



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Inducción de memorias aversivas a través de la
activación de la vía amígdala basolateral a corteza

insular

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA :

José Jaimes Cabrera

DIRECTOR:

Dr. Daniel Osorio Gómez



Cd. Mx. 2023



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.

Agradecimientos

Se sabe que somos producto de la colaboración y apoyo de otras personas, luego creo inexplicable que una persona por sí misma pudiera haber hecho todo por propia voluntad, en mi caso agradezco a todas las personas que, con tiempo, apoyo, compañía o en forma material me ayudaron a cumplir este sueño, a todos ellos va dirigido este trabajo

A mi padre Román Jaimes, por todo su apoyo durante todo este proceso, sin ti este trabajo no hubiera sido posible

A mi hermano Pedro, por su sincero apoyo durante los años más difíciles de mi vida

A mi tía Ofelia Jaimes, por su ayuda en los momentos complicados de mi vida, muy seguramente no hubiera podido llegar hasta aquí sin su ayuda

A mi primo Jaime Eduardo Nuñez Jaimes, por su apoyo en el reciente año, por darme asilo cuando más lo necesitaba.

A mis queridos primos Fabiola, Amanda y Ricardo por su incondicional cariño en todas las etapas de mi vida, sin ustedes mi vida no sería la misma

A mi querida tía Araceli Jaimes, por siempre brindarme cariño y apoyo cuando más lo necesitaba.

A mi tío Armando Calderón por siempre recibirme con su cariño en su casa

Al Dr. Bermudez-Rattoni por darme la oportunidad de trabajar y aportar en su laboratorio

Al Dr. Daniel Osorio Gómez por su paciencia y su calidad humana, de igual manera, sin su apoyo y comprensión este trabajo nunca se hubiera completado

A mi gran amigo Emiliano Jiménez, por los años de amistad y su ayuda en momentos complicados de mi vida, sin su sentido del humor y apoyo me hubiera estancado durante más tiempo

A mis entrañables amigos de laboratorio Karina Sugely Saldivar, Aldo Perera López, Arturo Hernández, Karla Medina. Sin su asistencia, apoyo y colaboración también este trabajo nunca se hubiera podido realizar

A mi abuelita Aodalia Vergara, por todo su cariño y apoyo, sin ti mi vida no se podría explicar, gracias por estar siempre conmigo y darme todo tu cariño

A mi madre por su apoyo durante una parte de mi vida

A mis amigos de universidad Martín Migliaro, Jesus Benitez, Ángel de León, Brayan García, Uriel González Bravo, Paola Rivera, Daniel Cerna, Carlos Velázquez, Enrique González Ponce, por hacerme más llevadera esta etapa de mi vida, por su compañía y apoyo

A Alejandro Omar Guerrero, mi gran amigo que me ha ayudado y apoyado en estos tiempos de incertidumbre para ti todo mi aprecio.

A mis amigos de Eureka Soluciones Pedagógicas Guillermo Medina, Erik Escudero y Teresa, Ernesto Olguin, Carlos Villanueva, Hebert Albarran, Michel Alonso, Ricardo Tapia , Maribel, Astrid G. Montiel.

A mis amigos Ricardo Ordoñez, Josue Villaseñor, Xiadani, Alejandro Chavez, Antonio Vargas, Andrés Valdez por todo el apoyo y cariño que recibí de ustedes, sobre todo en los momentos más recientes

A Alexandra Elbakyan por su proyecto de ciencia libre, sin el cual no hubiera podido completar el presente trabajo.

A mis amigos de toda la vida Antonio Vargas, Dayana Rosales, Mauricio Peña, Jose de Jesús Becerril, Claudia Tovar, Daniel Ruíz, Gabriel Nava, Guillermo, Samuel Fernández, Uriel Salazar, Ángel Montiel, Viviana, por recibirme siempre con el mismo cariño, sin ustedes mi vida estaría escasa de momentos felices.

A mis gatas Mila y Leia, por soportar y apoyar en su casa a este imperfecto humano

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA-UNAM), a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). *Evaluación por optogenética de la participación de la proyección amígdala-corteza insular en el establecimiento de la valencia de los estímulos (IA201420) y Participación de la vía amígdala-hipocampo en la formación de memoria contextuales de aversión (IA202922).*

ÍNDICE

Resumen	3
I. Introducción	4
1.1 Concepciones antiguas sobre la memoria	4
1.2 Los albores de la modernidad	7
1.3 Llega la neurociencia moderna	7
II. Clasificación de la memoria	8
2.1 Clasificación por su duración	8
2.2 Clasificación por el tipo de información	11
2.2.1 Memoria declarativa	12
2.2.2 Memoria no declarativa	13
III. Condicionamiento de aversión al sabor	14
3.1 Sustratos neuronales del CAS	15
3.2 Sustratos anatómico-funcional del EC y del EI	15
3.3 Neurobiología del CAS	17
3.3.1 Amígdala	17
3.3.2 El papel del glutamato en el CAS	20
3.3.3 Norepinefrina	22
3.4 Corteza Insular	23
3.4.1 Papel de la CI en el CAS	24
IV. Vía Amígdala basolateral a Corteza insular	25
4.1 Importancia de la reactivación de la vía BLA-CI	26
4.2 Optogenética y memoria	27
V. Planteamiento del problema	27
5.1 Objetivo General	28
5.2 Objetivos particulares	28

5.3	Hipótesis	28
VI.	Metodología	28
6.1	Animales	28
6.2	Infusión de virus e implantación de férulas	29
6.3	Implantación de férulas	29
6.4	Estimulación láser	29
VII.	Procedimientos experimentales	30
7.1	Condicionamiento de aversión al sabor	30
7.2	Condicionamiento de aversión al lugar (CAL)	34
7.3	Análisis de datos	36
7.4	Histología	37
7.5	Tinción de DAPI	37
7.6	Microscopía	38
VIII.	Resultados	38
8.1	Histología	38
8.2	La estimulación optogenética provoca una aversión similar a la administración de LiCl. 39	
8.3	Efectos de la estimulación en el CAL	45
8.3.1	Determinación de la aversión	45
8.3.2	La estimulación optogenética genera aversión al lugar	47
IX.	Discusión	50
X.	Conclusiones	54
XI.	Referencias	55

