobre la formación de la memoria gustativa (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; Gutiérrez, Téllez, et al., 2003). En el cerebro se encuentran dos sistemas colinérgicos: El primero está ubicado en el cerebro basal anterior (BF), un grupo de cinco núcleos morfológica y funcionalmente distintos dentro del cual se encuentra el núcleo basal magnocelular (MBn), que proyecta hacia la amígdala y la corteza cerebral, entre otras estructuras (Aitta-aho et al., 2018; Ferreira-Vieira et al., 2016; Liu et al., 2015). El segundo sistema colinérgico se encuentra ubicado en tallo cerebral entre el puente y mesencéfalo, y contiene el núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT). Las neuronas colinérgicas pertenecientes al PPT mandan proyecciones principalmente al tálamo, a la corteza y a la médula espinal, pero recientemente se ha visto que también mandan proyecciones hacia regiones específicas de la CeA; por otro lado, el grupo de neuronas pertenecientes al BF manda proyecciones principalmente a corteza insular, de forma importante a la AMY, entre otras estructuras (Ferreira-Vieira et al., 2016; Liu et al., 2015).



**Figura 2.** Esquema de las principales estructuras involucradas en el procesamiento de la información gustativa. STN: Núcleo del Tracto Solitario, PBN: Núcleo Parabraquial, VPMpc: Núcleo Ventral Posteromedial región parvocelular, LH: Hipotálamo Lateral, IC: Corteza Insular, AMY: Amígdala, PCF: Corteza Prefrontal, MBn: Núcleo Basal Magnocelular. Creado con BioRender.com.

## REPRESENTACIÓN CORTICAL Y AMIGDALINA DE LA MEMORIA GUSTATIVA SEGÚN SU VALOR HEDONICO

Múltiples estudios electrofisiológicos, así como inactivaciones temporales o lesiones permanentes de diferentes núcleos y tractos neuronales, han identificado las distintas estructuras del sistema nervioso central (SNC) que están involucradas en los diferentes tipos de aprendizaje y memoria que hemos mencionado. Estructuras como la AMY, IC, entre otras, tienen una participación para la adquisición y formación de la memoria gustativa (Núñez-Jaramillo et al., 2010). La IC es una estructura implicada en el procesamiento e integración de la información sensorial gustativa y se requiere para almacenar los engramas de la memoria gustativa (Yiannakas & Rosenblum, 2017). Por otro lado, la amígdala es una estructura conocida por participar en el procesamiento de emociones, especialmente aquellas relacionadas con el miedo (Liu et al., 2018), pero también juega un papel esencial en la formación de la memoria (p.ej. memoria del miedo, gustativa, etc.) (Basu et al., 2020).

En primer lugar, la IC está implicada en la conducta neofóbica, pues su inactivación transitoria o permanente la atenúa (Lin et al., 2018; Roman & Reilly, 2007), aunque parece no tener una participación relevante para evocar una memoria gustativa, es decir, una vez que el estímulo ya se ha familiarizado (Moraga-Amaro et al., 2014). Por lo tanto, el relevante papel que tiene la IC sobre la codificación del estímulo gustativo nos motiva a preguntarnos lo siguiente: ¿toda la información gustativa se codifica en distintas regiones de la IC? La evidencia acerca de una segregación espacial de las representaciones corticales en la IC en cuanto a las características intrínsecas de los estímulos gustativos (dulce, salado, amargo, ácido y umami) es contrastante y parece ser sensible al método utilizado (registros unitarios, quelantes de calcio fluorescentes, etc.). Por lo tanto, la presencia de un mapa “gustotópico” en la IC sigue siendo un tema controvertido (Chen et al., 2011). Sin embargo, una idea que ha recibido más apoyo experimental es la de una segregación espacial en IC dependiente del valor hedónico del estímulo gustativo.

En otras palabras, la activación de una región determinada de la IC determinará si un estímulo gustativo dado producirá preferencia o aversión (Accolla et al., 2007). Además, otros datos apuntan a que la actividad de neuronas localizadas en la aIC está encargada del procesamiento de estímulos gustativos apetitivos mientras que la actividad de la pIC se encarga del procesamiento de estímulos gustativos aversivos (Wang et al., 2018).

Además de mostrar que la representación de la valencia de un estímulo gustativo reside en la IC, anterior o posterior según su valor hedónico, otros estudios han evidenciado que esta representación cortical depende de la experiencia que ha tenido el sujeto con el estímulo. Por ejemplo, en el trabajo elaborado por Accolla y Carleton en el 2008 mediante imagenología óptica *in vivo*, se presentó un estímulo apetitivo (sacarina) con una posterior inyección intraperitoneal de LiCl a un primer grupo (grupo experimental), mientras que a un segundo se le presentó el mismo estímulo, pero con inyección intraperitoneal de solución salina (grupo control). Se observó que en el grupo experimental (sacarina + LiCl) la representación cortical de la sacarina mostraba un patrón similar a la de un estímulo gustativo amargo con un valor hedónico innatamente negativo como la quinina (Accolla & Carleton, 2008). En otras palabras, ambos estímulos se codificaban en la misma zona cortical; además de que los animales mostraron un comportamiento de evitación a la sacarina, es decir, francamente aversivo. En el grupo control (sacarina + sol. salina) la presentación del estímulo gustativo generó una representación cortical cuyo patrón era diferente al de un estímulo innatamente aversivo; además, conductualmente, los animales mostraron la preferencia clásica por la sacarina. Adicionalmente, los autores permitieron que un grupo previamente condicionado (sacarina + LiCl) extinguiera esta asociación; por lo que tras nueve días de ofrecer sacarina sin aplicar LiCl, evaluaron nuevamente la representación cortical de los estímulos. Interesantemente, observaron que el patrón cortical generado por la sacarina, previamente condicionada pero ahora extinguida, era diferente del de la quinina (Accolla & Carleton, 2008). Estos experimentos sugieren que la representación cortical de un estímulo no es estática, sino que depende de la experiencia que tenga

el sujeto con el estímulo, por lo que agrega más evidencia al componente plástico de la información que reside en la IC.

Respecto a la amígdala, también se le ha implicado una participación para la formación de memorias gustativas. Por ejemplo, mediante inactivación farmacológica de la BLA, la respuesta neofóbica se ve parcialmente afectada (Lin et al., 2018; Shinohara & Yasoshima, 2019). También se ha visto que, mediante lesiones químicas de distintos subnúcleos de AMY, la amígdala basolateral (BLA), pero no la amígdala central (CeA), se retrasa la atenuación de la neofobia, sugiriendo una afectación en la adquisición de nueva información de estímulos gustativos (Andre & Reilly, 2007). Por otro lado, también se ha sugerido que distintos subnúcleos de la amígdala tienen una participación sobre el procesamiento del estímulo gustativo. Por ejemplo, en el trabajo de Wang y colaboradores del 2018 encontraron que la aIC y la pIC proyectaban a la BLA y la CeA respectivamente. Además, mediante optogenética, encontraron que BLA tenía una participación sobre el procesamiento de la información para los sabores con un valor hedónico positivo mientras que la CeA para los sabores con un valor hedónico negativo (Wang et al., 2018). Lo anterior sugiere una segregación funcional, BLA o CeA, según el valor hedónico del estímulo gustativo. Sin embargo, no solo es necesaria la actividad de BLA y CeA de forma independiente, sino que se ha visto que es necesaria la interacción entre AMY e IC para que se forme una memoria gustativa. Por ejemplo, mediante el uso de vectores virales retrógrados se lograron identificar las proyecciones en aIC provenientes de la BLA las cuales, mediante inhibición quimiogénica, se demostraron ser necesarias para la formación de la memoria gustativa (Kayyal et al., 2019). Así también, mediante la activación de receptores hM3Dq, un receptor de diseño activado exclusivamente por drogas de diseño (DREADDs, por sus siglas en inglés), se encontró que la codificación de la información en la IC está regulada por la interacción entre la IC y BLA (Abe et al., 2020).

En resumen, la IC y AMY son estructuras implicadas en la formación de una memoria gustativa. Aunque la IC parece tener una segregación espacial y funcionalmente según el valor hedónico del estímulo, es posible que la AMY pueda presentar esta misma segregación aunque todavía no se ha demostrado ya que la mayoría de estudios han sido principalmente enfocados a la BLA (Abe et al., 2020; Kayyal et al., 2019; Lin et al., 2018), relegando la CeA por su aparente falta de participación durante la formación de una memoria, específicamente hablando del CAS e inhibición latente (Andre & Reilly, 2007). Además, tanto la IC como AMY parecen estar estrechamente relacionadas en cuanto memoria gustativa se refiere y parece existir una conexión según sea un estímulo con valor hedónico negativo (pIC-CeA) o positivo (aIC-BLA).

## SISTEMA COLINÉRGICO Y SUS FUNCIONES

El sistema colinérgico (compuesto por la palabra “colina” y el sufijo griego “ergos” [obra], es decir, “obra de la colina”) involucra a aquellas neuronas que sintetizan y liberan acetilcolina (ACh), además de una infinidad de otras células como las gliales musculares y glandulares, que responden a este neurotransmisor. Este sistema se ha visto implicado en múltiples funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) como memoria (Arieli et al., 2020), atención (Canolty & Knight, 2010; Holloway et al., 2020; Howe et al., 2017), sueño (Nikonova et al., 2017; Niwa et al., 2018), regulación del estrés y emociones (Arias et al., 2021).

La ACh se sintetiza en las neuronas a partir de la transferencia de *acetil coenzima A* (suministrada por la mitocondria) a la *colina* (obtenida principalmente de la dieta) gracias a la enzima *colin acetiltransferasa*. Una vez formada, la ACh se almacena en vesículas presinápticas en espera de la despolarización de la neurona para su liberación a la hendidura sináptica. (H. Ferreira-Vieira et al., 2016). Cuando aumenta su concentración en el espacio sináptico, la ACh puede activar a los receptores nicotínicos (nAChR's), que son canales iónicos activados por ligando o

bien activar a los receptores muscarínicos (mAChR's), que son receptores acoplados a proteína G.

Hay diferentes subtipos de mAChR's los cuales han sido designados como M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> y están ampliamente distribuidos en el cerebro. Los receptores M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> son receptores acoplados a proteína G<sub>q/11</sub>, usualmente postsinápticos, donde generalmente tienen un efecto excitador al promover la activación de cinasas y la liberación de calcio desde pozas internas; mientras que los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> son receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, usualmente presinápticos, donde actúan como autorreceptores, inhibiendo la liberación de ACh por retroalimentación negativa (Chen et al., 2016; Ferreira-Vieira et al., 2016; Knox, 2016; Lebois et al., 2018).

Generalmente los nAChR's se encuentran en la unión neuro muscular, mientras que los mAChR se encuentran principalmente en el SNC y sistema nervioso autónomo (Migirov & Datta, 2020). Aun así, existen diferentes tipos de nAChR's que se pueden encontrar en el cerebro: Tipo IA, que consiste en cinco subunidades  $\alpha_7$ ; tipo II, que consiste en subunidades  $\alpha_4\beta_2$ ; tipo III, el cual consiste en subunidades  $\alpha_3\beta_4\beta_2$ ; y el tipo IV, que consiste en subunidades  $\alpha_2\beta_4/\alpha_2\beta_4$  (Myslivecek, 2021). La gran mayoría de estos nAChR's cerebrales son presinápticos por lo que tienen la función de modular la liberación de otros neurotransmisores, como glutamato, ante respuestas centrales (Dani, 2015; Taylor, 2012). Sin embargo, también existen nAChR's postsinápticos y somáticos que despolarizan neuronas (p.ej. dopaminérgicas) llevando a una mayor activación del potencial de acción (Dani, 2015).

Dicho lo anterior, nos enfocaremos en los mAChR's ya que son de nuestro interés, pues se ha visto que el bloqueo de los receptores muscarínicos en la AMY o IC interfiere con la formación de la memoria gustativa (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003; Morin et al., 2021). Estudios previos han demostrado, mediante inmunohistoquímica, la presencia de mAChR's en la AMY (McDonald & Mascagni,

2010, 2011). En la BLA se identificó una alta densidad de receptores de tipo M<sub>1</sub> que se encuentran exclusivamente en neuronas piramidales (glutamatérgicas). También se detectó inmunoreactividad en otras áreas de la AMY, aunque de forma más difusa y menos densa (McDonald & Mascagni, 2010). Por otro lado, el mismo grupo de trabajo, logró identificar la presencia de receptores de tipo M<sub>2</sub> con una mayor densidad neuropilar en la porción anterior de la BLA y CeA medial (CeM) que en el resto de la AMY. Además, de forma escasa se encontraron mAChR's en cuerpos neuronales. Cabe resaltar que los receptores M<sub>2</sub>, tanto cuerpos neuronales como neuropilo, fueron identificados como neuronas GABAérgicas (McDonald & Mascagni, 2011).

Particularmente numerosos estudios han demostrado, mediante diversas aproximaciones metodológicas y en una gran diversidad de especies, que la activación del sistema colinérgico central facilita el aprendizaje y formación de la memoria, mientras que su inhibición provoca cuadros amnésicos. Por ejemplo, Gil-Bea y colaboradores, realizaron la infusión intracerebro-ventricular de la inmunotoxina saporina 192 IgG, la cual daña selectivamente a las neuronas colinérgicas septum medial, las cuales mandan sus proyecciones principalmente al hipocampo, estructura relacionada con la formación de memoria. Observaron que, en comparación con los controles, las ratas con esta lesión realizaron más intentos y de mayor duración en aprender la tarea del laberinto acuático de Morris, sugiriendo afectación en la adquisición y consolidación de la memoria (Gil-Bea et al., 2011).

Por otro lado, Jiang y colaboradores realizaron una tarea de miedo condicionado tono-electrochoque (una asociación entre el tono [CS] con el electrochoque [US]) en donde mediante optogenética sobre-activaron o inhibieron las proyecciones colinérgicas en la BLA provenientes del NBm durante la etapa de condicionamiento. Observaron que al sobreactivar la proyección NBm-BLA, esta asociación CS-US tarda más días en extinguirse por completo; además, no se observaron diferencias entre control y sujetos experimentales durante la adquisición o evocación de la memoria. Mientras que cuando se inhibe la BLA, se observó una

afectación negativa de la adquisición y evocación, no así la extinción. Entonces se sugiere que la señalización colinérgica está implicada no solo en la adquisición, sino también en la evocación y extinción de la memoria (Jiang et al., 2016).

Adicionalmente, en el estudio de Aitta-aho y colaboradores lograron, mediante novedosas técnicas inmunohistoquímicas y optogenéticas, identificar aferencias axonales de neuronas colinérgicas del BF y el PPT hacia la AMY y de qué forma cada aferencia tiene un impacto diferencial sobre la conducta. Respecto a las neuronas colinérgicas del BF, este grupo de trabajo demostró que las proyecciones hacia la amígdala eran esencialmente hacia la amígdala basal (BL) y CeM y que la activación de dichas proyecciones promueve conductas de aproximación o apetitivas; mientras que las neuronas colinérgicas del PPT mandan sus proyecciones hacia la amígdala central lateral (CeL) y su activación promueve conductas de alejamiento o aversivas, que además perduran en el tiempo (Aitta-aho et al., 2018).

Otro aspecto del sistema colinérgico es que se le ha relacionado con la detección de la novedad de un estímulo; es decir, se ha visto que la ACh aumenta cuando un estímulo es novedoso, no así cuando es familiar. En un estudio mediante microdiálisis en la CI, reporta que los niveles de ACh aumentan significativamente ante un estímulo gustativo novedoso sin importar que tenga un valor hedónico positivo (sacarina) o tenga un valor hedónico negativo (quinina). Posteriormente, cuando el estímulo se volvió familiar, los niveles de ACh regresaron a los valores basales (Miranda et al., 2000)

La detección de novedad, mediante la actividad de ACh, tiene suma importancia para la formación de la memoria gustativa como observaron Gutiérrez y colaboradores en el 2003. En este trabajo evaluaron el efecto de la infusión de escopolamina, antagonista muscarínico, o vehículo en la IC sobre la tarea de AN. Observaron que la infusión del fármaco 20 minutos antes o hasta 2 horas después del sabor novedoso, inhibe la AN imposibilitando la familiarización con el estímulo

gustativo. En otras palabras, la ACh en IC permite la formación normal de la memoria gustativa, y bloquear su efecto impide la correcta adquisición y consolidación de esa información (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003).

En suma, el sistema colinérgico involucra aquellas neuronas que liberan y responden a la ACh; en el cerebro, los mAChR's están esencialmente involucrados en plasticidad y la memoria. El sistema colinérgico está involucrado en múltiples funciones como el ciclo sueño-vigilia, la atención y el aprendizaje y la memoria, entre otros. Se ha demostrado que algunas estructuras como la AMY y la IC están críticamente implicadas en el aprendizaje y memoria gustativos mediante experimentos que han manipulado la señal colinérgica. Diferentes subnúcleos de la AMY, específicamente BLA, cuenta con una alta densidad de mAChR's tipo M1 en los somas de neuronas principales; mientras que los M2 se encuentran abundantemente en el neuropilo de neuronas GABAérgicas en BLA y CeM. Por último, la actividad colinérgica sobre distintos subnúcleos de la AMY parece tener una actividad conductual diferencial.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se sabe que la AMY es una de las principales estructuras implicadas en la formación de la memoria gustativa. Además, se ha encontrado que los subnúcleos de dicha estructura, BLA y CeA, están involucradas de forma diferencial en el procesamiento de estímulos gustativos con valor hedónico opuesto. La AMY, que cuenta con abundantes mAChR's, recibe proyecciones desde las neuronas colinérgicas ubicadas en el BF y del PPT. Los dos sistemas colinérgicos en el cerebro tienen una participación diferencial sobre la conducta, el BF relacionándose con conductas apetitivas o de acercamiento mientras que el PPT promoviendo conductas aversivas o de alejamiento. Sin embargo, se desconoce el papel de los mAChR's de la AMY en la formación de memoria gustativa apetitiva, durante la atenuación de la neofobia.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué función tienen los mAChR's de la BLA y CeA, en la formación de la memoria gustativa durante la AN?

## OBJETIVOS

- **Principal:** Determinar la función de los mAChR's en la BLA y la CeA durante la tarea de AN utilizando una aproximación farmacológica con escopolamina, bloqueador de mAChR's y oxotremorina, agonista de mAChR's.
- **Particulares:**
  - 1.- Determinar la función de los mAChR's de la BLA en la adquisición y consolidación, mediante la infusión de escopolamina inmediatamente antes de un sabor novedoso.
  - 2.- Determinar la función de los mAChR's de la CeA en la adquisición y consolidación, mediante la infusión de escopolamina inmediatamente antes de un sabor novedoso.
  - 3.- Determinar la función de los mAChR's de la BLA en la adquisición y consolidación, mediante la infusión de oxotremorina inmediatamente antes de un sabor novedoso.

## HIPÓTESIS

- **Hipótesis 1:** La inhibición de receptores muscarínicos en BLA impedirá la formación de una memoria apetitiva durante la tarea de AN.

- **Hipótesis 2:** La inhibición de receptores muscarínicos en CeA no afectará la formación de una memoria apetitiva durante la tarea de AN.
- **Hipótesis 3:** El agonismo de receptores muscarínicos en BLA promoverá una mayor AN que los controles evidenciando una formación de memoria apetitiva más eficaz.

## METODOLOGÍA

### Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 250 – 300 g como sujetos experimentales. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los sujetos fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina y aclimatados en el vivario de nuestro laboratorio durante una semana. Las condiciones del bioterio se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12h x 12h con una temperatura ambiental de 24 °C durante todo el experimento. A los sujetos se les ofreció agua y alimento *ad libitum* hasta antes de iniciar las pruebas de conducta.

### Cirugía

Una vez cumplido el periodo de aclimatación, los sujetos fueron anestesiados con una mezcla de xilacina (10mg/Kg) y ketamina (100mg/Kg) para iniciar el procedimiento quirúrgico. Se corroboró que los sujetos presentaran una anestesia eficaz e inmediatamente fueron montados en un aparato de cirugía estereotáxica para rata (Lab Standard Stereotaxic Instrument, Stoelting C.O.). Enseguida se aplicó una inyección de metamizol (20 mg/10 mL) a una dosis de 2mg/Kg, s.c., y se aplicaron 30 UI de lidocaína/epinefrina (20mg/0.005mg/mL) en el sitio de incisión para disminuir dolor, edema y sangrado. La cirugía inició con una incisión cutánea anteroposterior de 2 cm sobre la cabeza de la rata hasta exponer el cráneo. Posteriormente el cráneo fue trepanado mediante el uso de un taladro quirúrgico por encima de las estructuras de interés. Se colocaron cánulas intracerebrales,

fabricadas a partir de agujas de 23G, de 14 mm (para AMY o CeA) o 14.5 mm (para BLA) de largo, quedando fijas 1 mm por arriba de la estructura de interés. Las coordenadas utilizadas para AMY y CeA fueron las siguientes: AP: -2.8 mm de bregma; L:  $\pm 4$  mm de bregma, DV: -8 mm de la superficie externa del cráneo; y para la BLA: AP: -2.8 mm de bregma; L:  $\pm 5$  mm de bregma, DV: -8.5 mm de la superficie externa del cráneo. Se colocaron estiletes dentro de ambas cánulas para evitar la formación de coágulos que obstruyeran las mismas. Las cánulas fueron fijadas al cráneo usando un tornillo de acero inoxidable con acrílico dental encima. Finalmente se aplicó antibiótico profiláctico (penicilina) de forma tópica para evitar infecciones postoperatorias. Tras la cirugía se dejó que los sujetos se recuperaran en cajas individuales por una semana.

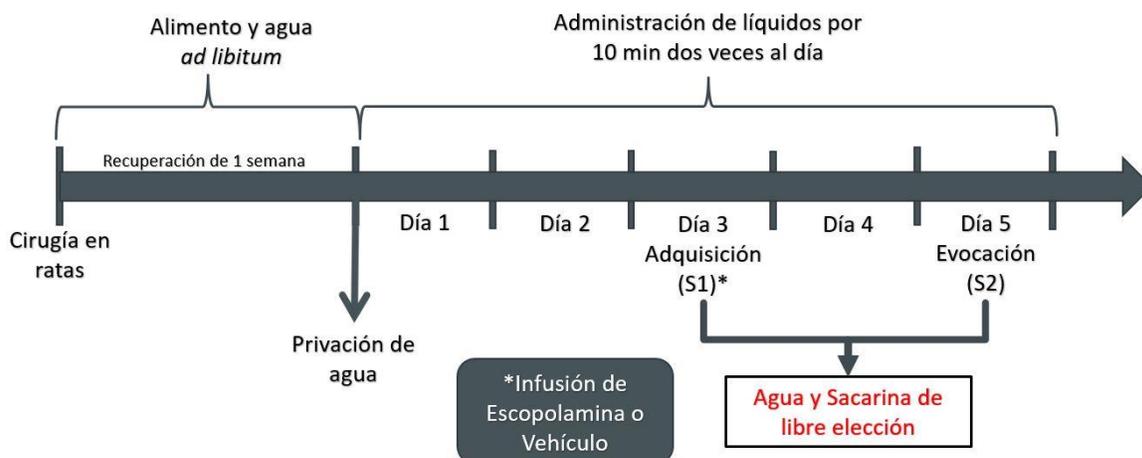
### Pruebas conductuales

Las pruebas de conducta se llevaron a cabo en un cuarto aislado del ruido exterior. Se utilizaron cajas de acrílico con un tamaño de 53 x 43 x 20 cm a las que se les colocaron 10 bebederos (5 en cada extremo de la caja) de 3 ml cada uno, los cuales se encontraban fijos en dos barras de acrílico ubicadas en los extremos laterales de la caja (Figura 3).



**Figura 3.** Caja de conducta con los bebederos fijos en barras de acrílico.

Para las pruebas conductuales, se incluyeron los grupos que fueron infundidos con escopolamina (Sigma) o vehículo (sol. salina 0.9%) y otro grupo de sujetos sin operar (naive) que no fueron infundidos. Una vez finalizado el periodo de recuperación, los sujetos fueron privados de agua la tarde anterior al inicio del experimento (día 0). A partir del primer día en adelante a cada sujeto se le ofreció ingesta de líquidos únicamente en dos sesiones al día, mañana y tarde, durante 10 minutos por sesión. En los primeros dos días, es decir, durante la habituación, se colocaron 3 mL de agua en cada bebedero (30 mL en total repartidos en los diez bebederos). Al terminar el tiempo de ingesta de líquidos, los sujetos eran regresados a sus cajas individuales en el vivario. El tercer día por la mañana, (adquisición; S1), se les ofreció el sabor novedoso (sacarina 0.3%, Sigma-aldrich) repartido de forma semi-aleatoria en cinco de los bebederos, mientras que los otros cinco contenían agua; ese mismo día en la tarde se volvió a ofrecer solo agua. El cuarto día se les ofreció solo agua tanto en la mañana como en la tarde. El quinto día se realizó la evocación (S2) ofreciendo agua y sacarina en las mismas condiciones que en S1. Se muestra una línea de tiempo donde se resume esta información (Figura 4).



**Figura 4.** Línea de tiempo donde se resume el diseño experimental.

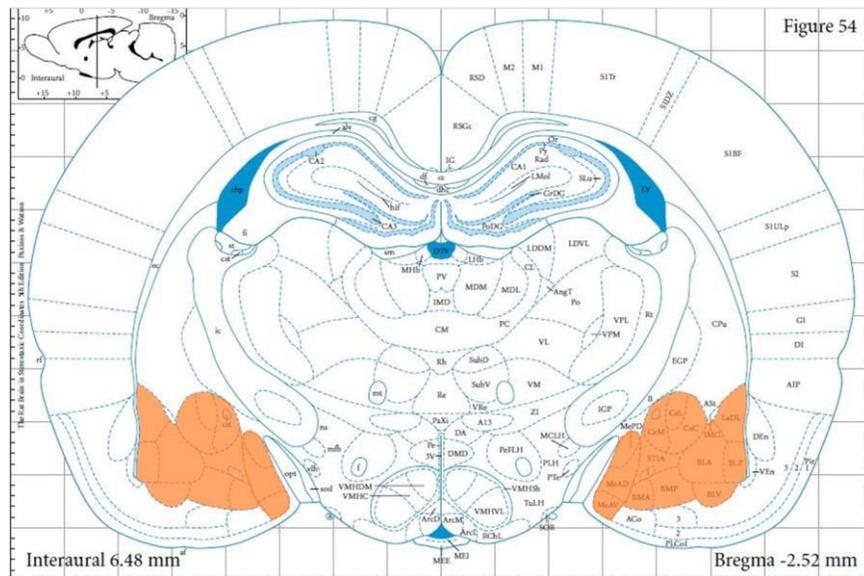
## Fármacos e Infusión

Los fármacos utilizados fueron escopolamina, antagonista no selectivo de los mAChR's, a una concentración de 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y oxotremorina, agonista no selectivo de los mAChR's, a una concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Con los inyectores previamente insertados en las cánulas guía, se infundió la escopolamina o vehículo cinco minutos antes de exponer a los sujetos al sabor novedoso (S1). Los inyectores, cuya longitud era de 15 mm (para AMY y CeA) o 15.5 mm (para BLA), estaban conectados mediante un tubo de polietileno a microjeringas de 10  $\mu\text{L}$  (Microliter syringes 700, Hamilton Bonaduz AG) montadas en una bomba de infusión (Dual syringe infusion pump, Stoelting C.O.). Se infundió un volumen total de fármaco (escopolamina u oxotremorina) o vehículo de 1  $\mu\text{L}$  (para AMY) o 0.3  $\mu\text{L}$  (para CeA o BLA) en cada hemisferio a lo largo de tres minutos. Además, se dejaron los inyectores dentro de las cánulas dos minutos más para permitir la difusión adecuada del fármaco.

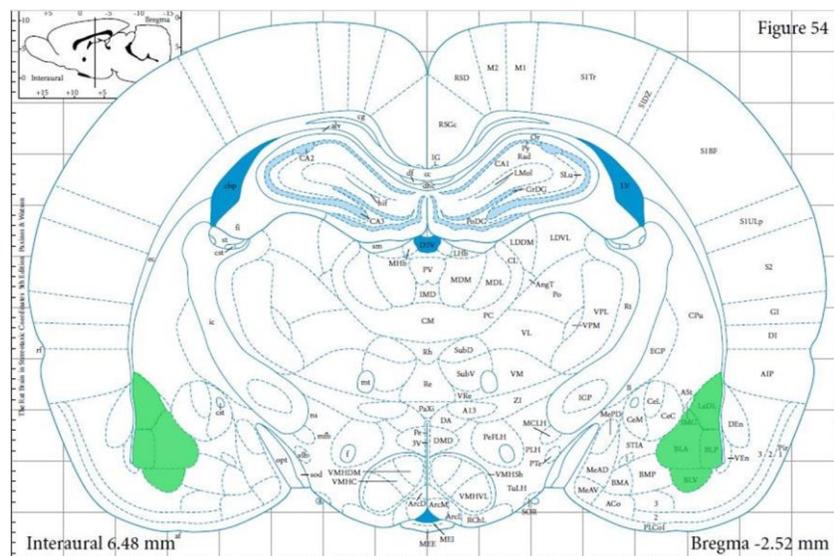
## Histología

Una vez terminadas las pruebas conductuales los sujetos fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos intracardialmente con solución salina al 0.9% seguido de una solución de paraformaldehído 4%. Posteriormente los sujetos fueron decapitados y se extrajeron los cerebros para ser almacenados en solución crioprotectora de PBS 0.1M con sacarosa al 30%. A los cerebros se les realizaron cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor en un crióstato. Los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio cubiertos de gelatina y teñidos con la técnica de Nissl. Solo aquellos sujetos que presentaron las puntas de los inyectores dentro de las estructuras indicadas, AMY (Figura 5), BLA (Figura 6) o CeA (Figura 7), fueron incluidos en el análisis estadístico. Se utilizó un atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata como referencia para ubicar las puntas de los inyectores. La extensión de AMY abarca desde -1.52 mm hasta -3.96 mm posterior a bregma (CeA desde -1.52 mm hasta -3.0 mm; mientras que BLA va

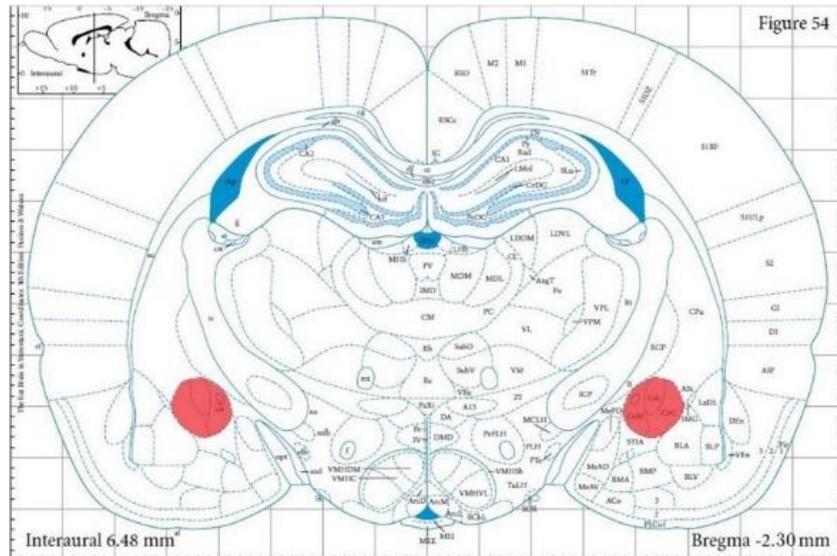
desde -1.72 mm hasta -3.96 mm) y su profundidad dorsoventral se puede ubicar entre -8.0 mm y -9.0 mm desde la superficie del cráneo, ubicadas a partir de un atlas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2004).



**Figura 5.** El área anaranjada indica el sitio de AMY



**Figura 6.** El área verde indica el sitio de BLA



**Figura 7.** El área roja indica el sitio de CeA

## Análisis estadístico

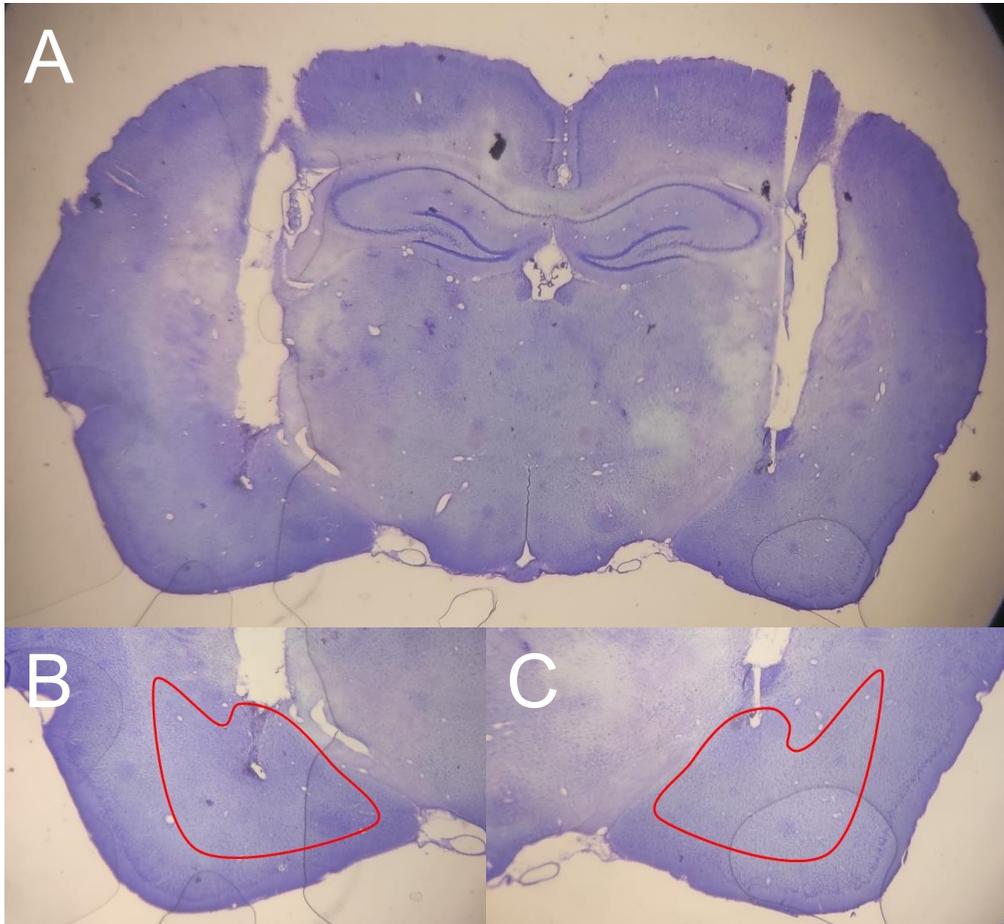
Se registró la cantidad en mililitros (mL) de agua y sacarina que consumió cada sujeto en cada sesión a lo largo del experimento, con una precisión de  $\pm 0.1$  mL. Los datos se recopilaron en *Excel* en donde se obtuvo el consumo total y de sacarina, así como el índice de preferencia (I.P.) de cada sujeto, el cual se obtuvo mediante la siguiente formula:  $I.P. = [\text{Volumen de Sacarina} / (\text{Volumen Sacarina} + \text{Agua})] \times 100$ . Posteriormente, los datos expresados en IP se analizaron en el software estadístico *Graph Pad Prism 9*. Para el primer experimento donde buscamos identificar la concentración de sacarina con mayor utilidad para nuestro modelo experimental utilizamos una prueba de *t* pareada para la concentración de sacarina 0.1% y otra para la concentración de 0.3%. Posteriormente, para el resto de los experimentos, se utilizaron análisis de varianza factorial de dos vías (2w-ANOVA) mixto, y realizando correcciones post-hoc (Sidak) donde era apropiado.

Los factores intra-grupo están constituidos por un mismo grupo que en la misma condición, experimental o control, fue evaluado en múltiples ocasiones a través del tiempo; mientras que los factores inter-grupo son aquellos que con diferente condición fueron comparados en el mismo punto en el tiempo. Las diferencias de medias entre grupos con  $p < 0.05$  fueron consideradas significativas. Los IP's y en su caso el consumo en volumen fue graficado como media + error estándar.