Abreviaturas

AC	adenilato ciclasa
AID	insula Anterior Dorsal
AIV	insula anterior ventral
APV	ácido fosfovarolico
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-isoxazolpropiónico
CaMKII	calmodulina cinasa II
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
BLA	amígdala Basolateral
BLP	amígdala basolateral posterior
BLV	amígdala basolateral ventral
BN	núcleo basal de meynert
CAL	condicionamiento de aversión al lugar
CI	corteza insular
CAS	condicionamiento de aversión al sabor
CAL	condicionamiento de aversión al lugar
CREB	factor de transcripción dependiente de AMPc
CNQX	cianquixalina
DAG	diacilglicerol
DAPI	diamino-2-fenilindol
Den	dorso piriforme
DRB	diclorobencimidazol 1- β -D-ribofuranósico
EC	estímulo Condicionado
EI	estímulo incondicionado
GABA	ácido amino butírico
IP3	inositol trifosfato
i.p.	intraperitoneal
IG	insula granular
ID	insula disgranular
LC	locus coeruleus
LiCl	cloruro de litio
MCP	memoria de corto plazo
MLP	memoria a largo plazo
NaCl	cloruro de Sodio
NF	núcleos de rafé
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	buffer de Fosfato Sódico
PFA	paraformaldehído
PKC	proteína cinasa C
TTX	tetradotoxina
VTA	área ventral tegmental

Resumen

La participación de la corteza insular (CI) y la amígdala basolateral (BLA) en el establecimiento del condicionamiento al miedo o aversión ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la interacción entre ambas estructuras y su relevancia en la formación de memorias aversivas se mantienen en gran parte desconocida. Durante años, se han realizado diferentes aproximaciones de estudio para comprender el papel de la CI y de la BLA en dichas memorias, entre las que se encuentran la inducción de lesiones, farmacología y electrofisiología; encontrando que dichas áreas son importantes para la adquisición, consolidación y evocación de las memorias de aversión. No obstante, se ha descrito que existen conexiones monosinápticas entre la BLA y la CI, las cuales podrían tener una participación funcional en el establecimiento de memorias aversivas. Para dilucidar el papel de la conexión entre ambas áreas, se utilizó la técnica de optogenética para activar la vía BLA-CI durante un procedimiento de aversión al sabor (CAS) y aversión al lugar (CAL). Se encontró que la activación de la vía BLA-CI es suficiente para el establecimiento de memorias aversivas. Además, existen condiciones particulares para formar memorias gustativas o contextuales de aversión, ya que se requiere de dos estimulaciones optogenéticas de la vía BLA-CI, una que emule la señalización del estímulo incondicionado y una segunda reactivación que estaría involucrada en las señales de consolidación para la inducción de CAS. Por otro lado, el establecimiento del CAL requiere de varias sesiones de entrenamiento para que se lleve a cabo. Lo cual indicaría que la vía es parte de un mecanismo general de aversión y que responde diferencialmente entre la aversión al contexto y al sabor.

I. Introducción

Todos recordamos diferentes tipos de información, sabemos dónde encontrar nuestras cosas cuando llegamos a casa, el cumpleaños de nuestro mejor amigo o hasta el de nuestro gato o perro. Pero, ¿de dónde provienen los recuerdos? ¿Qué hace que tengamos memoria? Estos son algunos de los misterios que mantienen investigando a una parte de la comunidad científica desde hace décadas o mejor dicho milenios. Particularmente, las memorias aversivas son aquellas que nos hacen recordar y alejarnos de aquellas situaciones potencialmente peligrosas; por ejemplo, es vital saber cuál comida nos hizo mal o evitar una calle en la que sufrimos un asalto. De igual manera, recordamos nuestros lugares favoritos, parques o restaurantes donde tuvimos una buena comida o compañía. En ambos casos, las experiencias positivas y aversivas perduran por mucho tiempo.

I.1 Concepciones antiguas sobre la memoria

Para entender en un contexto más amplio el estudio de la memoria, es necesario revisar o rememorar las ideas que se tenían sobre la memoria, desde los primeros pensamientos hasta la neurociencia actual. El misterio de la memoria nos remonta a la Grecia clásica de los siglos V y IV antes de nuestra era; las ideas sobre los fenómenos mentales estaban cargadas por un aura de misticismo. En la cultura griega se representa a la creatividad y demás procesos mentales como capacidades dadas por los dioses; el conocimiento debía venir o permanecer de algún lado, y en este caso se le adjudicaba a la diosa Atenea, patrona de la ciudad de Atenas y deidad asociada a la sabiduría y el conocimiento. En la época clásica, Platón afirmaba que el conocimiento o el origen de las ideas estaba en otro plano, en el *topos uranus* en donde las ideas perfectas se ubican, y en cierta medida los seres humanos podríamos llegar a ellas por medio de un proceso llamado *anamnesis* (Shorojova, 1963; Platón, 2010).

Por el contrario, Aristóteles sostenía que la formación de memorias se podía explicar por medio de la contigüidad, la cual refiere a que se facilita la asociación de dos objetos si estos están cerca en tiempo o espacio. De manera parecida, si dos

objetos tienen cierto grado de similitud uno del otro, ambos objetos podrán asociarse y recordarse. Si bien esta visión se puede considerar en buena parte como precursora de la psicología moderna, fue la visión idealista la que perduró más tiempo en el pensamiento occidental, sobre todo con el auge del cristianismo donde se daba primacía a lo inmaterial en cuanto al pensamiento o los fenómenos psíquicos (Sotelo, 2020). La exploración sobre el origen de las ideas o la formación de la memoria y su relación con el cerebro ocurre durante el Renacimiento. Un ejemplo de ellos ocurrió en la época que vivió Leonardo Da Vinci, donde se pensaba que existían tres ventrículos cerebrales, conectados uno con otros y era aquí donde se formaban las ideas (Luria, 2015) Figura 1.

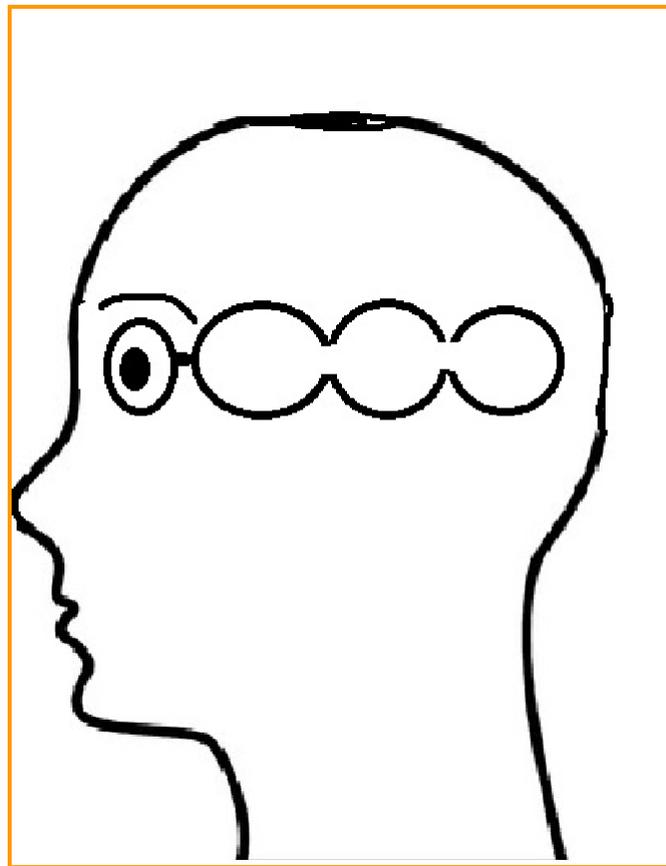


Figura 1. Representación de la visión de la mente, durante la época del Renacimiento. El dibujo es un esquema de uno elaborado por Da Vinci, se pensaba que en los tres ventrículos cerebrales se producían las ideas (Tomado de Luria, 2015).