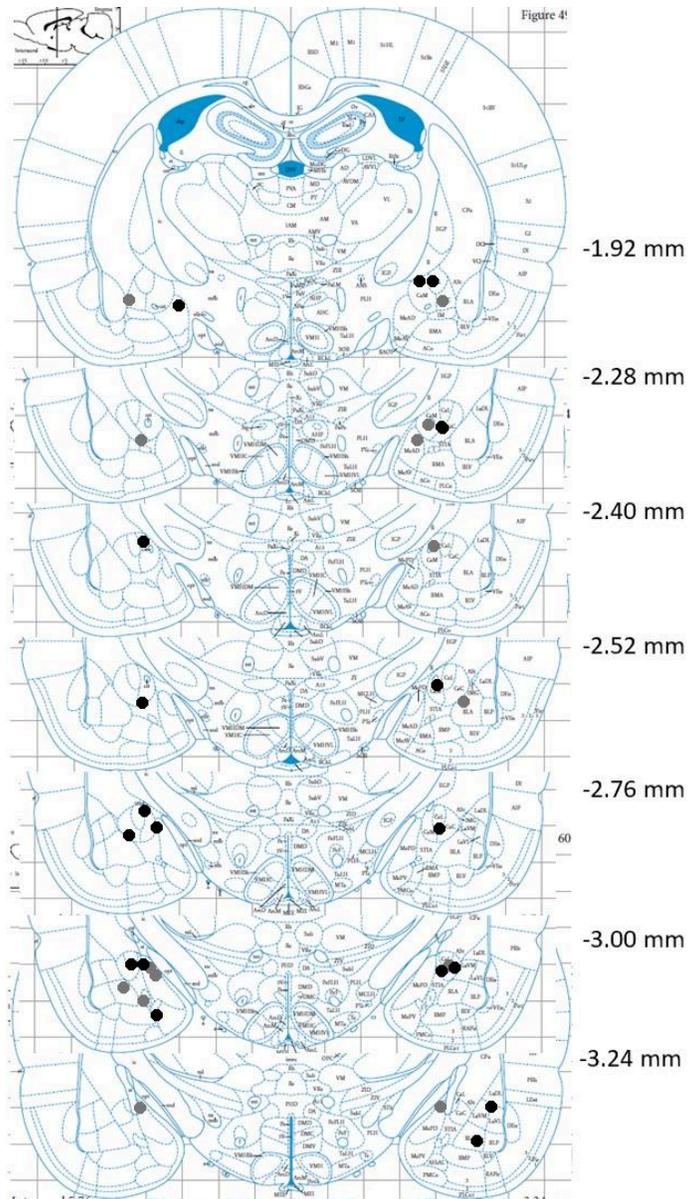
## **RESULTADOS**

### **Histología**

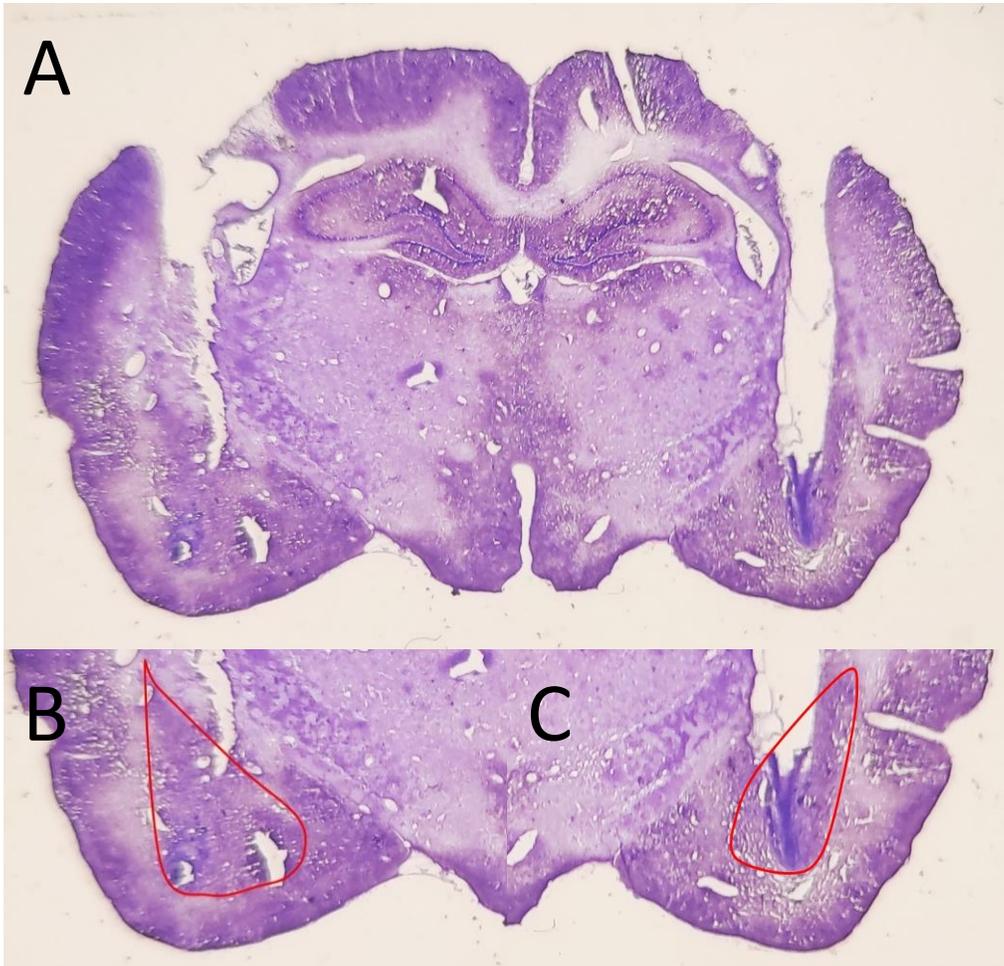
En el análisis de datos únicamente se incluyeron aquellos sujetos en donde ambas puntas del inyector se localizaron dentro de la estructura de interés señaladas en las figuras 5 a 7. Se excluyeron los datos de aquellos sujetos en donde solo uno o ningún inyector se encontró dentro del área de interés. En las figuras 8 a 11 se muestran representaciones esquemáticas de los cerebros de sujetos cuyos inyectores se hallaron dentro de la zona de interés y que fueron incluidos en el análisis estadístico.



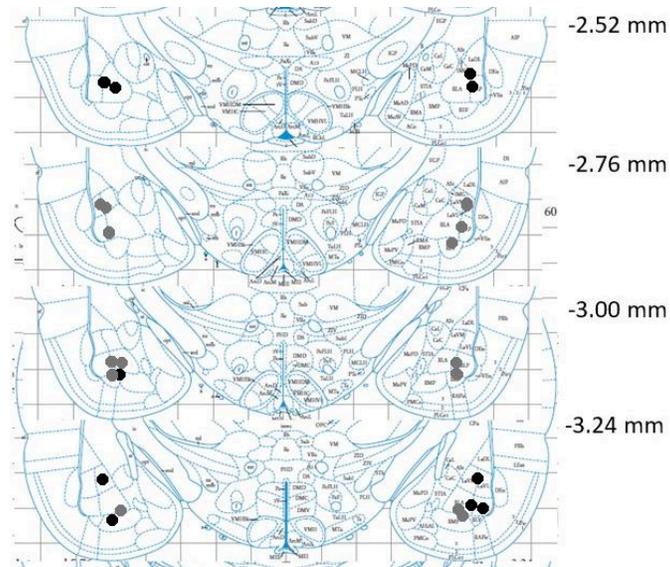
**Figura 8.** Fotografía estereoscópica de un cerebro de rata tras haber sido procesado por la tinción de Nissl. A, corte coronal de un cerebro de rata con evidencia de ambas cánulas e inyectores. B y C, línea roja delimita la zona de la amígdala total donde se evidencian los inyectores dentro de dichas zonas.



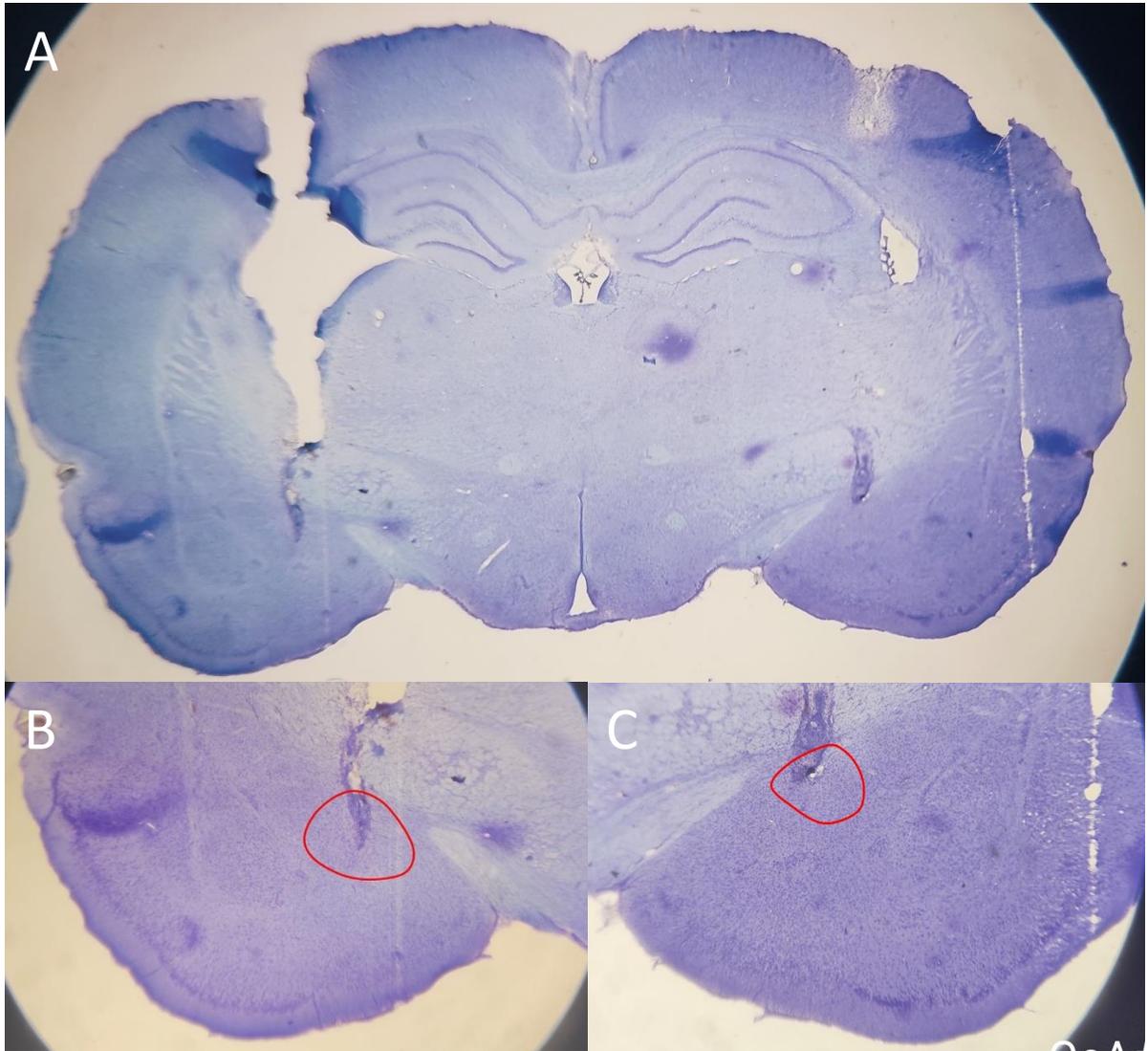
**Figura 9.** Puntas de inyectores dentro del área de AMY en sujetos que recibieron infusión de escopolamina. ● = Vehículo, ● = Escopolamina



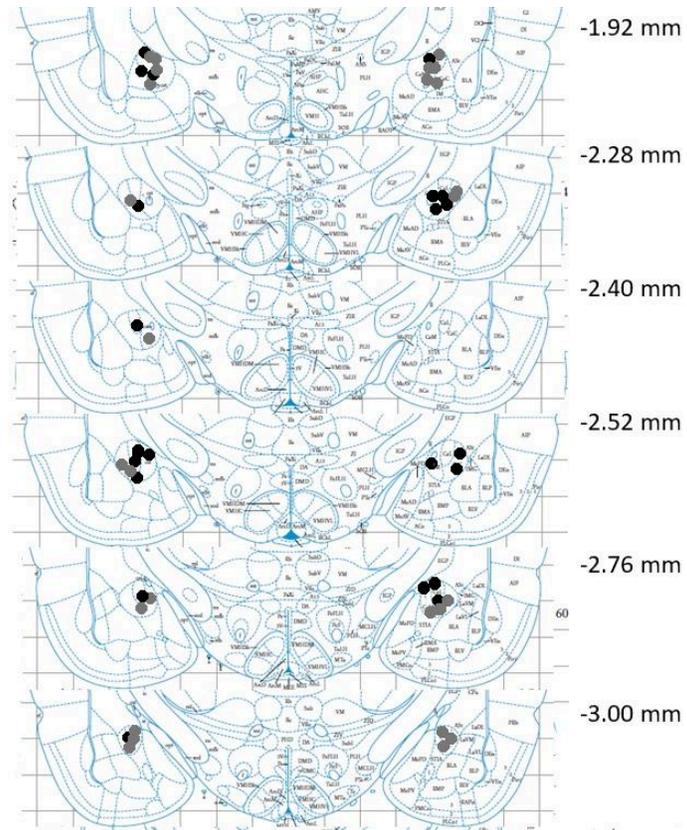
**Figura 10.** A, ejemplo de un cerebro con corte coronal con evidencia de ambas cánulas e inyectores. B y C, línea roja delimita la zona de la BLA y se evidencian los inyectores dentro de dichas zonas.



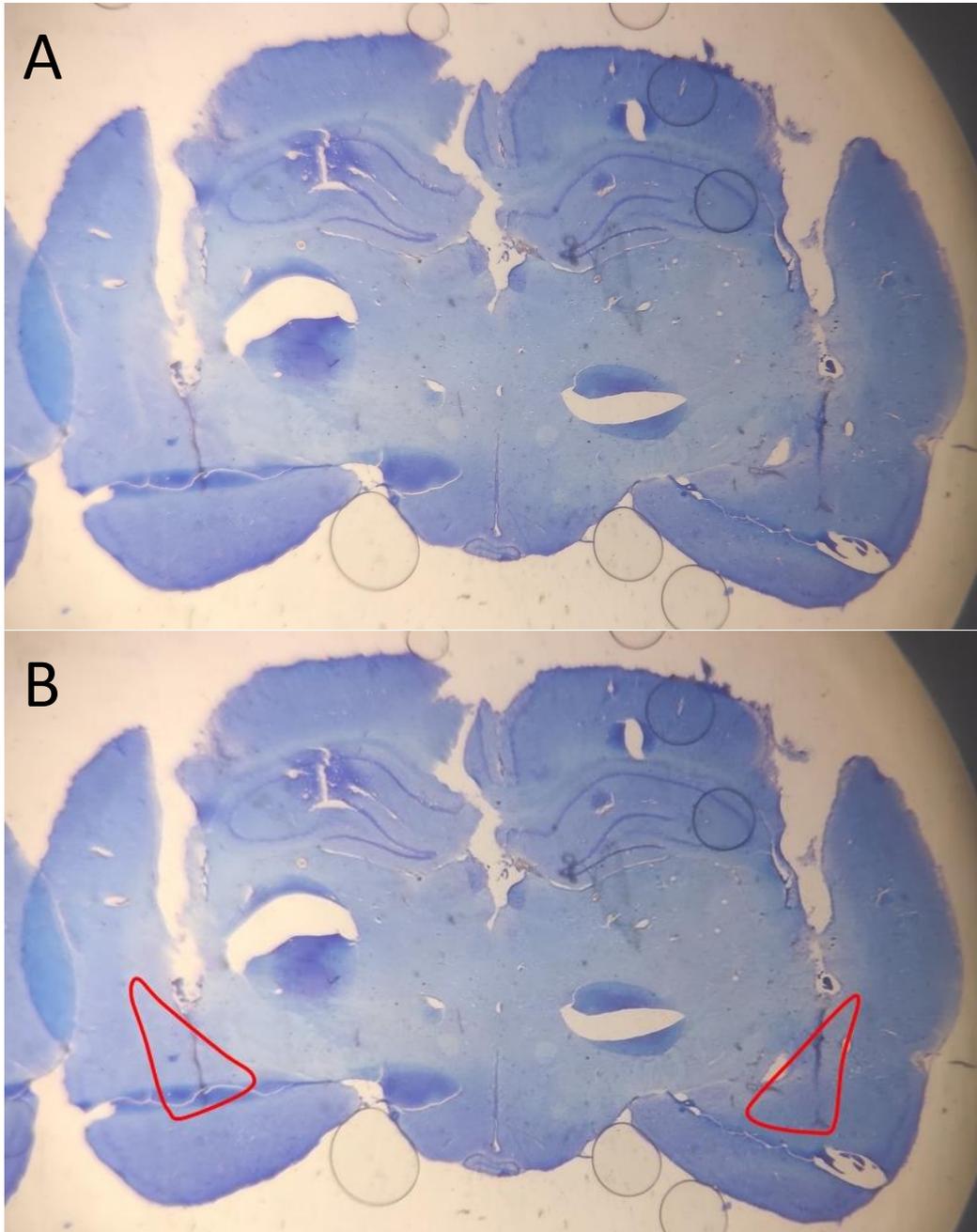
**Figura 11.** Puntas de inyectores dentro del área de BLA en sujetos que recibieron infusión de escopolamina. ● = Vehículo, ● = Escopolamina



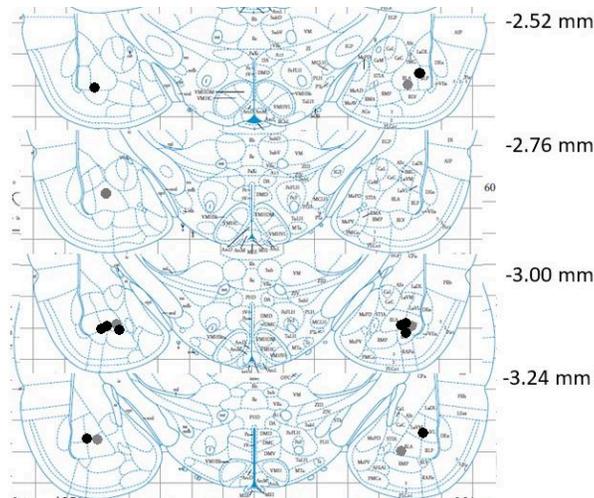
**Figura 12.** A, ejemplo de un cerebro con corte coronal con evidencia de ambas cánulas e inyectores. B y C, línea roja delimita la zona de CeA y se evidencian los inyectores dentro de dichas zonas.



**Figura 13.** Puntas de inyectores dentro del área de CeA en sujetos que recibieron infusión de escopolamina. ● = Vehículo, ● = Escopolamina



**Figura 14.** A, evidencia de un cerebro con corte coronal con ambas cánulas e inyectores. B, línea roja delimita la zona de BLA y se evidencian los inyectores dentro de dichas zonas, donde se hizo la infusión de oxtremorina.

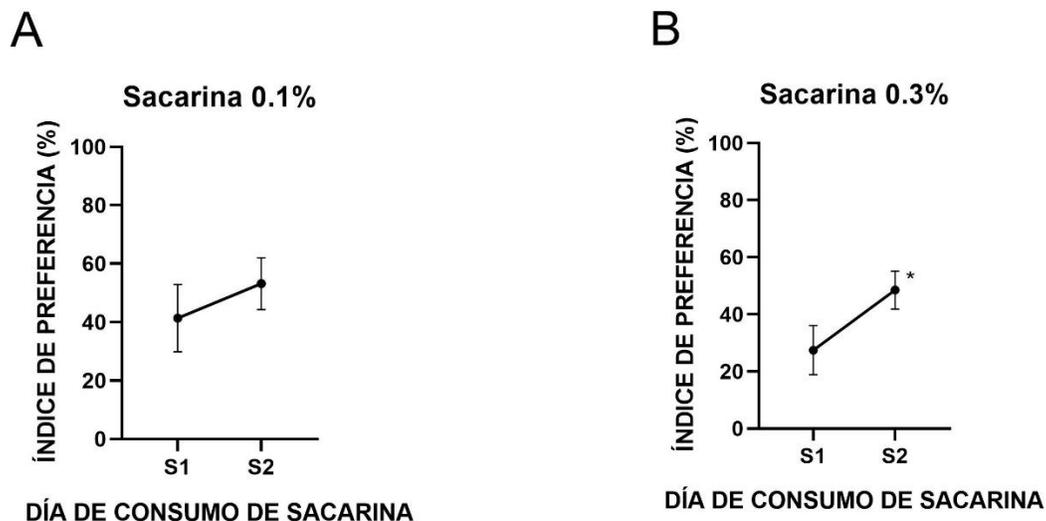


**Figura 15.** Puntas de inyectores dentro del área de BLA en sujetos que recibieron infusión de oxotremorina. ● = Vehículo, ● = Oxotremorina

## Atenuación de la neofobia (AN) con distintas concentraciones de sacarina

En primer lugar, se determinó la curva de AN para distintas concentraciones de sacarina bajo nuestras condiciones experimentales. La primera concentración, 0.1%, aunque se considera una baja concentración, todavía es perceptible por los sujetos y es utilizada principalmente en experimentos de CAS (García et al., 1955; Gutiérrez, Téllez, et al., 2003). La segunda concentración, 0.3%, se considera una concentración altamente preferente por los sujetos experimentales (Mickley et al., 2005). Decidimos evitar usar concentraciones mayores, de 0.5% en adelante, ya que éstas provocan una respuesta de rechazo o aversión (Ramos, 2020; Stehberg et al., 2011) y la finalidad de nuestro trabajo es generar una AN para el segundo día de consumo lo cual sería difícil de lograr con una solución aversiva. Con base en lo anterior, este primer experimento se conformó de dos grupos diferentes: El primero al que se le ofreció sacarina 0.1% (n=5) y un segundo al que se le ofreció sacarina 0.3% (n=5). Los resultados obtenidos fueron sometidos a una prueba de *t* pareada para determinar si existe AN con las distintas concentraciones de sacarina. El grupo al que se le ofreció sacarina 0.1% no evidenció una AN [( $t=0.96$ ,  $df=4$ ),  $p > 0.05$ ],

sin embargo, el grupo que se le dio sacarina a una concentración de 0.3% si se logró demostrar la AN [(t=4.36, df=4), p < 0.05]. Los resultados obtenidos del grupo sacarina 0.1% y 0.3% fueron graficados en la figura 12, A y B respectivamente. Con estos resultados evidenciamos que la sacarina a una concentración de 0.3% es la más adecuada para poder demostrar AN con la técnica de múltiples bebederos (véase Fig. 3).

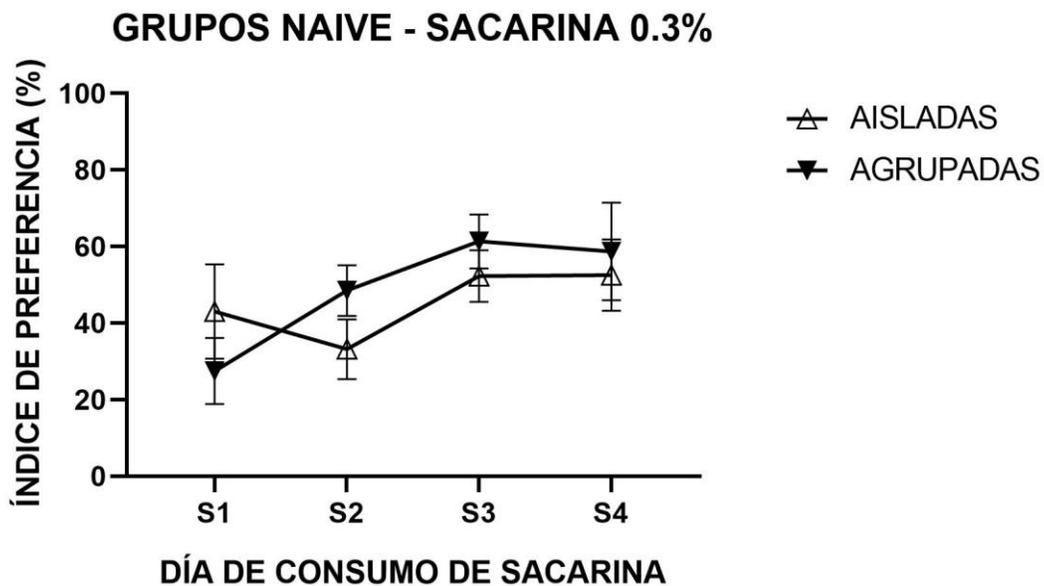


**Figura 16.** Índice de preferencia en sujetos según la concentración de sacarina. Al grupo que se le ofreció sacarina al 0.1% (**A**) no demostró AN [(t=0.96, df=4), p > 0.05], mientras que el grupo que se le ofreció sacarina al 0.3% (**B**) si se logró evidenciar AN [(t=4.36, df=4), \*p < 0.05].

## Consumo de sacarina en animales agrupados y aislados

Por otro lado, como se mencionó en el apartado de métodos, las ratas se mantuvieron en cajas individuales y de forma aislada después de la cirugía, manteniéndose así hasta el último día del experimento para finalmente ser perfundidas, es decir, los sujetos tras la cirugía no volvieron a estar en contacto entre ellos. Se decidió tomar esta medida ya que, de lo contrario, los sujetos tendían a morderse o lastimarse sus heridas quirúrgicas y cánulas entre ellos. Por otro lado, se sabe que el aislamiento social en ratas provoca cambios de comportamiento como depresión, estrés o agresividad (Dandekar et al., 2009; Myslivecek, 2021;

Ros-Simó & Valverde, 2012). Por lo anterior evaluamos si este aislamiento social de aproximadamente 2.5 semanas, en ratas no operadas (Naive) afecta la preferencia de sacarina. Para este experimento incluimos un grupo de sujetos agrupados (n=5) y sujetos aislados (n=5), es decir, los primeros se encontraban en una caja grande grupal, mientras que los segundos se mantuvieron en cajas individuales durante todos los días que duró el experimento. La duración del experimento fue de cuatro días de consumo de sacarina para poder evaluar si existía una correcta AN demostrando el consumo asintótico de sacarina. El análisis estadístico, mediante ANOVA de dos vías, no encontró ningún efecto principal del tiempo [ $F(2.19, 17.56) = 3.22, p=0.06$ ] ni de la condición [ $F(1, 8) = 0.22, p=0.64$ ], así tampoco hubo interacción entre ambas variables [ $F(3, 24) = 1.25, p=0.31$ ]. Los datos obtenidos fueron graficados en la figura 13. Estos datos sugieren que el aislamiento social no afecta la AN.

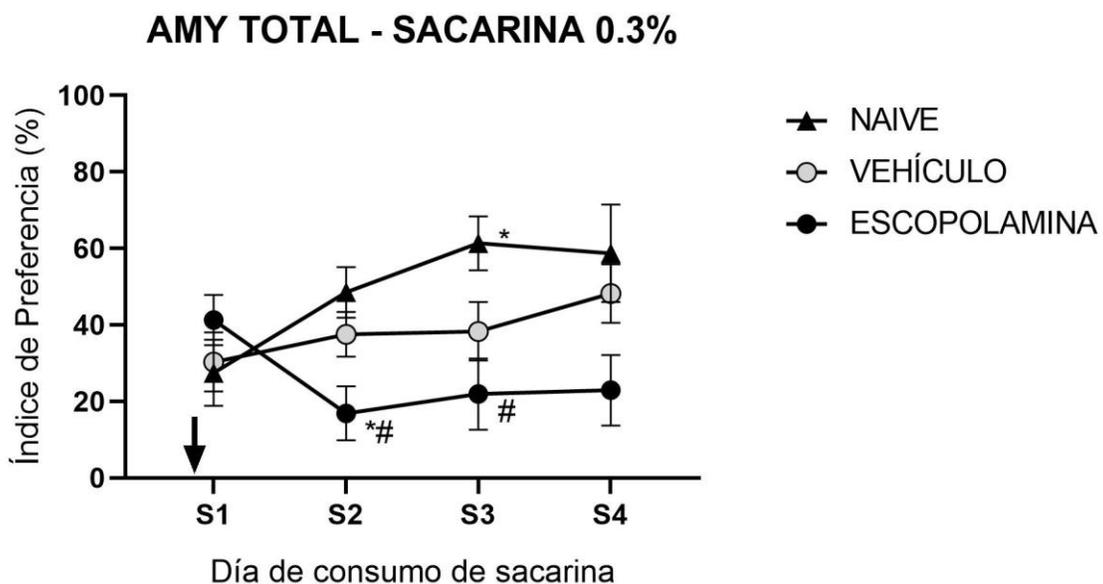


**Figura 17.** Índice de preferencia en sujetos agrupados y aislados (S1 a S4). Comparación entre sujetos agrupados (n=5) y sujetos aislados (n=5). 2w-ANOVA =  $p > 0.05$

## Infusión de escopolamina en AMY antes del sabor novedoso

Los experimentos anteriores nos ayudaron a determinar la concentración ideal para medir la AN en sujetos expuestos a múltiples bebederos, además, el aislamiento social de los sujetos no parece tener un impacto sobre el consumo o preferencia de la sacarina; por lo tanto, a partir de aquí se decidió usar solo concentraciones de sacarina de 0.3% en sujetos aislados. En el siguiente experimento se procedió a evaluar el efecto de la inhibición muscarínica antes de la adquisición en la totalidad del complejo amigdalino. Se incluyó un grupo al que se le infundió el fármaco escopolamina (n=9), otro al que se le infundió solución salina (vehículo, n=7) y un último grupo al que no se le realizó la cirugía (naive, n=5). Este último grupo fue incluido con el fin de descartar efectos sobre la tarea de atenuación de la neofobia debido al procedimiento quirúrgico. También este experimento se extendió a cuatro días para confirmar la correcta AN y consumo asintótico de sacarina en los grupos. Los datos obtenidos (IP's) fueron graficados en la figura 14. Tras el análisis estadístico no se encontró un efecto principal del grupo [ $F(2, 18) = 3.34, p > 0.05$ ] ni de los días de consumo [ $F(1.88, 33.88) = 1.75, p > 0.05$ ], sin embargo, si se encontró una interacción entre ambas variables [ $F(6, 54) = 4.24, p < 0.01$ ]. El ajuste posthoc (Sidak) mostró una diferencia intra-grupo para el grupo naive hasta el tercer día de consumo (M=61.36, SD=15.76,  $p < 0.05$ ), mientras que el grupo escopolamina mostró diferencia a su segundo día de consumo (M=16.88, SD=21.13,  $p < 0.05$ ), y el grupo vehículo no mostró cambios significativos en ninguno de los días de consumo observados ( $p > 0.05$ ). Por otro lado, durante el primer día de consumo (S1) no se mostraron diferencias inter-grupos [naive vs. vehículo (MD= -2.83,  $p > 0.05$ ), naive vs. escopolamina (MD= -13.81,  $p > 0.05$ ), vehículo vs. escopolamina (MD= -10.98,  $p > 0.05$ )]. El segundo día de consumo (S2), el grupo escopolamina mostró diferencia con naive (MD= 31.62,  $p < 0.05$ ) pero no con vehículo (MD= 20.65,  $p > 0.05$ ) y tampoco hubo diferencias entre naive vs. vehículo (MD= 10.97,  $p > 0.05$ ). Para el tercer día de consumo (S3) se mantuvieron las mismas preferencias que en S2 [escopolamina vs. naive (MD= 39.42,  $p < 0.05$ ), escopolamina vs. vehículo (MD= 16.36,  $p > 0.05$ ), vehículo vs naive (MD= 23.06,  $p$

> 0.05)]. Para el cuarto día de consumo (S4) no se mostraron diferencias entre ningún grupo [escopolamina vs. vehículo (MD= 25.32,  $p > 0.05$ ), escopolamina vs. naive (MD= 35.77,  $p > 0.05$ ), vehículo vs. naive (MD= 10.45,  $p > 0.05$ )]. En este primer experimento se observa que el grupo naive presenta neofobia y una AN esperadas. El grupo vehículo mantuvo su IP durante todo el experimento sin mostrar diferencias significativas intragrupo. Finalmente, el grupo escopolamina no mostró diferencias con vehículo ni naive en S1, lo que sugiere que los mAChR no están involucrados en la percepción de estímulos gustativos por lo que no se vio afectada la neofobia. Sin embargo, al mostrar diferencias significativas contra naive en S2 y S3, se sugiere que los mAChR son necesarios para formar una memoria gustativa ya que se vio afectada la evocación.

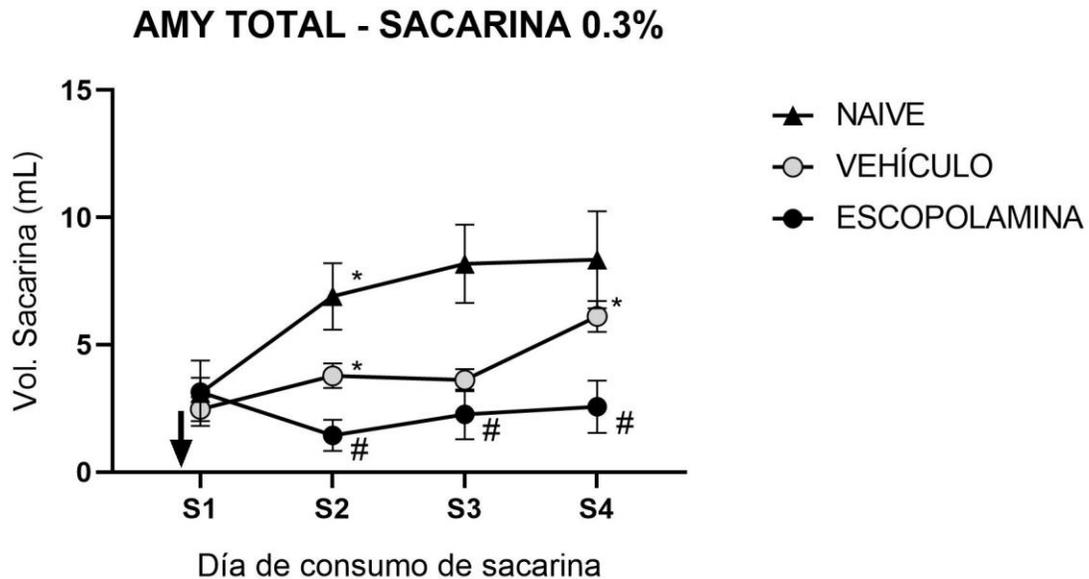


**Figura 18.** Índice de preferencia tras la infusión de escopolamina en AMY total (S1 a S4). Comparación entre grupos vehículo (n=9), naive (n=5) y escopolamina (n=10). (\*) Diferencias intra-grupo; (#) Diferencias inter-grupos (escop. vs naive); (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p < 0.01$ ; \*/#  $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se hizo el análisis estadístico exclusivamente del volumen de sacarina que consumieron los sujetos, el cual está representado en la figura 15. Aunque se encontró un efecto principal por parte del grupo [ $F(2,18) = 7.86$ ,  $p < 0.01$ ]

y del día de consumo [ $F(1.98, 35.7) = 9.44, p < 0.001$ ] se encontró una interacción significativa entre ambas variables [ $F(6,54) = 5.64, p = 0.0001$ ]. Tras las correcciones posthock (Sidak) se encontraron diferencias intra-grupo en S2 en el grupo de naive ( $M=6.9, SD=2.91, p < 0.05$ ) y vehículo ( $M=3.78, SD=1.28, p < 0.05$ ) pero no de escopolamina ( $M=1.44, SD=1.82, p > 0.05$ ); para S3 no hubo diferencias significativas intra-grupo [naive ( $M=8.18, SD=3.43, p > 0.05$ ), vehículo ( $M=3.61, SD=1.14, p > 0.05$ ) y escopolamina ( $M=2.26, SD=2.91, p > 0.05$ )]; sin embargo, para S4 solo se encontró un aumento significativo del consumo de sacarina en el grupo vehículo ( $M=6.11, SD=1.60, p < 0.05$ ) pero no de naive ( $M=8.34, SD=4.25, p > 0.05$ ) ni escopolamina ( $M=2.56, SD=3.07, p > 0.05$ ). Finalmente, en las comparaciones inter-grupos no se encontraron diferencias en S1 [naive vs. vehículo ( $MD= 0.62, p > 0.05$ ), vehículo vs. escopolamina ( $MD= -0.67, p > 0.05$ ), naive vs. escopolamina ( $MD= -0.04, p > 0.05$ )]; por otro lado, en S2 se encontraron diferencias entre naive vs. escopolamina ( $MD= 5.45, p < 0.05$ ) y vehículo vs. escopolamina ( $MD= 2.34, p < 0.05$ ) pero no entre naive vs. vehículo ( $MD= 3.11, p > 0.05$ ). Por otra parte, en S3 se encontró diferencia entre naive vs. escopolamina ( $MD= 5.91, p < 0.05$ ), pero no entre naive vs. vehículo ( $MD= 4.56, p > 0.05$ ) ni vehículo vs. escopolamina ( $MD= 1.34, p > 0.05$ ). Finalmente, en S4 se encontraron diferencias significativas entre vehículo vs. escopolamina ( $MD= 3.54, p < 0.05$ ), pero no entre naive vs. vehículo ( $MD= 2.22, p > 0.05$ ) ni entre naive vs. escopolamina ( $MD= 5.77, p > 0.05$ ). Con estos resultados se puede corroborar la presencia de neofobia en los tres grupos así como la presencia de AN en Naive y en Vehículo, no así en el grupo escopolamina, ni siquiera la formación de la memoria aversiva vista en el análisis anterior. Este experimento sugiere que tanto Naive como Vehículo tienden a consumir mayor cantidad de sacarina conforme el paso de los días mientras que el grupo escopolamina mantiene bajo el consumo de sacarina durante todos los días del experimento. Por otra parte, el aparente retraso en la AN en los sujetos infundidos con el vehículo, a comparación con el grupo de animales intactos puede sugerir que la infusión de un volumen de 1  $\mu$ L, que abarca todo el complejo amigdalino (Roldan & Bures, 1994) pudo tener un efecto deletéreo en sí mismo sobre el

desempeño de las ratas en la tarea de AN. Por lo tanto, se procedió a la realización de experimentos con infusiones limitadas a núcleos específicos de la amígdala.

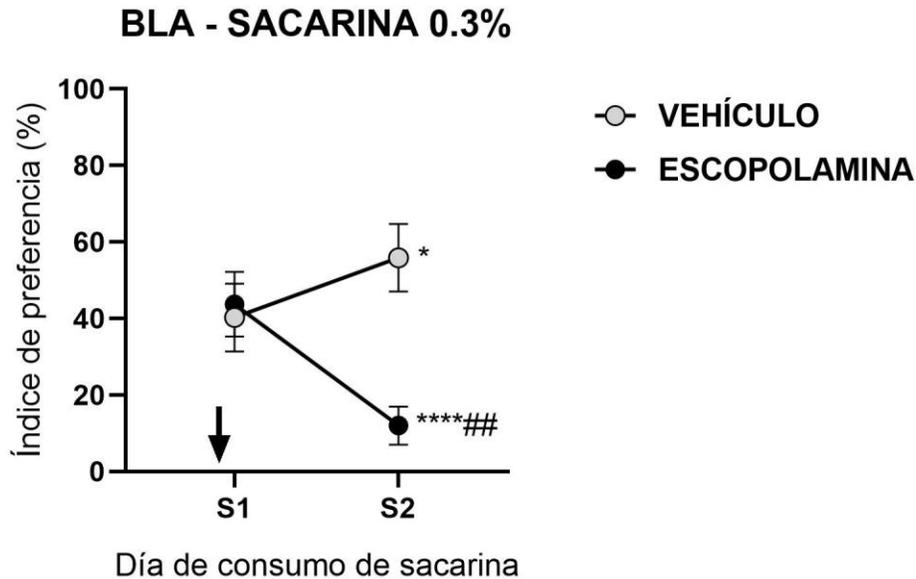


**Figura 19.** Volumen de sacarina consumido tras la infusión de escopolamina en AMY total (S1 a S4). Comparación entre grupos vehículo (n=9), naive (n=5) y escopolamina (n=10). (\*) Diferencias intra-grupo; (#) Diferencias inter-grupos (escop. vs naive); (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p < 0.001$ ; \*/#  $p < 0.05$ ).