I.2 Los albores de la modernidad

En la época de la Ilustración, las distintas visiones dieron un giro radical. Descartes, considerado padre del racionalismo, afirmaba que la mente y el cuerpo eran distintos; por un lado, el cuerpo obedecía a mecanismos dirigidos por las leyes de la Física, mientras que la mente estaba sujeta al alma, la cual se encontraba depositada en la glándula pineal (Luria, 2015). Por otra parte, Spinoza llegó a una conclusión diferente, este autor pensaba que la sustancia ideal, lo mental y lo material, era la misma; para él había unidad en el universo. A esta visión se le llamó monismo, la cual defiende la unicidad del mundo en una sola sustancia, a diferencia de Platón o Descartes que hablaban de dos sustancias, lo físico y lo mental (Bunge & Ardila, 2002).

Estas reflexiones en parte dieron pie a la investigación más minuciosa del cerebro humano por distintos fisiólogos de la época tales como Malpighi, que se considera como uno de los primeros en describir neuronas piramidales, y Thomas Willis, quien fue uno de los que propuso que la materia gris y blanca eran los centros de la voluntad (Gross, 1999). Estas concepciones materialistas influyeron en Dennis Diderot el famoso compilador de La Enciclopedia y Le Metrie autor de "L'homme machine", el cual postulaba una visión más radical del materialismo donde el alma es parte del cuerpo y en cierta medida el hombre se podría explicar en términos naturalistas. En este mismo espíritu, Luigi Galvani estudió las propiedades de la electricidad en cuerpos de ranas, ya que les aplicaba una corriente eléctrica en el nervio ciático y observaba contracciones musculares en las extremidades de la rana, demostrando así, que la electricidad podía ser esa fuerza misteriosa que movía el cuerpo (Bennet, 2001).

La concepción materialista no era la dominante en su época, sólo fue a raíz de la Revolución Francesa de 1789 como las concepciones más materialistas se impusieron en el terreno de la investigación. Las nuevas ideas se expandieron por Europa a raíz de las Guerras Napoleónicas que difundieron el pensamiento más

radical de la Revolución, el cual daba en gran medida primacía a la materia. La filosofía materialista encontraba en nuevo mundo en el cual florecer durante el siglo XIX.

Bajo esta misma idea, Joseph Gall pensaba que las facultades mentales o de la personalidad estaban asociadas con las formas del cráneo y a regiones específicas del mismo (Álvarez, 2012). A esta visión, donde se concibe a cierta parte del cerebro como responsable de una facultad, se le llamó localizacionismo. Dicha idea, fue contrapuesta por el holismo, la cual propugnaba que el cerebro operaba como un todo en conjunto, propuesto por Pierre Flourens, que postuló que todas las partes del cerebro eran equipotenciales (Luria, 2015).

I.3 Llega la neurociencia moderna

Al final del siglo XIX, los avances en la fisiología y en la Teoría Celular favorecieron el estudio del cerebro con nuevas técnicas. Este fue el caso de Camilo Golgi, el cual implementó una técnica de tinción que lleva su nombre con la cual pudo vislumbrar un nuevo mundo al que no se tenía acceso. Golgi postuló la Teoría Reticular y posteriormente teorizó sobre el funcionamiento del cerebro, donde planteó que el cerebro estaba compuesto por una red neuronal única y continua. Contrario a esta posición, Santiago Ramón y Cajal propuso que las neuronas son unidades conectadas unas con otras a través de señales, nombradas tiempo después por C.S. Sherrington como "sinapsis". A partir de las evidencias recolectadas por la microscopía de electrones (Sotelo, 2020), se comprobó que el cerebro estaba conformado por unidades discretas. No obstante, con el descubrimiento de las *gap junctions*, que son conexiones muy estrechas que se llegan a dar entre las células, la teoría reticular de Golgi ha tomado un nuevo aire (Sotnikov, 2019); dichas conexiones también tiene un papel en la memoria (Shih & Wu, 2017).

Debido a las aportaciones de Cajal, Charles Sherrington postuló la comunicación entre las neuronas llamada sinapsis, esto motivó el estudio del sistema nervioso para conocer cuáles serían los mecanismos por el cual la transmisión pasaba de neurona a neurona. El resultado de esta búsqueda resultó en el descubrimiento de la acetilcolina en 1921 por el alemán Otto Lewi (Álvarez, 2010). La confirmación de

que la liberación de acetilcolina en conjunto con otros neurotransmisores serían los principales involucrados en la sinapsis llegaría hasta 1954 con la invención del microscopio electrónico (De Robertis & Bennett, 1954). También a inicios del siglo XX, Richard Semon postuló la teoría del engrama, que denomina a la entidad hipotética que almacena un recuerdo dado y que está distribuido en el cerebro, y la euforia, el mecanismo por el cual la memoria era evocada (Robins, 2018). Aunque Semon no tenía los medios para confirmar dichas hipótesis, en recientes años ha revivido su figura debido a los recientes descubrimientos sobre la naturaleza de la memoria (Tonegawa et al., 2015).

La búsqueda del engrama no se limitó a Semon precisamente, también incluyó a Karl Lashley, alumno de John B. Watson y pionero en la técnica de ablación cerebral. A Lashley se le adjudica el haber popularizado el término de engrama, sacado de los trabajos de Semon. A raíz de sus trabajos en ablación cerebral en ratas postuló el principio de “acción de masas” el cual el cerebro funciona como un todo holístico (Josselyn, Köhler & Frankland, 2017).

En 1949, Donald Hebb, un alumno de Lashley, propuso: “Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cerca para excitar una célula B y repetidamente participan disparando, tomará lugar procesos o cambios metabólicos en una o ambas células, de tal modo que la eficacia de A en disparar a B se ve aumentada” (Hebb, 1949). A partir de estos marcos formulados por Hebb, basado en la idea que la memoria podría explicarse como cambios en la fuerza de las conexiones neuronales, el estudio de la memoria se dividió en dos interrogantes (Kandel & Pittenger, 1999):

- ¿En qué estructura del cerebro se integra la memoria? Y ¿cómo es que los circuitos neuronales trabajan juntos, para procesar y evocar las memorias?
- Por otro lado, persiste el problema molecular y celular, esto hace referencia a describir los mecanismos por los cuales, ocurren los cambios sinápticos que favorecen el mantenimiento de la información.