### Infusión de escopolamina en BLA antes del sabor novedoso

Asimismo, se evaluó la participación de los receptores muscarínicos en la BLA y CeA en el aprendizaje de la conducta de AN. Primero realizamos la infusión de vehículo o escopolamina en la BLA cuyos resultados se muestran de forma gráfica en las figuras 16 a 18. A partir de este experimento y en los posteriores, se decidió limitar a dos días de consumo de sacarina ya en los experimentos previos se había corroborado una AN correcta, siendo que en esta ocasión nos interesa principalmente el impacto que pudiera tener la infusión en la neofobia y su atenuación. Este análisis estadístico incluyó únicamente al grupo escopolamina (n=6) y vehículo (n=8) ya que buscamos comparar solo a los grupos que presentaban la misma lesión intracerebral. En primer lugar, obtuvimos el índice de

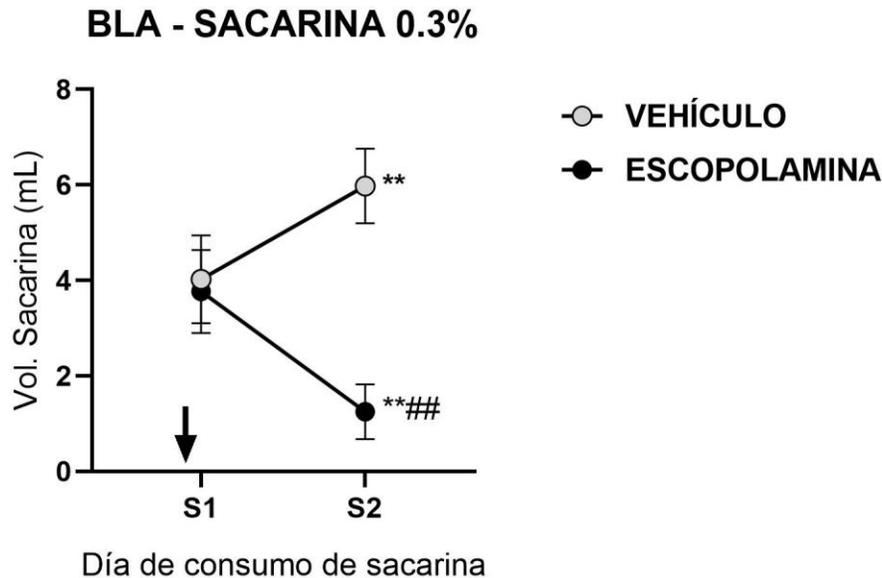
preferencia de ambos grupos cuyos resultados se muestran en la figura 16. Tras el análisis, no se encontraron efectos principales del grupo [ $F(1, 12) = 3.199, p > 0.05$ ] pero sí se encontró un efecto principal del tiempo (día de consumo) [ $F(1, 12) = 4.76, p < 0.05$ ] y una interacción significativa entre ambas variables [ $F(1, 12) = 41.14, p < 0.0001$ ]. Después se realizaron correcciones post hoc (Sidak) en donde se observaron diferencias intra-grupo para el segundo día de consumo (S2) del grupo escopolamina ( $p < 0.001$ ) y del grupo Vehículo ( $p < 0.05$ ). Finalmente, no se observó diferencia significativa inter-grupos el primer día de consumo, S1 ( $p > 0.05$ ), pero sí el segundo día, S2, ( $p < 0.01$ ). A pesar de que existe diferencia intra-grupo en ambas condiciones para S2, se observa que ambas condiciones toman direcciones distintas pues en el grupo vehículo hay un aumento en la preferencia de sacarina, es decir, hay AN, mientras que en el grupo escopolamina se observa una disminución en la preferencia. Estos resultados sugieren que la escopolamina no interfiere con la detección de novedad cuando se infunde en la BLA, ya que ambos grupos presentan la misma neofobia, es decir, presentan un mismo IP el primer día de consumo (S1). Por otro lado, los mAChR parecen ser necesarios para una formación normal de la memoria ante estímulos apetitivos. Lo anterior con base en que el grupo vehículo presentó una AN normal con un IP mayor en S1 que en S2; mientras que el grupo escopolamina presentó no solo una AN atenuada, sino que parece formarse una memoria aversiva, pues se presentó un IP significativamente menor durante S2 que en S1.



**Figura 20.** Índice de preferencia tras la infusión de escopolamina en BLA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo (n=8) y Escopolamina (n=6). (\*) Diferencias intra-grupo; (#) Diferencias inter-grupos; (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p < 0.05$ ; \*/#  $p < 0.05$ ).

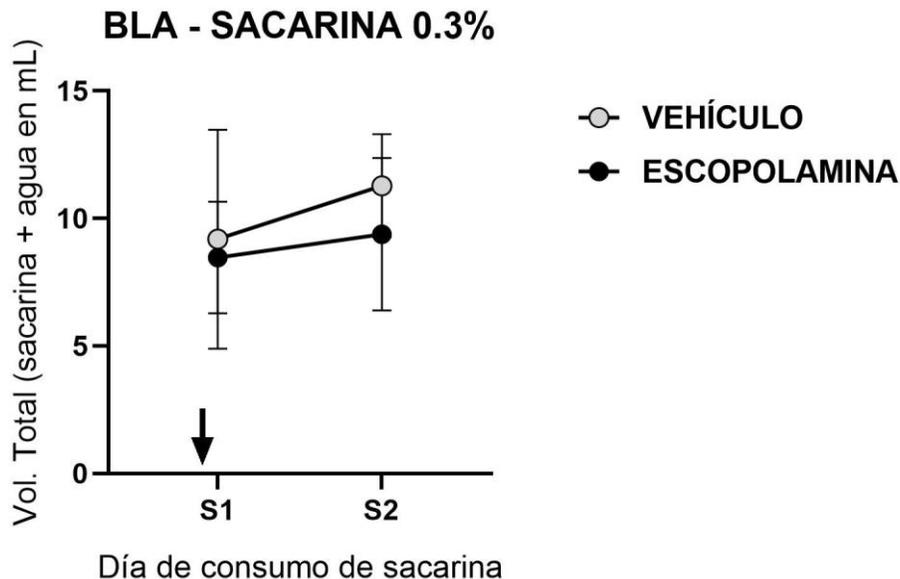
Posteriormente se utilizaron los mismos grupos escopolamina (n=6) y vehículo (n=8) para el análisis de volúmenes consumidos para determinar si la infusión de escopolamina interfiere con el volumen total o de sacarina consumido. Primero se analizó el volumen de sacarina cuya representación gráfica se muestra en la figura 17. Se encontraron efectos principales aditivos del grupo [ $F(1, 12) = 4.98, p < 0.05$ ] pero no del tiempo [ $F(1, 12) = 0.57, p > 0.05$ ]. No obstante, se encontró una interacción significativa entre ambas [ $F(1, 12) = 35.49, p < 0.0001$ ]. Posteriormente, las correcciones post hoc (Sidak) demostraron diferencias significativas intra-grupo para el segundo día de consumo (S2) tanto de escopolamina ( $p < 0.01$ ) como de vehículo ( $p < 0.01$ ). Por último, no se encontraron diferencias inter-grupos en S1 ( $p > 0.05$ ) pero si en S2 ( $p < 0.01$ ). Tras el análisis, como lo comentamos anteriormente, se observa que el grupo vehículo tiende a aumentar el consumo mientras que el grupo escopolamina consume menos volumen de sacarina. Con este análisis exclusivamente del volumen de sacarina se corrobora que la escopolamina no afecta la neofobia y por lo tanto la percepción de los estímulos.

Por otro lado, en cuanto al volumen consumido se trata, se puede observar una atenuación de la neofobia esperada por parte del grupo vehículo. Finalmente, se vuelve a evidenciar la formación de esta memoria aversiva por parte del grupo escopolamina.



**Figura 21.** Volumen de sacarina consumido en mL tras la infusión de escopolamina en BLA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo (n=8) y Escopolamina (n=6). (\*) Diferencias intra-grupo; (#) Diferencias inter-grupos; (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p < 0.001$ ; \*/#  $p < 0.05$ ).

Finalmente, se analizó el volumen total de líquidos ingeridos (agua + sacarina) cuya representación gráfica se muestra en la figura 18. No se encontraron efectos principales del grupo [ $F(1, 12) = 1.049$ ,  $p > 0.05$ ], de los días [ $F(1, 12) = .051$ ,  $p > 0.05$ ] ni de su interacción [ $F(1, 12) = 0.3157$ ,  $p > 0.05$ ]. Por lo tanto, se infiere que ambos grupos, Escopolamina y Vehículo, ingirieron la misma cantidad de líquidos para saciar su sed durante todos los días del experimento. Con lo anterior se demuestra que la escopolamina no afecta la cantidad total de líquidos ingerida cuando se infunde en BLA.



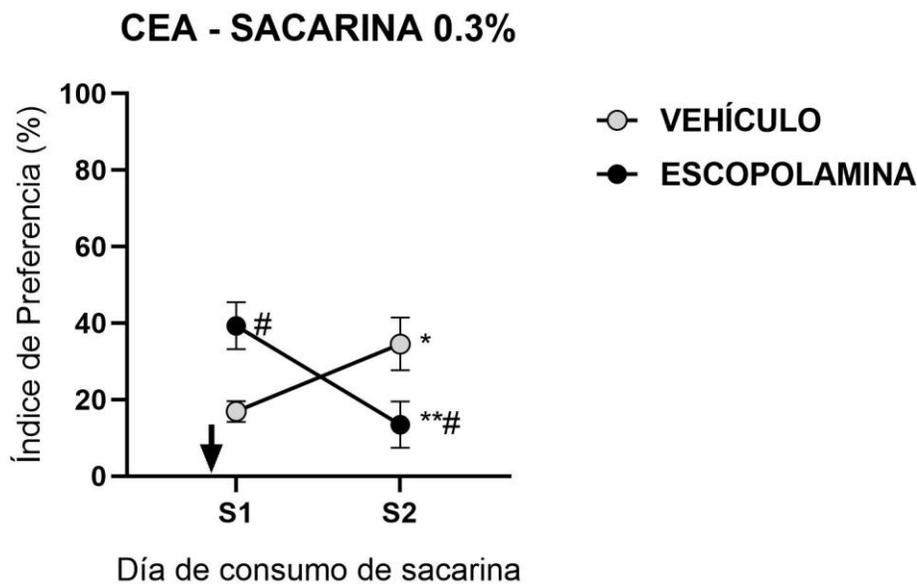
**Figura 22.** Volumen total consumido (sacarina + agua) en mL tras la infusión de escopolamina en BLA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo (n=8) y Escopolamina (n=6). (↓) Momento de infusión (2w-ANOVA,  $p > 0.05$ ).

### Infusión de escopolamina en CeA antes del sabor novedoso

Con respecto a la infusión de vehículo o escopolamina en la CeA de la misma forma y en las mismas condiciones que en BLA; los resultados del IP, volumen de sacarina y total se muestran en las figuras 19 a 21 respectivamente. Este análisis estadístico incluyó al grupo escopolamina (n=11) y vehículo (n=14).

En primer lugar, se muestra una representación gráfica de los resultados del análisis del IP en la figura 19. No se encontraron efectos principales del grupo [ $F(1, 23) = 0.01$ ,  $p > 0.05$ ] ni en los días de consumo [ $F(1, 23) = 0.72$ ,  $p > 0.05$ ], sin embargo, sí se mostró una interacción significativa entre ambas variables [ $F(1, 23) = 20.32$ ,  $p < 0.001$ ]. Tras las correcciones post hoc (Sidak) se observó diferencia significativa intra-grupo para S2 tanto en vehículo ( $p < 0.05$ ) como en escopolamina ( $p < 0.01$ ), sin embargo, para ambas fue distinta ya que el grupo vehículo aumentó el IP mientras que el grupo escopolamina disminuyó su preferencia. Adicionalmente

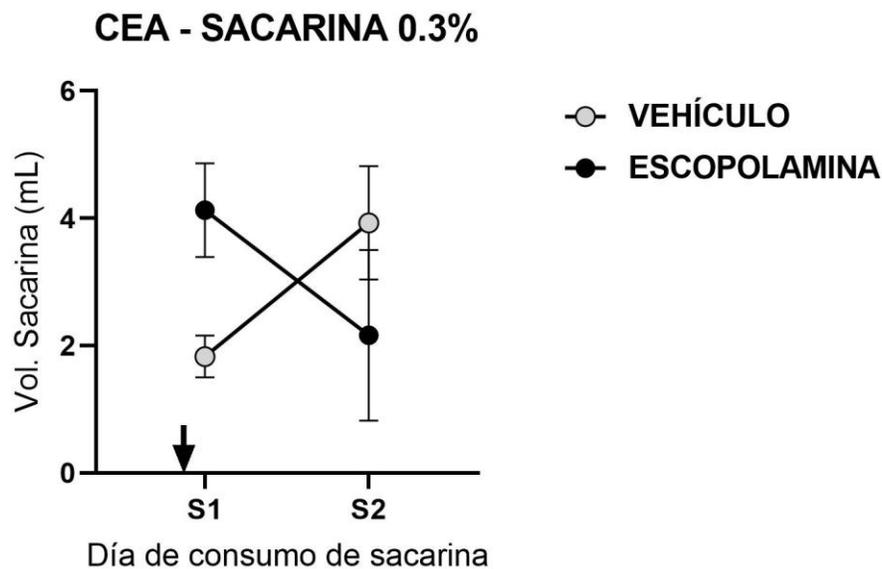
se observó diferencia significativa entre grupos tanto en S1 ( $p < 0.05$ ) como en S2 ( $p < 0.05$ ). Tras el análisis se observa que el grupo vehículo presenta una neofobia con una AN esperadas. Adicionalmente, se muestra que la escopolamina tiene efecto sobre la percepción de los estímulos ya que el grupo Escopolamina consumió significativamente mayor cantidad de sacarina que el grupo Vehículo, como si fuera un estímulo familiar. Sin embargo, este grupo volvió a mostrar la formación de una memoria aversiva ya que su IP fue significativamente menor para S2.



**Figura 23.** Índice de preferencia con infusión de escopolamina en CeA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo ( $n=14$ ) y Escopolamina ( $n=11$ ). (\*) Diferencias intra-grupo; (#) Diferencias inter-grupos; (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p < 0.001$ ; \*/#  $p < 0.05$ ).

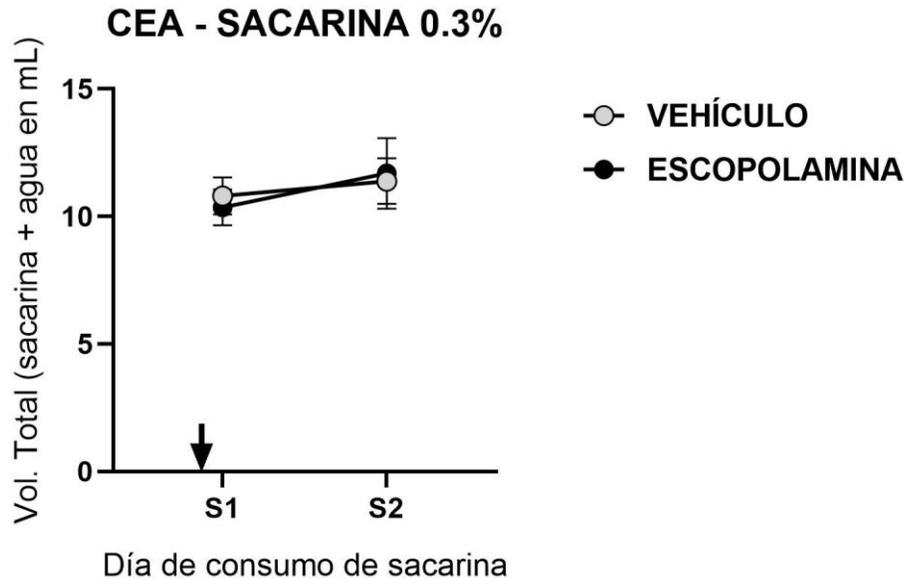
Posteriormente se analizó el volumen de sacarina cuya representación gráfica se muestra en la figura 20. En el análisis del volumen de sacarina no se encontraron efectos principales del tratamiento [ $F(1, 23) = 0.07$ ,  $p > 0.05$ ] o del día de consumo [ $F(1, 23) = 0.008$ ,  $p > 0.05$ ], sin embargo, sí se mostró una interacción significativa entre ambos factores [ $F(1, 23) = 7.21$ ,  $p < 0.05$ ]. Tras las correcciones post hoc (Sidak) no se observó diferencia significativa intra-grupo para S2 en vehículo ( $p > 0.05$ ) ni en escopolamina ( $p > 0.05$ ). Adicionalmente tampoco se observó diferencia

significativa inter-grupos en S1 ( $p > 0.05$ ) ni en S2 ( $p > 0.05$ ). Estos resultados sugieren que a pesar de la interacción entre la variable grupo y tiempo, el volumen consumido de sacarina no difiere entre cuando se presenta por primera vez versus cuando se presenta por segunda ocasión tanto en el grupo vehículo como en el grupo tratado con escopolamina. Estos datos resaltan la mayor sensibilidad del índice de preferencia para detectar diferencias significativas en la tarea de AN de libre elección.



**Figura 24.** Índice de preferencia con infusión de escopolamina en CeA (S1 a S2). Comparación entre grupos vehículo ( $n=14$ ) y escopolamina ( $n=11$ ). (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p > 0.05$ ).

Por último, en la figura 21 se muestra una representación gráfica del análisis del volumen total (agua + sacarina). No se encontraron efectos principales de los grupos [ $F(1, 23) = 0.004$ ,  $p > 0.05$ ], de los días de consumo [ $F(1, 23) = 1.41$ ,  $p > 0.05$ ] o de la interacción [ $F(1, 23) = 0.22$ ,  $p > 0.05$ ]. Por lo tanto, se infiere que ambos grupos, escopolamina y vehículo, ingirieron la misma cantidad de líquidos durante todos los días del experimento, lo que sugiere que la escopolamina no afecta la sensación de sed cuando se infunde en la CeA.