De esta manera, el presente trabajo pretende dilucidar el papel de la vía amígdala basolateral (BLA) – corteza insular (CI) en la formación de memorias aversivas, tratando de aportar más al primer problema, con el fin de describir los circuitos neuronales detrás de la formación de memorias aversivas.

II. Clasificación de la memoria

II.1 Clasificación por su duración

La memoria se puede definir como la codificación, consolidación y la evocación de la información obtenida a través de la experiencia (Kandel, 2013). La codificación de un nuevo trazo de memoria inicia con la transducción química y eléctrica desencadenada por la estimulación sensorial, ya sea auditiva, visual o gustativa, etc. de esta manera se genera una representación neural del estímulo, activando los procesos que implican el establecimiento de una memoria (Leff et al., 2002). Posterior a que la información fue codificada, ésta tiende a consolidarse a través de la modificación de las neuronas mediante la síntesis de proteínas a la que está vinculado este proceso (McGaugh, 2000); por último, dicha información puede ser evocada cuando el organismo lo requiera (Abel & Lattal, 2001).

Una forma de clasificar la memoria es por el tiempo que se mantiene la información. Por un lado, la Memoria de Corto Plazo (MCP), es aquella memoria que puede estar durante horas o minutos, en cambio la Memoria de Largo Plazo (MLP), puede permanecer durante mucho más tiempo, incluso toda la vida; tal como se muestra en la Figura 2. Tanto la MCP como la MLP dependen de la comunicación en las sinapsis y las subsecuentes cascadas de señalización que se desencadenan. Sin embargo, se ha propuesto que la MCP tiene dos características principales (Benfenatti, 2007):

- Cambios en la excitación-secreción en el acoplamiento a nivel presináptico, promovido por cambios en la conductancia en los canales, debidos a la fosforilación y al flujo de Ca^{+2} .
- A nivel postsináptico se encuentra un cambio en la concentración de Ca^{+2} debido a la actividad de los receptores glutamatérgicos/NMDA; además hay cambios en la actividad de diferentes cinasas, como la calmodulina, proteína

cinasa C (PKC) y tirosina cinasas que promueven la fosforilación de receptores, y a su vez generan mensajeros retrógrados, como el óxido nítrico y ácido araquidónico, que terminan llegando a la presinapsis, lo que provoca un aumento en la liberación de neurotransmisores asociados a los potenciales de acción.

En términos generales, la MCP requiere de modificaciones postraduccionales que favorecen la integración de información por un periodo corto (Abel & Lattal, 2001).

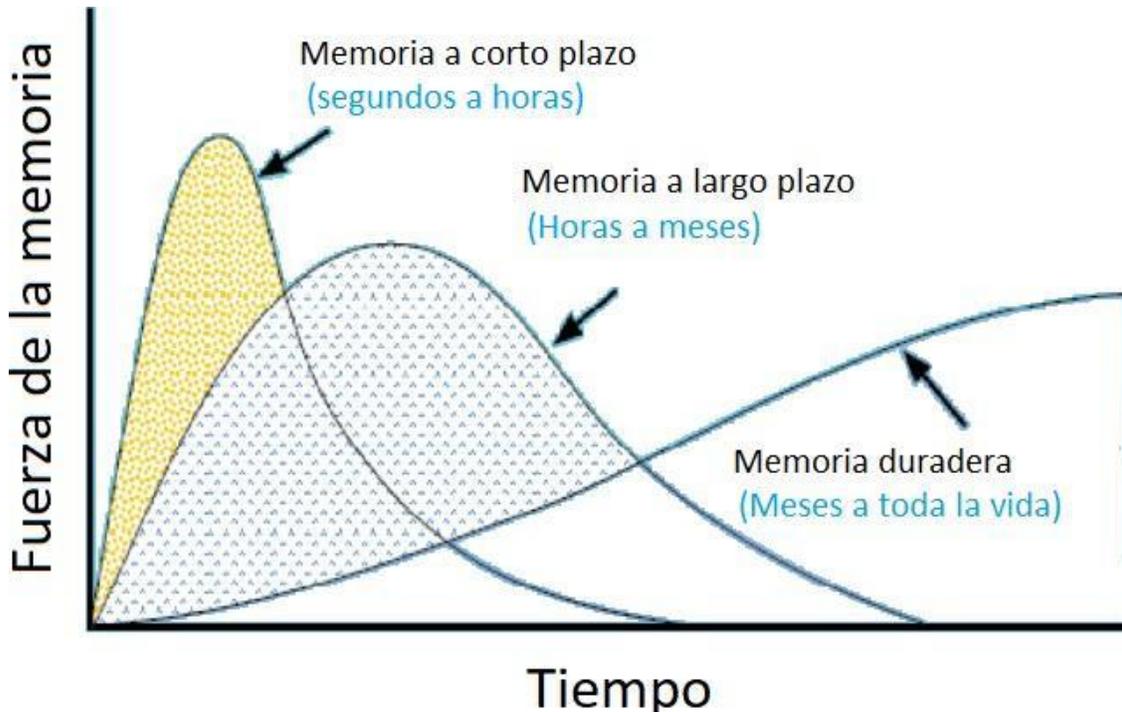


Figura 2. Clasificación de la memoria por su duración (tomado de McGaugh, 2000). La memoria en el corto plazo tiende a tener mayor fuerza(amarillo), si esta se consolida en el corto plazo perdurará por un tiempo mayor (azul), o hasta para toda la vida (blanco).

En el caso de la MLP, es necesaria la producción de nuevas proteínas para que se modifiquen estructuralmente a las neuronas involucradas en el trazo de memoria. Para ello, se necesita una activación constante de las cascadas de señalización celular involucradas en la síntesis de nuevas proteínas o factores de crecimiento (Jarome, & Helmstetter, 2014). Un modelo que ha sido utilizado para comprender

los mecanismos detrás del establecimiento de la MLP es la Potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés), que consiste en un fortalecimiento persistente de la sinapsis como resultado de los patrones de la estimulación de alta frecuencia. Esta actividad provoca un mayor flujo de Ca^{+2} dentro de la neurona debido a un incremento en la activación de receptores NMDA, lo que lleva a la activación de la Ca^{+2} /calmodulina dependiente de calcio (CaMKII) y adenilato ciclasa (AC), lo que conlleva un incremento de cAMP (adenosina monofosfato cíclico), activando a la cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual transloca al núcleo de la célula donde fosforila CREB (factor de transcripción), favoreciendo la expresión de genes de expresión involucrados en el crecimiento axonal, modificación de la estructura sináptica y su función (Hawkins, Kandel & Bailey, 2006; Bozon et al, 2003).

II.2 Clasificación por el tipo de información

En la antigüedad y hasta finales del siglo XIX, la memoria se había pensado como un ente único, no se hacían distinciones entre los diferentes sistemas de memoria que conocemos en la actualidad (Figura 3). No obstante, uno de los psicólogos que empezó a cuestionar esta idea fue William James, el cual postulaba que la memoria podía distinguirse entre recuerdos y hábitos (Kandel & Pittenger, 1999). En los años 50, se registró un caso paradigmático dentro del estudio de la memoria; fue el caso del paciente Henry Gustav Molaison, un hombre al que se le extirpó bilateralmente el lóbulo temporal medial como tratamiento para mitigar los frecuentes ataques epilépticos. Como consecuencia de la cirugía, cursó con una amnesia anterógrada, ya que no podía formar nuevos recuerdos (Scoville & Milner, 1957). Sin embargo, se encontró que podía aprender nuevas tareas motoras, lo que demostraba que la memoria puede clasificarse en diferentes tipos de memoria dependiendo del tipo de información que integraba (Corkin, 1965). Otro caso paradigmático que mostró que había diferentes clases de memoria fue registrado por Tulving (1988), este fue el caso de un motociclista nombrado K.C. que sufrió de una lesión en la parte del hemisferio izquierdo, provocando una amnesia retrógrada; de manera interesante, no podía recordar ningún evento personal pero sí sobre información de su trabajo. Todos estos datos sugieren que en el cerebro se pueden procesar diferentes tipos de información, dando así una clasificación de la memoria dependiendo de la

información que contenga. De tal manera, la memoria puede clasificarse en dos grandes categorías: la memoria declarativa y la memoria no declarativa.

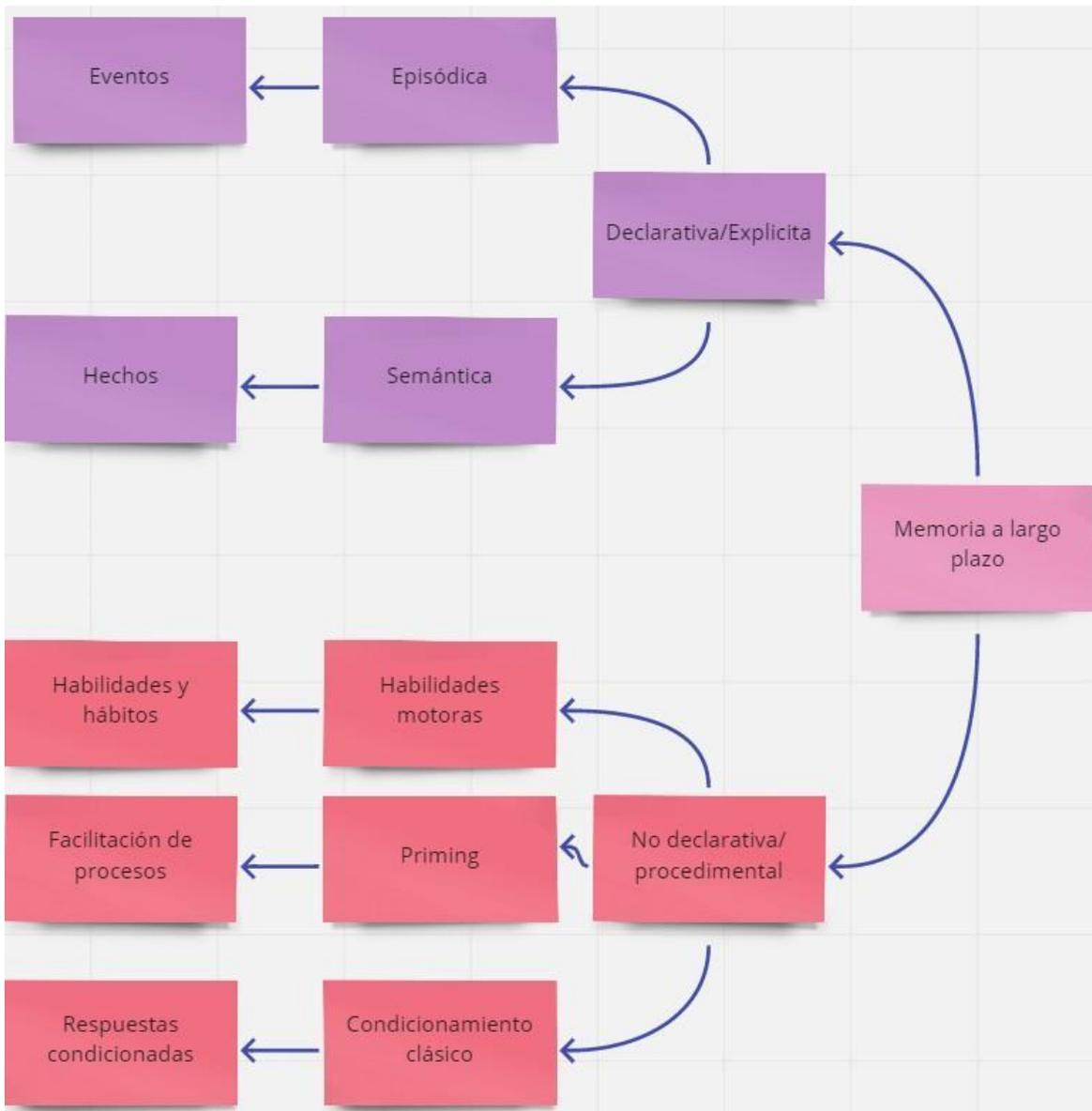


Figura 3. La clasificación de la memoria por el tipo de información. (Adaptado de Bear, Conors & Paradiso, 2016). Dependiendo la información que se adquiere, esta se almacena de distinta forma en la MLP.

II.2.1 Memoria declarativa

La memoria declarativa se puede definir como aquella memoria que está implicada en la adquisición y el uso del conocimiento sobre hechos (semántica) y eventos (episódica) (Tulving,1998). La memoria semántica contiene los conocimientos acerca del mundo, tal como la estructura del ADN o la capital de España (Eiling et al, 2013), es posiblemente la memoria que tenemos más presente cuando vamos a la escuela. Mientras que al recordar cuándo fue nuestro mejor cumpleaños o vacaciones, se debe a la memoria episódica, que se define como aquella memoria que almacena los acontecimientos individuales del organismo (Bear, Connors & Paradiso, 2016).