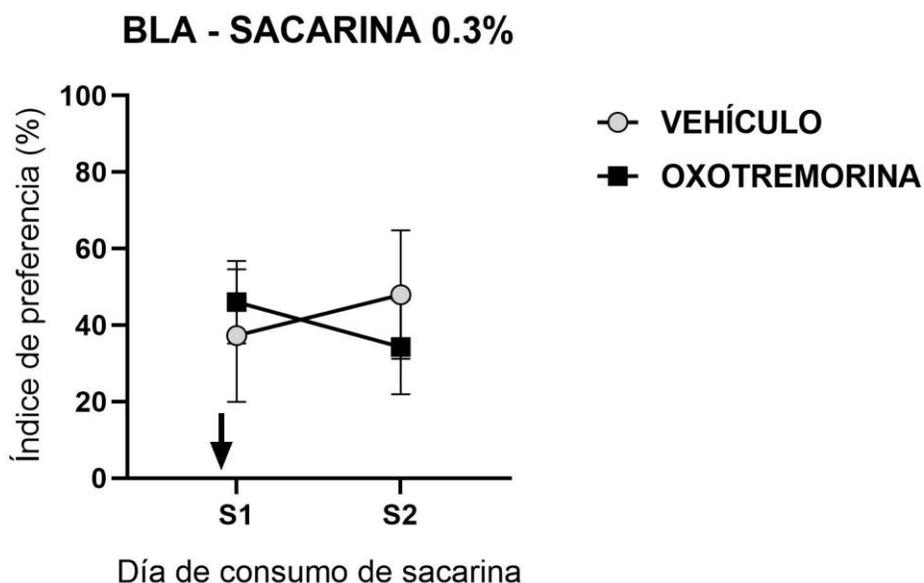


**Figura 25.** Volumen total consumido (sacarina + agua) en mL tras la infusión de escopolamina en CeA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo (n=14) y Escopolamina (n=11). (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p > 0.05$ ).

### Infusión de oxotremorina en BLA antes del sabor novedoso

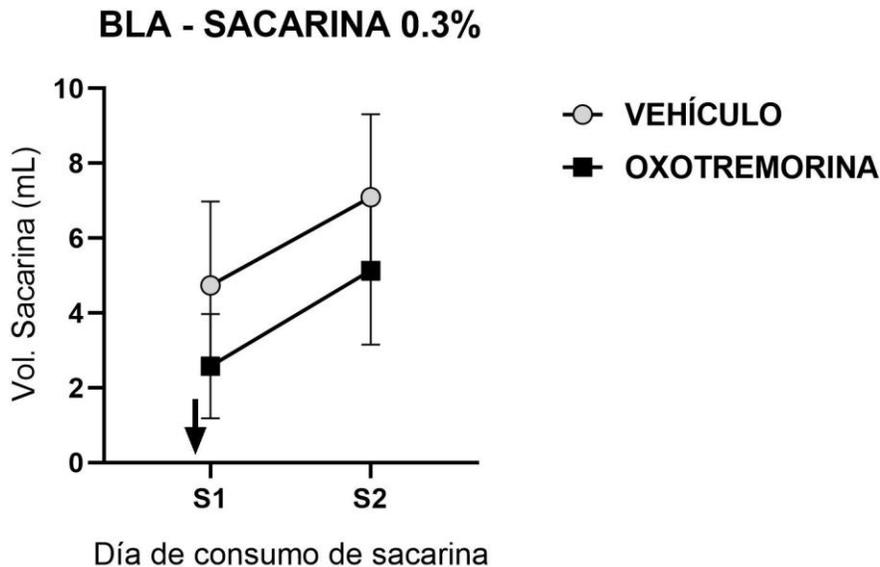
Dado que se observó que el antagonismo muscarínico en la BLA durante el consumo de un sabor novedoso producía una conducta de evitación hacia el sabor cuando éste se presentaba por segunda ocasión, dos días después (S2), probamos la posibilidad de que el agonismo muscarínico pudiera producir el efecto opuesto, es decir, favorecer la formación de una conducta de acercamiento, la cual se vería reflejada por una facilitación de la AN. Para ello, se realizaron infusiones de oxotremorina, un agonista muscarínico, en la BLA antes del consumo del sabor novedoso. En este experimento se incluyó el grupo vehículo (n=3) y el grupo oxotremorina (n=5). Los procedimientos de infusión de vehículo y oxotremorina se realizaron de la misma forma y mismos volúmenes que los experimentos de escopolamina en BLA, así también se evaluó el IP, volumen de sacarina y volumen total consumido (agua + sacarina).

De manera similar, se evaluó el IP, el volumen de sacarina y el volumen total de líquido ingerido. En este experimento no se observó un efecto principal del tiempo o día de consumo de sacarina [ $F(1, 6) = 0.002, p > 0.05$ ] ni de la condición [ $F(1, 6) = 0.023, p > 0.05$ ] y tampoco hubo interacción entre ambas variables [ $F(1, 6) = 0.960, p > 0.05$ ] (Fig. 22). Estos resultados sugieren que el agonismo muscarínico durante el consumo de un sabor novedoso no afecta la formación de una memoria incidental ni el valor hedónico adquirido por dicho sabor.



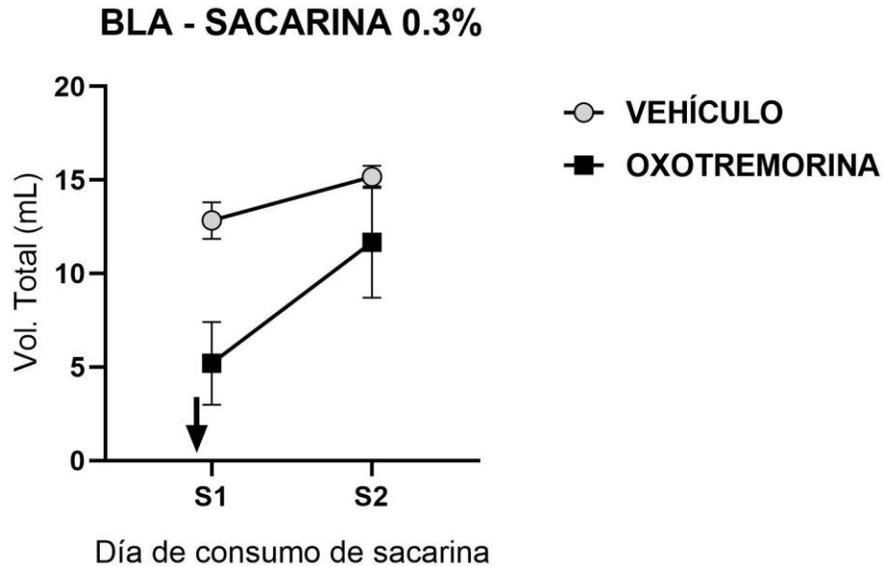
**Figura 26.** Índice de preferencia con infusión de oxotremorina en BLA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo (n=3) y Escopolamina (n=5). (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p > 0.05$ ).

Cuando se evaluó el volumen de sacarina consumido con la infusión de oxotremorina en BLA tampoco se encontró efecto principal del tiempo [ $F(1, 6) = 3.628, p > 0.05$ ] de la condición [ $F(1, 6) = 0.6805, p > 0.05$ ] ni interacción entre ambas variables [ $F(1, 6) = 0.005587, p > 0.05$ ] (Fig. 23). Estos resultados sugieren que la oxotremorina no afecta el consumo de sacarina ni la tarea de AN.



**Figura 27.** Índice de preferencia con infusión de oxotremorina en BLA (S1 a S2). Comparación entre grupos vehículo (n=3) y escopolamina (n=5). (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p > 0.05$ ).

Finalmente, se evaluó el volumen total consumido (agua + sacarina) tras la infusión de oxotremorina en BLA de los mismos grupos para evaluar si el tratamiento afectó la ingesta de líquidos. Los resultados están gráficamente representados en la figura 24. No se encontró un efecto principal de la condición [ $F(1, 6) = 3.23, p > 0.05$ ] pero si del tiempo o día de consumo [ $F(1, 6) = 6.40, p < 0.05$ ]. Sin embargo, no se encontró interacción entre las variables [ $F(1, 6) = 1.41, p > 0.05$ ]. Estos resultados demuestran que la infusión de oxotremorina en BLA no afecta la cantidad de ingesta de líquidos. Por lo tanto, en conjunto con todos los resultados de oxotremorina, se demuestra que la infusión de 0.3  $\mu\text{l}$  de dicho fármaco a una dosis de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en la BLA no tiene un impacto sobre la formación de la memoria gustativa.



**Figura 28.** Volumen total consumido (sacarina + agua) en mL tras la infusión de oxotremorina en BLA (S1 a S2). Comparación entre grupos Vehículo (n=3) y Escopolamina (n=5). (↓) Momento de infusión. (2w-ANOVA,  $p > 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Mediante la infusión de escopolamina en AMY, BLA o CeA se buscó evaluar la función de los mAChR amigdalinos en la formación de una memoria gustativa apetitiva, es decir, durante la AN. Nuestros resultados sugieren que los grupos vehículo y naive presentan una respuesta de neofobia hacia la sacarina en S1 con una tendencia a consumirla en mayores cantidades para el segundo día (S2) y así consecutivamente hasta llegar a una asíntota de consumo, consistente con lo reportado previamente (Bermúdez-Rattoni, 2004). Por otro lado, el grupo escopolamina que recibió infusión en AMY y BLA previo a la presentación de la solución de sacarina novedosa, mostró una neofobia normal, pero con una tendencia a consumir significativamente menos a la sacarina en su segundo día de consumo (S2), sugiriendo la formación de una memoria aversiva o de evitación por

el sabor. Por otro lado, se observó que la infusión de escopolamina en la CeA previa a la administración del sabor novedoso produjo una respuesta neofóbica atenuada, es decir, consumió en mayor cantidad la sacarina, como si este fuera un sabor familiar. Sin embargo, para S2 el consumo se redujo significativamente como si el estímulo fuera nuevo o incluso aversivo. Finalmente, los experimentos de los sujetos que recibieron infusión de oxotremorina en la BLA previo al consumo del sabor novedoso no evidenciaron cambios conductuales, sugiriendo una ausencia de efecto del agonismo muscarínico sobre la AN, aunque no podemos descartar la posibilidad que esta ausencia de efecto se deba al uso de una dosis subóptima, una falta de poder estadístico ( $n=3-5/\text{grupo}$ ). Aunque también, podríamos estar en presencia de un efecto de techo (Salkind, 2012), por lo que estudios a futuro deberían probar el efecto del agonismo muscarínicos con un estímulo menos preferido de forma innata como la sacarina 0.5%.

Desde los primeros estudios sobre el CAS (Garcia et al., 1955) hasta trabajos más recientes (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003; Lin et al., 2015) se ha utilizado concentraciones de sacarina de 0.1% para estudiar este condicionamiento aversivo; sin embargo, también se ha utilizado para estudiar la AN (Shinohara & Yasoshima, 2019). En nuestro modelo experimental, de múltiples bebederos y de libre elección entre el sabor novedoso y agua, el uso de una concentración de 0.1% no fue suficiente para lograr una neofobia y AN marcada. El hecho de que no hubiera diferencia significativa entre S1 y S2 sugiere que dicha concentración tal vez no sea aversiva o preferida, al menos en este modelo, y, por lo tanto, si ésta no resulta neofóbica, tampoco podrá atenuarse (AN). Según la definición de neofobia usada por (Shinohara & Yasoshima, 2019), para que exista neofobia se requiere que el primer consumo de sacarina sea significativamente menor al consumo asintótico de la misma, lo cual no logramos con la concentración al 0.1%. Si bien no hemos observado AN al comparar el volumen consumido entre S1 y S2, es probable que sí hubiéramos podido observarla utilizando métodos de detección alternos como la comparación de respuestas orofaciales o del patrón de lengüeteos entre S1 y S2 (Grill & Norgren, 1978; Lin et al., 2012).

Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con los estudios de Gutiérrez y colaboradores en donde sujetos control consumieron cantidades similares de sacarina 0.1% en los dos días que estuvieron expuestos a la misma, es decir, tampoco expresando neofobia, al menos cuando ésta se evalúa comparando el volumen consumido (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003). En segundo lugar, en nuestro experimento en ambos días se presentó un IP cercano al 50%, es decir, cerca de la mitad de líquido que consumieron fue sacarina y la otra mitad fue agua. En el estudio realizado por Stehberg y colaboradores se evaluó el índice de aversión (AI, por sus siglas en inglés) a la sacarina 0.1%, en donde un AI cercano al 100% se puede traducir en un rechazo por la sacarina mientras que un AI cercano al 0% se traduce a su preferencia, es decir, una metodología inversa a la nuestra pero donde un AI y un IP de 50% podrían significar lo mismo. En este estudio, se observó que la sacarina 0.1% en el primer día de consumo tenía un AI cercano al 50%, similar a nuestros resultados donde se encontró que en S1 la sacarina al 0.1% tuvo un IP alrededor del 50%. Adicionalmente, en ese trabajo tampoco se observó AN ya que el AI se mantuvo cercano al 50%, es decir, no hubo cambios significativos el segundo día que consumieron sacarina, igual que en nuestros experimentos en donde no hubo cambios significativos del IP de S1 a S2 (Stehberg et al., 2011). Con todo lo anterior se sugiere que la sacarina a una concentración 0.1%, mediante la técnica de bebederos múltiples, no es más aversiva ni preferida por sobre el agua, incluso tal vez sea indiferente, y por lo tanto es complicado demostrar una AN eficaz con esta concentración, al menos cuando se utiliza el volumen consumido como único parámetro (Grill & Norgren, 1978; Lin et al., 2012).

Por otro lado, las concentraciones de sacarina alrededor de 0.3% se le han otorgado un alto valor de preferencia (Mickley et al., 2005) y han sido usadas en estudios de CAS (Mickley et al., 2005) y AN (Neath et al., 2010). Respecto a nuestros resultados, se observó la presencia de AN de sacarina 0.3% de manera consistente con otros estudios en donde también se reportó AN con los grupos control (Mickley et al., 2005; Ramos, 2020) a esta concentración. Además, en el trabajo de Ramos del 2020, se evaluó el IP con la sacarina 0.3% e interesantemente los sujetos experimentales tuvieron un IP en el primer día de consumo cercano al

20%, un dato específico que es consistente con nuestros resultados pues también observamos un IP cercano al 20% durante el primer día que ofrecimos el estímulo. Sin embargo, para el segundo día de consumo, en este mismo trabajo, observó un IP de alrededor 70% mientras que en nuestros experimentos observamos un IP alrededor del 50%. Lo anterior se podría justificar con que el trabajo realizado por Ramos J. solo se ofrecieron dos bebederos con dos soluciones distintas, una de agua y la otra de sacarina; mientras que nuestro modelo, como ya lo hemos mencionado, consistía en diez bebederos de 3 mL, cinco de agua y cinco de sacarina, permitiendo a los sujetos, durante sus conductas exploratorias, tener más libertad y opciones de consumo.

Con todo lo anterior, respecto a las concentraciones de sacarina, podemos concluir que para una correcta evaluación de AN, mediante un modelo de múltiples bebederos, la concentración de sacarina al 0.3% resultó ser una buena opción. Por último, surgen preguntas interesantes como: ¿La habituación en el consumo de sacarina mediante el modelo de múltiples bebederos depende exclusivamente del tiempo o número de exposiciones al estímulo? ¿O basta con una sola exposición pero permitiendo el flujo normal de mecanismos moleculares y/o celulares en el cerebro para formar una memoria segura? ¿El uso de otras soluciones o sabores en este mismo modelo también se verá afectado por su concentración? ¿Otras tareas conductuales como el uso de licómetro podrán evidenciar si la sacarina al 0.1% es realmente preferida por sobre el agua como lo sugieren otros estudios (Grill & Norgren, 1978; Lin et al., 2012; Stehberg et al., 2011)? ¿A partir de qué concentración de sacarina (0.1, 0.3 o 0.5%) podría definirse como realmente preferente (Domjan et al., 1976)?

Por otro lado, fue necesario mantener los sujetos aislados desde que fueron operadas para evitar que se infligieran heridas en la zona quirúrgica. Sin embargo, se ha reportado que mantener a los sujetos aislados podría ocasionarles depresión y ansiedad provocando cambios en la conducta (Dandekar et al., 2009; Myslivecek, 2021; Ros-Simó & Valverde, 2012). Por lo anterior se evaluó el efecto del aislamiento sobre el consumo en sujetos no operados. Nuestros resultados

mostraron que sujetos aislados y agrupados, tuvieron un IP similar durante todos los días de consumo. Lo anterior difiere del trabajo de Ros-Simó & Valverde (Ros-Simó & Valverde, 2012) en donde tras el aislamiento social observaron una mayor actividad locomotriz y mayores cambios de conducta tipo ansiedad; sin embargo, ellos usaron ratones desde una etapa de pre-adolescencia hasta la adultez, periodo crítico en donde el ambiente e interacción social impactan sobre el comportamiento adulto y en el cual todavía ocurren cambios de refinamiento y maduración de la circuitería neuronal (Semple et al., 2013; Workman et al., 2011). Adicionalmente el trabajo de (Dandekar et al., 2009) se utilizaron ratas, Sprague-Dawley adultas, es decir de 230 a 250 gramos, pero con un aislamiento social que duró aproximadamente 6 semanas, punto temporal en donde las conductas depresivas alcanzaron su pico máximo. Con lo anterior, es poco probable que el aislamiento social en nuestros sujetos experimentales, durante aproximadamente 2.5 semanas, haya impactado sobre la conducta de AN ya que eran adultos jóvenes (con un peso de 250 a 350 gramos) cuyo desarrollo y maduración cognitiva estaba completa (Semple et al., 2013). A diferencia de otros estudios centrados en evaluar la depresión y/o ansiedad, nosotros no vimos la necesidad de evaluar esta condición utilizando alguna prueba como nado forzado, laberinto en cruz elevado, actividad locomotriz, etc. ya que nuestro objetivo era determinar si este aislamiento social tenía un impacto sobre el consumo y preferencia de sacarina, lo cual no fue así.

Nuestro modelo experimental de libre elección con múltiples bebederos es el primero en ofrecer durante todos los días del experimento agua y sacarina ya que, en nuestro conocimiento, estudios anteriores sobre AN solo han usado consumo forzado del estímulo gustativo, al menos cuando éste se presenta por primera ocasión (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; J.-Y. Lin et al., 2018; Shinohara & Yasoshima, 2019). Desde nuestro punto de vista, el consumo forzado de soluciones puede ocasionar un sobreconsumo del estímulo ya que el estado motivacional (animales con sed por la privación de agua) puede representar un incentivo para adoptar conductas de riesgo, en este caso, consumir mayores cantidades de un estímulo novedoso o incluso aversivo, ya sea durante la adquisición o la evocación, afectando de manera importante los resultados obtenidos. Nuestra perspectiva

concuenda con el reporte del grupo de Parkes y colaboradores, quienes mencionan que el ofrecer dos bebederos con soluciones distintas puede atenuar la respuesta neofóbica (Parkes et al., 2014). En nuestro grupo hemos observado que el consumo forzado puede tener dos consecuencias según el momento en que se realice: Si se forzó el consumo durante la adquisición, el animal consumirá volúmenes más grandes del estímulo lo que podría traducirse en una mayor exposición a la información que será asimilada por el cerebro; esto se conoce como sobre-reforzamiento (Díaz del Guante et al., 1990; Durán-Arévalo et al., 1990; Quirarte, Cruz-morales, et al., 1994). Por otro lado, si el consumo fue forzado durante la evocación, es probable que fenómenos como la AN se expresen de una forma más marcada o el CAS de una forma menos notoria, incluso sin diferencia significativa, pues el estado de deshidratación motiva a los animales a consumir mayores cantidades del estímulo, aunque éste sea aversivo. El ofrecer agua y sacarina durante todo el experimento permite evitar el sobre-reforzamiento del estímulo o el sobre consumo durante la evocación, ya que los animales cuentan con la posibilidad de saciar su sed con un estímulo inocuo o familiar como el agua, permitiendo obtener una curva de aprendizaje que posiblemente tenga mayor validez de criterio, además de poder detectar cambios más sutiles en la preferencia. Sin embargo, una desventaja es que una memoria apetitiva es más difícil de detectar. Por ejemplo, en nuestro experimento con infusiones en la AMY, se observó que el grupo naive tuvo un IP significativamente mayor hasta S3 mientras que el grupo vehículo mantuvo un consumo del estímulo novedoso muy similar a lo largo de todos los días del experimento; no obstante, fue al evaluar el volumen de sacarina, que se pudo observar una AN significativa de los grupos vehículo y naive desde S2. Independientemente de la metodología, así como el momento en que se obtuvo una AN significativa, es evidente que tanto nuestros grupos vehículo como naive mostraron una respuesta neofóbica y de AN, lo que es consistente con los grupos control de otros experimentos que también han evaluado la AN usando sacarina (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; Lin et al., 2018; Shinohara & Yasoshima, 2019). El hecho de que este modelo experimental permita detectar aversiones

sutiles, aunque con dificultad para evaluar las conductas apetitivas, nos permite pensar que fue idóneo para cumplir nuestros objetivos.