II.2.2 Memoria no declarativa

Esta memoria se puede considerar como aquella información que se expresa a través de su ejecución (Squire & Zola,1996). Entre las memorias no declarativas están los hábitos y habilidades que se han aprendido a través del tiempo, el priming, y los aprendizajes asociativos. El priming se define como la influencia que tiene la presentación de un estímulo sobre la respuesta de un estímulo similar (Janiszewski & Wyer, 2012), este fenómeno ha sido estudiado más en humanos a través de contenido léxico; por ejemplo, si a unas personas se les exponen imágenes de comida y después se les pide completar palabras incompletas, los sujetos tenderán a completar las palabras con contenido referente a comidas debido a la exposición del estímulo inicial.

Por otra parte, el aprendizaje asociativo se puede definir como el proceso a través el cual los organismos adquieren información acerca de las relaciones entre eventos y entidades en su ambiente (Christian, 2010). Se han clasificado dos tipos de aprendizaje asociativo: el operante o procedimental y el clásico. El condicionamiento operante es un aprendizaje por el cual la frecuencia de la conducta se modifica o se altera debido a las consecuencias que esta produce (Reynolds, 1973). Por otra parte, está el condicionamiento clásico, el cual Iván Pavlov inició su estudio hace más de un siglo. Dicho estudio consistió en provocar la respuesta de salivación cuando se tocaba una campana. Para lograrlo, primero identificó el estímulo

incondicionado (EI), que es aquel estímulo que provoca una respuesta sin necesidad de un aprendizaje previo, como es la comida; conocida como respuesta incondicionada (RI). Para lograr el condicionamiento, presentó el sonido de una campana con la posterior entrega de comida, después de unos ensayos, la campana era el estímulo que anunciaba la llegada de la comida (EI), por lo que el sonido de la campana se convirtió en el Estímulo condicionado (EC) ya que ahora el sonido de la campana era el estímulo que predecía la aparición de la comida y la subsecuente respuesta de salivación o respuesta condicionada (RC) (Rescorla & Wagner, 1972). Entre las múltiples asociaciones que se pueden establecer mediante el condicionamiento clásico, la relación entre la ingesta de alimentos y sus consecuencias post-ingestivas es relevante para la adaptación de los organismos, ya que es a través de este aprendizaje que los individuos reconocen las fuentes de alimentos que son seguros y evitan aquellos que les pudieran causar un daño o molestia al organismo.

III. Condicionamiento de aversión al sabor

Con el descubrimiento y posterior expansión del conocimiento del condicionamiento pavloviano, surgieron diferentes modelos que han permitido explorar la memoria de aversión. Los paradigmas de condicionamiento de aversión son extensamente utilizados para estudiar los procesos neurobiológicos asociados al establecimiento de dicha memoria debido a su simplicidad, y a que en pocas sesiones se pueden tener memorias bastante robustas.

Entre los condicionamientos con un componente aversivo se encuentra el Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS) (Reilly & Schachtman, 2008). El primer registro del uso de esta metodología fue hecho por García y cols, los cuales reportaron que los organismos consumen menos sacarina cuando se les presenta de nueva cuenta, si esta fue previamente pareada con la exposición a radiación (García, Kimeldorf & Koelling, 1957). Desde ese entonces, el CAS ha sido bastante útil para describir las diferentes fases de una memoria, las estructuras involucradas y los mecanismos neurobiológicos asociados al establecimiento de esta tarea, ya que una sola asociación entre el EC-EI puede inducir memorias bastantes fuertes.

III.1 Sustratos neuronales del CAS

Como se vio anteriormente, el condicionamiento clásico trata de las relaciones que se establecen entre dos estímulos, o cómo es que un EC puede predecir la llegada de un EI. En el paradigma del CAS, los animales son expuestos a un sabor novedoso (EC) y posteriormente se les induce malestar gástrico (EI) generalmente provocado por la administración de cloruro de litio (LiCl). En una siguiente presentación, el EC provocará una respuesta de aversión, la cual se registra como un menor consumo del líquido saborizado (Reilly, & Schachtman, 2008). Mediante diferentes técnicas farmacológicas (Bermudez-Rattoni, 2004) y electrofisiológicas (Yamamoto & Yashoshima, 2007), se han identificado las estructuras cerebrales que están asociadas a la codificación de los estímulos gustativos y viscerales, así como al proceso de asociación entre estos.

III.2 Sustratos anatómico-funcional del EC y del EI

La detección de un sabor ocurre a partir de la estimulación de las papilas gustativas que transducen la información gustativa, cada una responde ante los diferentes químicos que componen nuestras comidas. Se han identificado 5 sabores como es el caso de lo dulce, amargo, salado, ácido y umami. Con la estimulación de las células gustativas, la información viaja a través de los pares craneales VII (facial), glosofaríngeo (IX) y vago (X); estos proyectan hacia la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) (Simon et. al., 2006). Después, la información viaja ipsilateralmente al núcleo posteromedial parabraquial (PBN), en este punto de relevo hay conexiones que van al hipotálamo lateral, estría terminal, amígdala central, amígdala basolateral (BLA) y corteza insular (CI) (Reilly, 1999, Shi & Cassell, 1998). Asimismo, es necesario describir las vías involucradas en el procesamiento del estímulo incondicionado (EI) que, en este caso, es una irritación del sistema gastrointestinal. La estimulación por parte del EI es señalizada por el nervio vago, si los agentes químicos que provocaron la irritación del sistema gastrointestinal están presentes en la sangre, estos pueden llegar al Área Postrema (AP), que es una zona donde la barrera hematoencefálica es más permeable que en el resto del cerebro (Reilly, 1999); el AP proyecta hacia el NTS (caudal) (Figura 4), que a su vez, tiene fuertes conexiones con PBN. El PBN manda la información

a la parte ventral posterior del tálamo (VPL), se sabe que el VPL tiene conexiones con la CI y BLA (Bernard, Alden & Besson, 1993). Entre las estructuras descritas anteriormente, la amígdala y la CI tienen una interacción que parece estar implicada en los procesos de adquisición y consolidación de las memorias aversivas.

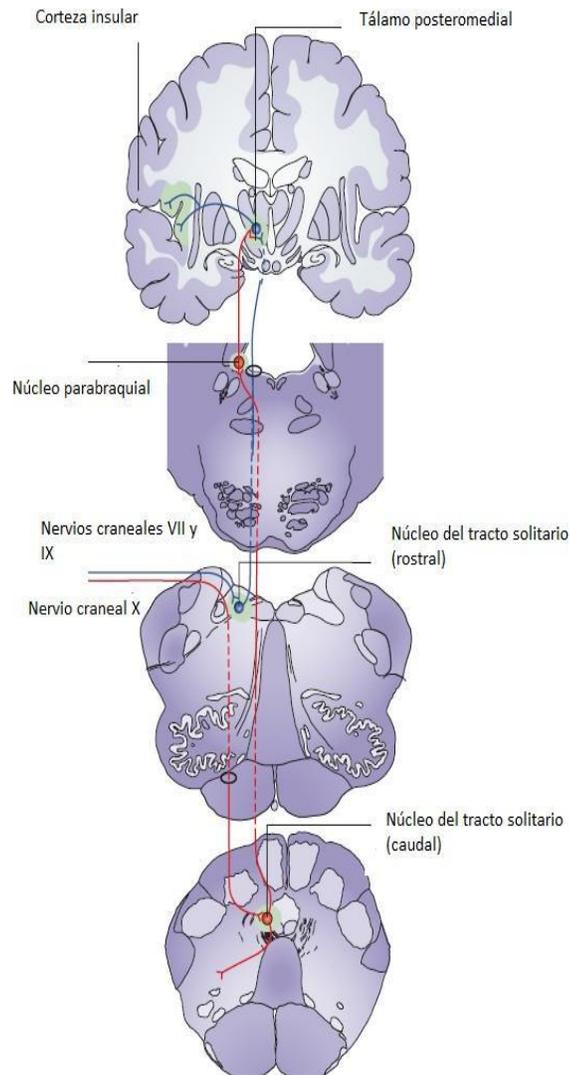


Figura 4. Se muestran los principales relevos en la transmisión de la información gustativa. Se observa como la información del par craneal X (vago), llega a la porción caudal del NTS, mientras que la información proveniente del VII y IX, es procesada por la parte rostral, al final tanto el procesamiento del EC y el EI, es procesado por la amígdala y la corteza insular. Las líneas rojas corresponden a la información correspondiente al EI y las líneas azules al EC (tomado de Bermudez-Rattoni, 2004)

III.3 Neurobiología del CAS

Previamente se describieron las rutas que lleva la información, tanto del EC como del EI, para la formación del CAS; de manera importante, existen estructuras cerebrales que además de participar en la señalización gustativa y visceral, también tienen un papel relevante en los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. En el caso del CAS, la amígdala y la CI poseen una participación fundamental en la formación de memorias gustativas de aversión, pero también están involucradas en memorias con un componente emocional y de reconocimiento (Balderas et al., 2008; McIntyre, Hatfield & McGaugh, 2002), a continuación, se exponen las evidencias y mecanismos que implican a ambas áreas en la formación del CAS.

III.3.1 Amígdala

La amígdala proviene de la palabra griega “amygdale”, que significa almendra. La amígdala fue descrita a finales del siglo XIX por Burdach, quien la nombró así (Reilly & Bornovalova, 2005). La amígdala es una masa de materia gris, ubicada en la porción anterior y medial del lóbulo temporal. Se divide en tres secciones, central (CeN), basolateral (BLA) y medial de acuerdo a su citoarquitectura. La amígdala tiene diferentes tipos de células; en la BLA cerca del 80% son neuronas espinosas glutamatérgicas y el 20% restante son interneuronas GABAérgicas (Duvarci & Pare, 2014). La amígdala central, la cual podemos dividir en central medial (CeM) y central lateral (CeL), tiene en su gran mayoría neuronas GABAérgicas, además las neuronas del CeM se les ha descrito con un largo soma y pocas espinas dendríticas, en cambio las neuronas del CeL muestran un pequeño soma y una mayor cantidad de dendritas y espinas. La amígdala es una estructura evolutivamente conservada y tiene similitudes con otras especies en las que se incluyen hasta la familia de los anuros, que incluye a las ranas (González & Moreno, 2009). Al parecer, es una estructura que ha surgido como integrador de diferentes sentidos, por lo que ha tenido un papel adaptativo al ser un centro que puede reaccionar ante diferentes estímulos interoceptivos como exteroceptivos (Knuepfer, 1995). Diferentes organismos durante su historia evolutiva han desarrollado diferentes partes de la amígdala, pero en el caso de los mamíferos se han encontrado áreas distintivas

como es la amígdala basolateral, esto puede ser debido a su conexión con el sistema olfativo que por lo regular es más sensible en los mamíferos que en otros grupos de animales (Równiak et al., 2021).

Se ha documentado que la amígdala CeN tiene proyecciones hacia el hipotálamo y el tronco encefálico (Fudge & Tucker, 2009), por lo cual se le ha relacionado a conductas autonómicas y viscerales, como lo es la expresión de congelamiento y sobresalto (Kalin, Shelton & Davidson, 2001). La porción medial tiene proyecciones hacia el núcleo parabraquial, núcleo de la estría terminal, tálamo medial y el tronco encefálico (Fudge & Tucker, 2009). Esto muestra que tanto el CeN como la amígdala medial están más conectadas hacia partes más posteriores del cerebro. Además, la BLA es una región importante para la adquisición y el mantenimiento del condicionamiento al miedo. La BLA recibe proyecciones del tronco encefálico monoaminérgico, núcleo intralaminar del tálamo, hipocampo ventral y la corteza orbitofrontal (McDonald, 1992; Huff et al., 2016). Además, tiene proyecciones hacia la CI y corteza orbitofrontal (Gil-Lievana et al., 2020; Schoenbaum, Chiba & Gallagher, 1998) (Figura 5).