En cuanto a la detección de novedad, encontramos que los mAChR's en AMY y BLA no parecen tener una participación sobre esta función, basándonos en que los grupos infundidos con escopolamina tuvieron tanto un IP como un consumo de sacarina iguales que los controles en S1; esto es consistente con otros estudios en donde infundieron escopolamina en estructuras involucradas en el procesamiento de los estímulos gustativos incluyendo la IC (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; Gutiérrez, Téllez, et al., 2003) y núcleo accumbens (Ramírez-Lugo et al., 2006). Sin embargo, los mAChR's sí parecen jugar un rol esencial para la detección de novedad en CeA, pues la infusión de escopolamina en dicha estructura hizo que los sujetos tuvieran un mayor IP y consumieran mayores cantidades de sacarina que su grupo control durante S1. Nuestros experimentos contrastan con otros trabajos en los cuales mediante lesión de la CeA no se observaron alteraciones en la neofobia, ya que las ratas lesionadas en CeA y control consumieron cantidades similares durante la primera presentación del estímulo (Molero-Chamizo & Rivera-Urbina, 2017; St. Andre & Reilly, 2007). Puede resultar curioso que el antagonismo muscarínico, mas no la lesión de la CeA afecte la neofobia. A diferencia de la CeA, se ha reportado que lesiones de la IC o de la BLA sí afectan la expresión de la neofobia (Lin & Reilly, 2012). Lo anterior se podría explicar porque, se ha reportado que la CeA, específicamente la CeL, no solo está involucrada en el procesamiento de la información gustativa, sino que también parece ser reclutada para la supresión de ciertas conductas, como el lengüeteo en animales con sed, evitando así consecuencias no deseadas (Schiff et al., 2018). Además, se sabe que en la CeL existe una subpoblación de neuronas PKC $\delta^+$ , que, con una actividad reducida promueven conductas apetitivas en ratas enfermas o ante sabores desagradables (Janak & Tye, 2015). Hasta dónde sabemos, no existe evidencia sobre el impacto de la actividad muscarínica en neuronas PKC $\delta^+$  en la amígdala. Sin embargo, existen estudios que en distintas estirpes celulares han observado que el agonismo muscarínico induce fosforilación del PKC $\delta$  (Benes & Soltoff, 2001; Wrenn, 2001) o

que una corriente inhibitoria desencadenada por receptores postsinápticos M1 y M3 esta mediada en gran parte por la vía de PKC $\delta$  (Leaney et al., 2004).

Se ha propuesto que un estímulo gustativo se puede percibir como novedoso, familiar-aversivo o familiar-apetitivo. También se sabe que, en el proceso de formación de una memoria, basta con una sola exposición al estímulo gustativo novedoso para evaluar su seguridad y así formar una memoria apetitiva o aversiva dependiendo de las consecuencias post-ingestivas (Bermúdez-Rattoni, 2004). En nuestro estudio, utilizando tanto el IP como el volumen consumido de sacarina, observamos que los grupos naive y vehículo de todos los experimentos (AMY, BLA y CeA) presentaron un aprendizaje eficaz (AN), ya que desde S2 hubo un consumo significativamente mayor que en S1. El hecho de que los grupos vehículo y naive hayan mostrado AN sugiere la formación de una memoria segura ante un estímulo apetitivo, lo cual concuerda con otros estudios cuyos grupos control tuvieron una AN normal (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; Lin et al., 2018; Shinohara & Yasoshima, 2019). Por otro lado, se encontró que los mAChR en AMY y BLA sí pueden estar involucrados en la evaluación de la seguridad de un alimento, ya que su antagonismo con escopolamina no solo provocó un efecto amnésico como sugieren otros estudios (Lee et al., 2021; Quirarte, Cruz-Morales, et al., 1994; Rush, 1988) sino generó un rechazo (aversión) por la sacarina cuando ésta se presentó por segunda ocasión, mostrando una disminución en su consumo y un IP menor en S2 que en S1. Lo anterior se podría explicar porque la BLA se ha visto involucrada en el procesamiento de estímulos apetitivos por lo que el antagonismo no permite el correcto proceso de la información para codificar una memoria apetitiva (Wang et al., 2018). En contraste con nuestros resultados, Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003 también infundieron escopolamina, pero en la IC, antes e inmediatamente después del sabor novedoso. Ellos observaron que la escopolamina interfiere con la correcta AN ya que sus ratas tuvieron el mismo consumo de sacarina el primer y segundo día de exposición. Sin embargo, su modelo experimental fue de consumo forzado, tanto en la adquisición como en la evocación, y de privación severa (solo 15 minutos al día), lo cual puede dificultar comparaciones directas. En contraste, es posible que haya ocurrido un sobre reforzamiento del estímulo en el primer día de

exposición y para el segundo día, sin posibilidad de elegir entre agua o sacarina, en conjunto con una privación de líquidos mayor, el fenómeno aversivo que observamos en nuestro experimento se vio oculto. No descartamos por completo que la escopolamina haya actuado como un estímulo incondicionado (US), sin embargo, (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003) reportaron que infusiones de escopolamina en la IC 20 minutos antes o inmediatamente después de la presentación de sacarina, no afecta el consumo de sacarina en la adquisición ni en la evocación, descartando así un posible papel de US por parte de la escopolamina intracortical. Finalmente, la evaluación de la seguridad en aquellos sujetos con infusión de escopolamina en CeA fue más complicada ya que nuestros datos sugieren que tras una aparente alteración de la detección de novedad en S1 por parte del grupo escopolamina la evaluación de la seguridad del estímulo pudo verse afectada. Con esto podemos hipotetizar dos situaciones. En la primera, que la percepción del estímulo se vio afectada durante el primer encuentro, es decir, durante S1 se consumió como si éste fuera familiar, por lo que en el segundo encuentro con el mismo (S2) dicho estímulo sería tratado como novedoso nuevamente y por lo tanto aversivo. La segunda, la percepción no se vio afectada y lo que ocurre es una pérdida de miedo a lo novedoso (posiblemente por el antagonismo muscarínico de la subpoblación de neuronas PKC $\delta$ <sup>+</sup> mencionada previamente). Además, se ha visto que se puede evaluar la seguridad de un estímulo gustativo sin tener que presentar neofobia (Parkes et al., 2014) por lo que para S2 recuerdan perfectamente el estímulo, pero esa experiencia que tuvieron en S1 actuó como US y provocó un rechazo por la sacarina (CS) durante S2.

Desde una perspectiva integrativa, podemos hablar sobre los circuitos entre IC con AMY, así como la participación de la señal muscarínica sobre estas estructuras para la formación de la memoria gustativa y como nuestros datos impactan sobre este circuito. Primero, se sabe que hay una comunicación recíproca entre las neuronas principales de la AMY con las de la IC (Kayyal et al., 2019; Wang et al., 2018); específicamente el activar las proyecciones de la aIC hacia BLA promueve conductas gustativas apetitivas, mientras que activar las proyecciones de pIC hacia CeA promueve conductas aversivas (Schiff et al., 2018; Wang et al.,

2018). Además, la BLA recibe proyecciones colinérgicas del BF (Aitta-aho et al., 2018), siendo la señal muscarínica necesaria para formación de la memoria gustativa (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003). Es importante mencionar que la señal colinérgica mejora la relación señal-ruido en las neuronas principales de la BLA (Unal et al., 2015), por lo que antagonizar esta señal muscarínica puede llevar a una disfunción de la BLA para procesar correctamente la información que llega a ella (específicamente de un estímulo apetitivo como en nuestro experimento) y consecuentemente afectar la formación de la memoria gustativa. Además, la misma señal colinérgica proveniente del BF promueve conductas apetitivas sin necesariamente generar cambios en la conducta a largo plazo (Aitta-aho et al., 2018). Con esto en mente, podemos teorizar sobre como la lesión de la BLA (J. Y. Lin & Reilly, 2012) pero no el antagonismo muscarínico afecta a neofobia y que impacto tiene sobre la memoria. Como lo mencionamos antes, la conexión bilateral entre BLA y aIC promueve conductas apetitivas por lo que tras una lesión en alguna de estas dos estructuras se hace evidente que entre estas ejercen un control regulador una sobre la otra por lo que, en su ausencia debido a la lesión, este control regulador sobre la conducta deja de existir manifestándose como una AN alterada, es decir, una disfunción en la formación de una memoria apetitiva. Por otro lado, la señal muscarínica en BLA no parece ejercer un control regulador de la conducta ya que no es necesaria durante la neofobia, además, otras estructuras como CeA podría encargarse la conducta neofóbica gracias a las neuronas PKC $\delta^+$  anteriormente descritas. Como ya lo mencionamos antes, la señal colinérgica tiene un papel de modular la señal o información para que llegue correctamente a la BLA (Unal et al., 2015), si la información acerca de que la sacarina no tiene consecuencias post-ingestivas adversas, es decir es segura/apetitiva, no llega correctamente a la BLA, además, que durante un primer encuentro con un estímulo novedoso apetitivo podría ocurrir una activación predominante de pIC y que la información codificada sobre la IC depende de la experiencia con el estímulo (Accolla et al., 2007; Accolla & Carleton, 2008) es posible que la información se codifique y predominen los mecanismos de plasticidad neuronal de la pIC, relacionada con promover conductas aversivas, con una poca participación de

procesos plásticos en la aIC. Lo anteriormente descrito nos permitiría explicar por qué durante S1 el consumo no se ve afectado por la infusión de escopolamina en la BLA, pero durante S2, gracias a nuestro modelo de libre elección, observamos como se altera la AN haciendo que la sacarina se codifique como un estímulo aversivo, aunque se requieren más estudios.

Por otro lado, respecto a los fenómenos que observamos de la señal muscarínica en CeA, se ha visto que activar el circuito pIC-CeA promueve conductas aversivas (Wang et al., 2018) . Sin embargo, esto es controvertido, ya que se ha reportado que distintas subpoblaciones de neuronas amigdalinas promueven conductas de acercamiento o de evitación. Por ejemplo, se ha visto que neuronas PKC $\delta^+$  en la porción capsular de la CeA (CEc) están más activas durante conductas aversivas mientras que las mismas neuronas PKC $\delta^+$ , pero en la amígdala central lateral (CeL) están principalmente activas en conductas apetitivas. Incluso, se ha propuesto una actividad neuronal diferencial sobre la conducta según su distribución rostro-caudal (Fadok et al., 2018). Por eso hoy en día todavía existen dudas sobre las conexiones y circuitería en la que está involucrada. Sin embargo, pese a lo anterior, es probable que en nuestros experimentos el bloqueo de la señal colinérgica en la CeA (especialmente las de la CeL) haya provocado una disfunción de las neuronas PKC $\delta^+$  provocando una expresión de conductas apetitivas en el primer día (S1). Pese a lo anterior, es probable que la metodología farmacológica no sea la más adecuada para describir la microcircutería de la amígdala, pues es probable que tras infusiones de fármacos se vean afectados receptores extrasinápticos, lo cual la optogenética ha demostrado ser de mayor utilidad pues tiene una mayor especificidad espacial y temporal (Unal et al., 2015).

Finalmente, se ha determinado que la IC tiene un papel esencial para la formación de memoria gustativa fungiendo como una región donde se codifican los engramas de los estímulos gustativos, incluso se ha propuesto la posibilidad de un “mapa gustotópico” de los sabores en la IC (Chen et al., 2011; Lin et al., 2015). Sin embargo, este mapa cortical ha sido tema de debate ya que se obtuvieron en animales anestesiados. Además, no se ha podido demostrar que existe una

representación regional o celular para cada uno de los cinco sabores. Un estudio reciente en ratones despiertos, consumiendo sabores de forma voluntaria demostró, mediante imagenología multifotónica, que la representación de los sabores primarios se encontraba espacialmente distribuidos, con alto grado de “sobreapilamiento” (Chen et al., 2021), lo que concuerda con estudios anteriores usando electrofisiología (Yamamoto et al., 1985) o imagenología óptica (Accolla et al., 2007). En su lugar, se ha visto que en la IC se codifica la representación del valor hedónico del estímulo más que a centro quimiosensitivo (Accolla et al., 2007; Kayyal et al., 2019; Wang et al., 2018) y existe evidencia que sugiere que dicha representación del valor hedónico es sujeta a remapeo dependiente de experiencia (Accolla & Carleton, 2008); es decir, si el estímulo genera una conducta apetitiva, este se codificará en la aIC mientras que si se generó una conducta aversiva se codificará en la pIC. Por otro lado, también se ha visto que la AMY, estructura conocida por estar relacionada en la regulación de emociones y miedo (J. Liu et al., 2018), tiene un papel importante en la formación de la memoria gustativa (Núñez-Jaramillo et al., 2010). Además, se ha visto que la señal colinérgica tiene un impacto sobre conductas de aprendizaje y memoria en IC (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003; Miranda et al., 2000) y AMY (Aitta-aho et al., 2018). Si ponemos lo anterior en contraste con nuestros resultados es posible que no solo estemos viendo la alteración en la formación de la memoria gustativa sino un cambio en el valor hedónico de la sacarina, es decir, de ser un estímulo apetitivo pasó a ser un estímulo que se codificó de una forma aversiva. Por ejemplo, existen estudios en donde, mediante infusiones de escopolamina en IC, han visto que para el segundo día de consumo de sacarina no hubo diferencia significativa con el primer día de consumo, proponiendo que a escopolamina tiene un efecto deletéreo sobre la memoria (Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; Ramírez-Lugo et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados no pueden explicarse por un efecto amnésico de la escopolamina en la BLA ya que, si fuera el caso, se hubiera observado un IP similar entre S1 y S2. No obstante, se observó un IP significativamente menor en la condición S2. Nuestro modelo de múltiples bebederos permite a los sujetos escoger entre el estímulo gustativo y agua, posiblemente confirmando mayor validez de

criterio. Por otro lado, anteriormente se había propuesto que la escopolamina puede actuar como US, al menos cuando se inyecta de forma intraperitoneal (Macmahon et al., 1981). Sin embargo, estudios posteriores reportaron que la infusión de escopolamina en la corteza insular no actúa como US inmediatamente después del consumo del sabor novedoso, pues los sujetos control como experimentales consumieron cantidades similares de sacarina al 0.1% (concentración usualmente usada en experimentos de CAS) en los dos días del experimento (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003). Todo lo anterior en conjunto contrasta con nuestros experimentos pues el fenómeno aversivo que vemos en S2, cuando se infunde escopolamina en la BLA, no puede ser explicado por que la escopolamina actúa como US ni que existe un efecto deletéreo sobre la memoria; por lo que nosotros sugerimos que el antagonismo muscarínico en la BLA cambia el procesamiento y codificación del estímulo apetitivo a uno aversivo, es decir, ocurre un cambio en el valor hedónico.

Con lo anterior, nos surgen varias interrogantes: ¿La escopolamina genera realmente un efecto amnésico como lo sugieren los autores antes mencionados? Con nuestro modelo experimental deberíamos observar que tras infusión de escopolamina en CeA hay un consumo y preferencia de sacarina igual que el grupo Vehículo en S1 y para el segundo día de exposición (S2) deberíamos ver como el consumo e IP de sacarina, tanto en CeA como en BLA, se mantiene igual que en S1 en el grupo Escopolamina, lo cual no fue así. Otras preguntas por responder son: ¿Cómo podemos identificar si se trata de una alteración en la percepción del estímulo o una pérdida de miedo ante lo novedoso? ¿Cuáles son los mecanismos moleculares y celulares para que en S1 en ratas con infusión de escopolamina en CeA se genere un fenómeno de familiaridad al estímulo? ¿Cómo podemos asegurarnos que efectivamente el estímulo está siendo tratado como novedoso en S2? ¿Si se formó en ratas con infusión de escopolamina en CeA en ratas con infusión de escopolamina en CeA una memoria aversiva, el animal le otorgará el mismo valor hedónico negativo que un estímulo que sabemos es intrínsecamente negativo como la quinina? Con esto, se hace evidente que es necesario realizar más experimentos para responder a estas interrogantes.

## CONCLUSIONES

El modelo de múltiples bebederos resulta ser eficaz para detectar aversiones sutiles, sin embargo, necesitamos mejorar la metodología ya que tenemos dificultad para evaluar las conductas apetitivas como la AN. Respecto a las concentraciones, la sacarina 0.3% resultó ser la más eficiente para este modelo por lo que seguirá siendo la concentración estándar para futuros experimentos. También es importante mencionar que debido al poco aislamiento social que tuvieron nuestros sujetos experimentales, no tuvo impacto sobre el desarrollo de la tarea de conducta no fue necesario haber realizado alguna tarea conductual adicional ya que hubiera sido de poca utilidad haber evaluado ansiedad o depresión en los sujetos.

Respecto a nuestro primer objetivo particular se demostró que los mAChR's de AMY y BLA no están involucrados en la detección de novedad, pero sí son necesarios para que se forme una memoria apetitiva, ya que de lo contrario la información se utilizará para codificar en el cerebro una memoria aversiva. Esto confirma nuestra primera hipótesis de forma parcial puesto que efectivamente se impidió la formación de una memoria apetitiva. Sin embargo, esperábamos que el consumo fuera el mismo en S1 y S2, según el efecto amnésico de la escopolamina reportado por otros autores, pero sorprendentemente no fue así. Es poco probable que la escopolamina haya actuado como US basándonos en estudios previos que descartaron este efecto. Por lo anterior concluimos que se formó una memoria aversiva y queda pendiente entender los mecanismos moleculares y celulares que hacen posible este fenómeno.

Respecto a nuestro segundo objetivo particular, y contrario a nuestras expectativas, demostramos que los mAChR's de CeA sí participan en la detección de novedad. Sin embargo, para entender qué sucede con la consolidación de esa información en S2 se requieren más estudios. Es poco probable que la escopolamina haya generado un efecto amnésico en S2 para que la sacarina haya sido tratada nuevamente como novedosa basándonos en los resultados de los experimentos en BLA y AMY, sin embargo, debido a que no tenemos datos

suficientes para confirmar esto, no es posible descartarlo. Una explicación alternativa es que tuvieron una pérdida de miedo a lo novedoso en S1 pero esta experiencia generó en los sujetos un condicionamiento aversivo para S2, por lo tanto también hay que hacer experimentos para descartar una dependencia de estado. Con lo anterior nuestra segunda hipótesis es rechazada totalmente pues observamos que si se afecta la adquisición y, probablemente, la consolidación de la información de una memoria apetitiva.

Respecto a nuestro tercer objetivo particular, la oxotremorina a una dosis de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  no tuvo impacto sobre la adquisición ni consolidación de la memoria gustativa. Por lo anterior, nuestra tercera hipótesis fue rechazada. Necesitamos realizar una curva de dosis-respuesta para poder determinar una dosis óptima.

Finalmente, como conclusión general, a pesar de que ninguna de nuestras hipótesis se pudo confirmar por completo, el haber realizado estos experimentos nos ha ayudado a entender mejor el papel que tienen los mAChR's en la conducta neofóbica y el fenómeno de AN. Ahora entendemos que la actividad muscarínica es esencial para la formación de una memoria apetitiva, además, parece tener una participación diferencial sobre BLA y CeA. Esta segregación funcional que tiene la AMY puede estar relacionada con la segregación espacial y funcional que se ha evidenciado en la IC. La tarea de AN es un modelo experimental poco usado para estudiar la memoria gustativa, por lo que es necesario seguir estudiando la actividad muscarínica en el modelo de AN.

## **PERSPECTIVAS**

En primer lugar, una buena forma de reforzar nuestros experimentos sería determinar el valor hedónico del estímulo mediante la evaluación de la percepción de éste usando un contador automatizado de lamidas en el bebedero o "licómetro". Esto nos permitiría apoyar nuestra idea de que antagonizar los receptores muscarínicos promueve un cambio del valor hedónico del estímulo.

Además de lo anterior, se debe de comprobar que estos cambios en el valor hedónico tras manipular la BLA o CeA impactan la IC y que esta codificación de la información depende de la experiencia con el estímulo. El uso de técnicas moleculares permitiría darnos una mayor especificidad espaciotemporal. Por ejemplo, con trazadores retrógrados aplicados en CeA o BLA con la posterior evaluación de actividad neuronal en IC con genes de expresión temprana (p. ej. c-fos) permitirían detectar estos cambios en la codificación en corteza.

Por otro lado, es necesario evaluar si las neuronas PKC $\delta$ <sup>+</sup> en la amígdala, específicamente en CeL, en están reguladas por receptores muscarínicos y de qué forma su antagonismo, o agonismo, impacta sobre la conducta. Esto se podría hacer mediante microscopia fluorescente en donde se identifiquen aquellas neuronas positivas a PKC $\delta$ , mAChR's y c-fos que además reciban un tratamiento con DREADD's para promover o inhibir la activación de los mAChR's.

Por último, es necesario desarrollar mejor la técnica experimental para infundir oxotremorina en la amígdala pues nuestros resultados no tuvieron ningún impacto en la conducta. Incluso tal vez sea más conveniente apuntar a métodos con uso de optogenética o DREADD's para tener más precisión espaciotemporal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, K., Kuroda, M., Narumi, Y., Kobayashi, Y., Itohara, S., Furuichi, T., & Sano, Y. (2020). Cortico-amygdala interaction determines the insular cortical neurons involved in taste memory retrieval. *Molecular Brain*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00646-w>

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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5188-06.2007>

Accolla, R., & Carleton, A. (2008). Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 4010–4015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708927105>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.064>
- Almaraz-Espinoza, A., & Grider, M. H. (2020). Physiology, Long Term Memory. In *StatPearls*.
- Arias, H. R., Targowska-Duda, K. M., García-Colunga, J., & Ortells, M. O. (2021). Is the antidepressant activity of selective serotonin reuptake inhibitors mediated by nicotinic acetylcholine receptors? *Molecules*, *26*(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules26082149>
- Arieli, E., Gerbi, R., Shein-Idelson, M., & Moran, A. (2020). *Temporally-precise basolateral amygdala activation is required for the formation of taste memories in gustatory cortex*. 1–46. <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.013995>
- Basu, S., Alapin, J. M., Dines, M., & Lamprecht, R. (2020). Long-term memory is maintained by continuous activity of Arp2/3 in lateral amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*, *167*(June 2019), 107115. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107115>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2015). Neuroscience: Exploring the brain: Fourth edition. In *Neuroscience: Exploring the Brain: Fourth Edition*.
- Beecher Scoville, W., Milner, B., & Neylan, T. C. (2000). “Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions,” by Memory and the Medial Temporal Lobe: Patient H. M. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, *12*(1), 103–104.
- Benes, C., & Soltoff, S. P. (2001). Modulation of PKC tyrosine phosphorylation and activity in salivary and PC-12 cells by Src kinases. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *280*, 1498–1510. <http://www.ajpcell.org>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bird, C. M., & Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(3), 182–194. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>
- Brosch, T., Sander, D., Clement, F., Deonna, J. A., Fehr, E., & Vuilleumier, P. (2016). *Handbook of Value Perspectives from economics, neuroscience, philosophy, psychology, and sociology*.

- Canolty, R. T., & Knight, R. T. (2010). The functional role of cross-frequency coupling. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(11), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.09.001>
- Chen, K., Kogan, J. F., & Fontanini, A. (2021). Spatially Distributed Representation of Taste Quality in the Gustatory Insular Cortex of Behaving Mice. *Current Biology*, 31(2), 247-256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.014>
- Chen, T. J., Chen, S. S., Wang, D. C., & Hung, H. S. (2016). The Cholinergic Signaling Responsible for the Expression of a Memory-Related Protein in Primary Rat Cortical Neurons. *Journal of Cellular Physiology*, 231(11), 2428–2438. <https://doi.org/10.1002/jcp.25347>
- Chen, X., Gabito, M., Peng, Y., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2011). A Gustotopic Map of Taste Qualities in the Mammalian Brain. *Science*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Corkin, S. (2002). *What's new with the amnesic patient H.M.?* (Vol. 3). [www.nature.com/reviews/neuro](http://www.nature.com/reviews/neuro)
- Cowan, N. (2009). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? Nelson. *NIH Public Access*, 6123(07), 323–338. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00020-9.What](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00020-9.What)
- Dandekar, M. P., Singru, P. S., Kokare, D. M., & Subhedar, N. K. (2009). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide plays a role in the manifestation of depression: Social isolation and olfactory bulbectomy models reveal unifying principles. *Neuropsychopharmacology*, 34(5), 1288–1300. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.201>
- Dani, J. A. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 124, pp. 3–19). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.07.001>
- Dávila, J. C. (2009). El caso de H.M. Una vida sin recuerdos. *Encuentros En La Biología*, 47–48.
- Davis, J. T. (2001). Revising psychoanalytic interpretations of the past. *The International Journal of Psychoanalysis*, 82(3), 449–462. <https://doi.org/10.1516/0ahf-qtgk-v7wk-vqwb>
- Díaz del Guante, M. A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*, 38(3–4).

- Domjan, M., Gillan, D., Domjan, M., & Role, D. G. (1976). Role of Novelty in the Aversion for Increasingly Concentrated Saccharin Solutions I. In *Physiology & Behavior* (Vol. 16). Pergamon Press and Brain Research Publ.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is Acetylcholine Involved in Memory Consolidation of Over-Reinforced Learning? In *Brain Research Bulletin* (Vol. 24). Pergamon Press plc.
- Fadok, J. P., Markovic, M., Tovote, P., & Lüthi, A. (2018). New perspectives on central amygdala function. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.009>
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koellino, R. A. (1955). *Conditioned Aversion to Saccharin Resulting from Exposure to Gamma Radiation*. 122(3160), 157–158.
- Gibbons, J. R., & Sadiq, N. M. (2019). Neuroanatomy, Neural Taste Pathway. *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31424820>
- Gil-Bea, F. J., Solas, M., Mateos, L., Winblad, B., Ramírez, M. J., & Cedazo-Mínguez, A. (2011). Cholinergic hypofunction impairs memory acquisition possibly through hippocampal Arc and BDNF down regulation. *Hippocampus*, 21(9), 999–1009. <https://doi.org/10.1002/hipo.20812>
- Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*, 143(2), 263–279. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90568-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90568-1)
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00066-2)
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02608.x>
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>
- Holloway, Z., Koburov, R., Hawkey, A., & Levin, E. D. (2020). Measuring attention in rats with a visual signal detection task: Signal intensity vs.

- signal duration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 199(November), 173069. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173069>
- Howe, W. M., Gritton, H. J., Lusk, N. A., Roberts, E. A., Hetrick, V. L., Berke, J. D., & Sarter, M. (2017). Acetylcholine release in prefrontal cortex promotes gamma oscillations and theta–gamma coupling during cue detection. *Journal of Neuroscience*, 37(12), 3215–3230. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2737-16.2017>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). *From circuits to behaviour in the amygdala*. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jiang, L., Kundu, S., Lederman, J. D. D., López-Hernández, G. Y. Y., Ballinger, E. C. C., Wang, S., Talmage, D. A. A., & Role, L. W. W. (2016). Cholinergic Signaling Controls Conditioned Fear Behaviors and Enhances Plasticity of Cortical-Amygdala Circuits. *Neuron*, 90(5), 1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.028>
- Kandel, E. R. (2013). *Principles of Neural Science* (Fifth Ed.). McGraw-Hill.
- 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. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0752-19.2019>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Knox, D. (2016). The role of basal forebrain cholinergic neurons in fear and extinction memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 133(9), 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.001>
- Leaney, J. L., Dekker, L. v., & Tinker, A. (2004). Regulation of a G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel by a Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C. *The Journal of Physiology*, 534(2), 367–379.
- Lebois, E. P., Thorn, C., Edgerton, J. R., Popiolek, M., & Xi, S. (2018). Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 136(September 2018), 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.018>
- Lee, S., Lim, J. S., Yun, H. S., Kim, Y., Jeong, S., Hwang, S. D., Kim, J. W., Oh, J., & Kim, J. S. (2021). Dietary supplementation with *Ceriporia lacerata* improves learning and memory in a scopolamine-induced amnesia mouse model. *Food Science and Biotechnology*, 30(8), 1107–1116. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00945-5>

- Lin, J. Y., Amodeo, L. R., Arthurs, J., & Reilly, S. (2012). Taste neophobia and palatability: The pleasure of drinking. *Physiology and Behavior*, *106*(4), 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.03.029>
- Lin, J. Y., & Reilly, S. (2012). Amygdala-gustatory insular cortex connections and taste neophobia. *Behavioural Brain Research*, *235*(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.040>
- Lin, J.-Y., Arthurs, J., & Reilly, S. (2015). Gustatory insular cortex, aversive taste memory and taste neophobia. *Neurobiology of Learning and Memory*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.01.005>
- Lin, J.-Y., Arthurs, J., & Reilly, S. (2018). The effects of amygdala and cortical inactivation on taste neophobia. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*(3), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.08.021>
- Liu, A. K. L., Chang, R. C. C., Pearce, R. K. B., & Gentleman, S. M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, *129*(4), 527–540. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5>
- Liu, J., Lyu, C., Li, M., Liu, T., Song, S., & Tsien, J. Z. (2018). Neural Coding of a Appetitive Food Experiences in the Amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*(August), 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.08.012>
- Lum, J. A. G., Conti-Ramsden, G., Page, D., & Ullman, M. T. (2012). Working, declarative and procedural memory in specific language impairment. *Cortex*, *48*(9), 1138–1154. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.06.001>
- Macmahon, S. W., Blampied, N. M., & Hughes, R. N. (1981). Aversive Stimulus Properties of Scopolamine. In *Pharmacology Biochemistry & Behavior* (Vol. 15).
- McDonald, A. J., & Mascagni, F. (2010). Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. *Brain Structure and Function*, *215*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0272-y>
- McDonald, A. J., & Mascagni, F. (2011). Neuronal localization of M2 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat amygdala. *Neuroscience*, *196*, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.032>
- McKee, T., & McKee, J. R. (2012). The Molecular Basis of Life, Fifth Edition. In *The Molecular Basis of Life*.

- Mesulam, M. M. (1998). From sensation to cognition. *Brain*, 121(6), 1013–1052. <https://doi.org/10.1093/brain/121.6.1013>
- Mickley, G. A., Kenmuir, C. L., Yocom, A. M., Wellman, J. A., & Biada, J. M. (2005). A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Research*, 1051(1–2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.033>
- Migirov, A., & Datta, A. R. (2020). *Physiology, Anticholinergic Reaction*.
- Miranda, M. I., 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. [https://doi.org/10.1016/S0926-6410\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0926-6410(00)00050-1)
- Molero-Chamizo, A., & Rivera-Urbina, G. N. (2017). Effects of lesions in different nuclei of the amygdala on conditioned taste aversion. *Experimental Brain Research*, 235(11), 3517–3526. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-5078-1>
- Molero-Chamizo, A., & Rivera-Urbina, G. N. (2020). Taste Processing: Insights from Animal Models. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(14), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25143112>
- Moraga-Amaro, R., Cortés-Rojas, A., Simon, F., & Stehberg, J. (2014). Role of the insular cortex in taste familiarity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.012>
- Morin, J. P., Rodríguez-Nava, E., Torres-García, V. M., Contreras-Vázquez, O. A., Castellanos-Pérez, C. A., Tovar-Díaz, J., & Roldán-Roldán, G. (2021). Muscarinic receptor signaling in the amygdala is required for conditioned taste aversion. *Neuroscience Letters*, 740. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135466>
- Myslivecek, J. (2021). Social Isolation: How Can the Effects on the Cholinergic System Be Isolated? *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.716460>
- Neath, K. N., Limebeer, C. L., Reilly, S., & Parker, L. A. (2010). Increased liking for a solution is not necessary for the attenuation of neophobia in rats. *Behavioral Neuroscience*, 124(3), 398–404. <https://doi.org/10.1037/a0019505>
- Nikonova, E. v, Jason, ;, Gilliland, D. A., Tanis, K. Q., Podtelezhnikov, A. A., Rigby, A. M., Galante, R. J., Eva, ;, Finney, M., Stone, D. J., Renger, J. J., Pack, A. I., Christopher, ;, & Winrow, J. (2017). Transcriptional Profiling of Cholinergic Neurons From Basal Forebrain Identifies Changes in

Expression of Genes Between Sleep and Wake. *Sleep*, 40(6), 16–20.  
<http://dx.doi.org/10.1093/sleep/>

Niwa, Y., Kanda, G. N., Yamada, R. G., Shi, S., Sunagawa, G. A., Ukai-Tadenuma, M., Fujishima, H., Matsumoto, N., Masumoto, K. hei, Nagano, M., Kasukawa, T., Galloway, J., Perrin, D., Shigeyoshi, Y., Ukai, H., Kiyonari, H., Sumiyama, K., & Ueda, H. R. (2018). Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep. *Cell Reports*, 24(9), 2231-2247.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.082>

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

Parkes, S. L., de la Cruz, V., Bermúdez-Rattoni, F., Coutureau, E., & Ferreira, G. (2014). Differential role of insular cortex muscarinic and NMDA receptors in one-trial appetitive taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 116, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.09.008>

Quirarte, G. L., Cruz-morales, S. E., Cepeda, A., Garcia-montanez, M., Rold, G., & Prado-alcal, R. A. (1994). Effects of Central Muscarinic Blockade on Passive Avoidance: Anterograde Amnesia, State Dependency, or Both? In *BEHAVIORAL AND NEURAL BIOLOGY* (Vol. 62).

Quirarte, G. L., Cruz-Morales, S. E., Cepeda, A., García-Montañez, M., Roldán-Roldán, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1994). Effects of central muscarinic blockade on passive avoidance: Anterograde amnesia, state dependency, or both? *Behavioral and Neural Biology*, 62(1), 15–20.  
[https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(05\)80054-8](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(05)80054-8)

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, 184–193. [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

Ramírez-Lugo, L., Zavala-Vega, S., & Bermúdez-Rattoni, F. (2006). NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learning and Memory*, 13(1), 45–51.  
<https://doi.org/10.1101/lm.103206>

Ramos, J. M. J. (2020). Perirhinal cortex supports both taste neophobia and its attenuation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107264>

- Roldan, G., & Bures, J. (1994). Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 65).
- Roman, C., & Reilly, S. (2007). Effects of insular cortex lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *26*(9), 2627–2632. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05872.x>
- Ros-Simó, C., & Valverde, O. (2012). Early-life social experiences in mice affect emotional behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *102*(3), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.06.001>
- Rush, D. K. (1988). Scopolamine amnesia of passive avoidance: A deficit of information acquisition. *Behavioral and Neural Biology*, *50*(3), 255–274. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(88\)90938-7](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(88)90938-7)
- Salkind, N. (2012). Encyclopedia of Research Design. In *Encyclopedia of Research Design*. <https://doi.org/10.4135/9781412961288>
- Schiff, H. C., Bouhuis, A. L., Yu, K., Penzo, M. A., Li, H., He, M., & Li, B. (2018). An insula-central amygdala circuit for guiding tastant-reinforced choice behavior. *Journal of Neuroscience*, *38*(6), 1418–1429. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1773-17.2017>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. In *Progress in Neurobiology* (Vols. 106–107, pp. 1–16). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- 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*(February), 112010. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112010>
- Small, D. M., & Prescott, J. (2005). Odor/taste integration and the perception of flavor. *Experimental Brain Research*, *166*(3–4), 345–357. <https://doi.org/10.1007/s00221-005-2376-9>
- st. Andre, J., & Reilly, S. (2007). Effects of central and basolateral amygdala lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition. *Behavioral Neuroscience*, *121*(1), 90–99. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.90>

- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., & Simon, F. (2011). The role of the insular cortex in taste function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.005>
- Taylor, P. (2012). Nicotinic Receptors. In *Primer on the Autonomic Nervous System* (pp. 79–82). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00016-0>
- Unal, C. 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>
- Wang, L., Gillis-Smith, S., Peng, Y., Zhang, J., Chen, X., Salzman, C. D., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2018). The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature*, 558(7708), 127–131. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0165-4>
- Workman, J. L., Fonken, L. K., Gusfa, J., Kassouf, K. M., & Nelson, R. J. (2011). Post-weaning environmental enrichment alters affective responses and interacts with behavioral testing to alter nNOS immunoreactivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.07.008>
- Wrenn, R. W. (2001). Carbachol stimulates TYR phosphorylation and association of PKC $\delta$  and PYK2 in pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(4), 882–886. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4657>
- Yamamoto, T., & Ueji, K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(SEPTEMBER 2011), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00076>
- Yamamoto, T., Yuyama, N., Kato, T., & Kawamura, Y. (1985). Gustatory Responses of Cortical Neurons in Rats. II. Information Processing of Taste Quality. *Journal of Neurophysiology*, 53(6). [www.physiology.org/journal/jn](http://www.physiology.org/journal/jn)
- Yiannakas, A., Kolatt Chandran, S., Kayyal, H., Gould, N., Khamaisy, M., & Rosenblum, K. (2021). Parvalbumin interneuron inhibition onto anterior insula neurons projecting to the basolateral amygdala drives aversive taste memory retrieval. *Current Biology*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.010>
- Yiannakas, A., & Rosenblum, K. (2017). The insula and taste learning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(November), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00335>