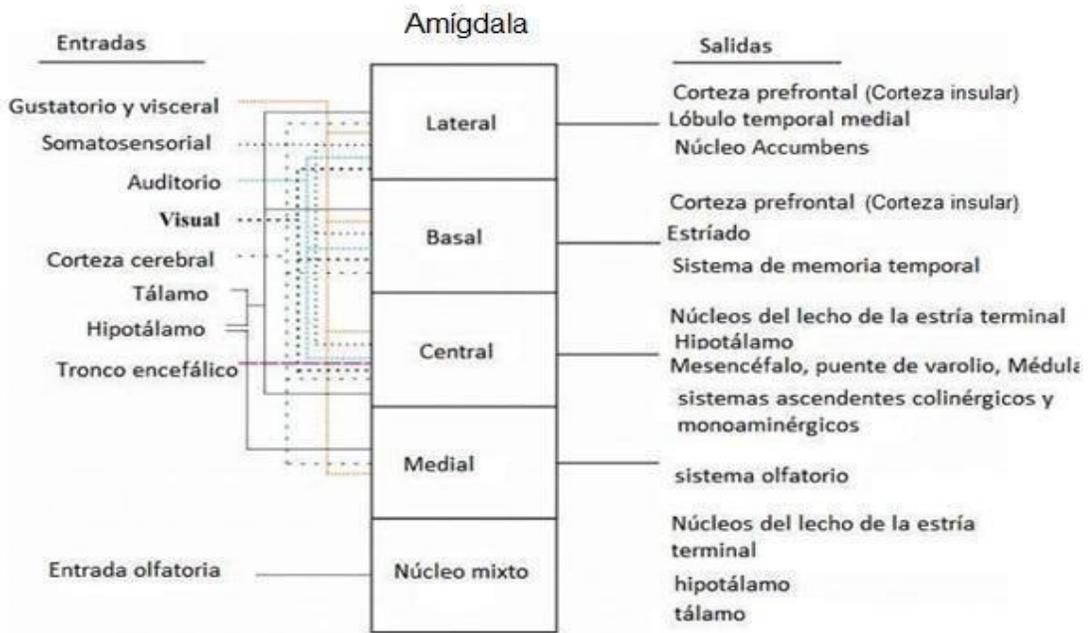


Figura 5. Esquema sobre las conexiones de las diferentes porciones de la amígdala con sus entradas y salidas, los diferentes tipos de flechas muestran las relaciones entre el tipo de estímulo y la estructura de la amígdala que va más asociado (Modificado de Pabba, 2013).

Los primeros indicios sobre el papel de la amígdala en el comportamiento provinieron de Brown & Sharpey-Schafer (1888), los cuales retiraron el lóbulo temporal de monos rhesus y observaron que los animales no reconocían sabores u objetos como consecuencia de la lesión. Años después, Kluver y Bucy (1937), lesionaron la parte temporal del cerebro encontrando un fenómeno similar; aunado a esto, se reportó una alteración en la conducta sexual y en el comportamiento afectivo. Es importante señalar que los animales lesionados ya no desarrollaban miedo ante amenazas como una serpiente. A este tipo de comportamientos se denominó “síndrome de Klüver y Bucy”, y se presenta tanto en primates no humanos como en humanos, ya que las lesiones del lóbulo temporal que incluyen a la amígdala, provoca conductas muy parecidas a las descritas por Klüver y Bucy (Soto-Cabrera, González-Aguilar & Márquez-Romero, 2010). Gran parte de los síntomas asociados o los desórdenes presentados por los monos rhesus tales como la

“masedumbre” y la pérdida de miedo se debió a la lesión en la amígdala (Weiskrantz, 1956).

En la actualidad, hay evidencia que demuestra la participación activa de la amígdala en el miedo, ansiedad, y la emoción (Duvarci & Pare, 2014; Lee et al., 2017). Prueba de esto, se ve en el estudio de Huff, et al. (2013), donde se reportó que la inactivación de la amígdala impide que el animal realice correctamente una tarea de evitación inhibitoria, lo que muestra que la estructura está directamente involucrada en el aprendizaje del miedo. Además, también se considera a la amígdala como parte fundamental para establecer asociaciones entre sabores y malestar gástrico en la memoria de aversión al sabor (Osorio-Gómez, Bermúdez-Rattoni & Guzmán-Ramos, 2010). El establecimiento de memorias aversivas genera cambios en la comunicación, estructura y plasticidad de la amígdala; entre algunos de los cambios reportados, se ha observado que la amígdala expresa genes de expresión temprana (IEG) asociados al proceso de consolidación de la memoria y que facilitan modificaciones estructurales y funcionales (Shepherd & Bear, 2011) necesarias para el mantenimiento del CAS (Panguluri et al., 2012).

III.3.2 El papel del glutamato en el CAS

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (Brady et al., 2011). Su papel en distintas funciones es especialmente importante sobre todo en la memoria. En el caso de la amígdala, gran parte de las neuronas del BLA son glutamatérgicas. La producción de este neurotransmisor empieza a raíz del ciclo de la glucólisis y del ciclo del ácido tricarboxílico, en los cuáles la glucosa es convertida en α -ketoglutarato, que su vez, al agregarse un grupo amina se transforma en glutamina, todo este proceso ocurre dentro de los astrocitos (Hertz, 2013). Esta glutamina es liberada, y llega a la neurona, la glutamina se transforma en glutamato a través de la enzima glutaminasa (Brady et. al., 2011).

Una vez que se ha sintetizado el glutamato, este se libera al espacio sináptico y puede activar a alguno de los receptores glutamatérgicos. Existen 3 tipos de

receptores glutamatérgicos iónicos, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionato), NMDA (N-metil-D-aspartato) y receptores de kainato. Los nombres se derivan por los agonistas que los activan (Purves, 2007). También existen tres clases de receptores glutamatérgicos metabotrópicos divididos en grupos (Niswender & Conn, 2010):

- Grupo I: mGluR1 y mGluR5. Se consideran excitatorios.
- Grupo II: mGluR2 y mGluR3
- Grupo III: mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Tanto el grupo II como el III se les ha identificado como inhibitorios.

La activación de los canales iónicos permite la entrada de iones de Ca^{+2} y Na^{+} al interior de la célula, lo que activa cascadas de señalización celular, que son importantes para la consolidación de la memoria. En general, los receptores glutamatérgicos activan segundos mensajeros debido a la entrada de iones, que modifican la actividad de IP3 (inositol trifosfato, 1,45) y AMPc. Los receptores NMDA y AMPA han sido ampliamente asociados al aprendizaje y la memoria (Riedel, Platt & Micheau, 2003), por lo que su implicación en la memoria de versión ha sido ampliamente estudiada. Como se describió anteriormente, la mayor parte de las neuronas en BLA son glutamatérgicas, y su implicación en tareas de aversión ha sido ampliamente documentada. De manera particular en el CAS, Yasoshima, Morimoto & Yamamoto (2000), utilizaron tres antagonistas glutamatérgicos, APV, CNQX y MCPG. El APV actúa sobre los receptores NMDA y el CNQX sobre los receptores AMPA, bloqueando la entrada de iones a las neuronas; mientras que para inactivar los receptores metabotrópicos glutamatérgicos administraron MCPG. Los resultados muestran que la inactivación de los receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, provoca una disrupción en la adquisición del CAS, lo que significa que los tres tipos de receptores son esenciales para la tarea. Además, describieron que durante la etapa de evocación se requiere de la activación de los receptores AMPA para la correcta ejecución de la tarea.

Asimismo, la adquisición y consolidación de la memoria gustativa de aversión

requiere de la actividad glutamatérgica, prueba de ello es que existe una liberación de glutamato en la BLA después de la inyección de LiCl (Guzmán-Ramos et al. 2012; Miranda et al., 2002). Cabe destacar que la administración de glutamato intra amigdalár pareao con un EI débil incrementa la respuesta del CAS, mostrando así que la liberación de glutamato es necesaria para la señalización del malestar gástrico y la adquisición del CAS (Tucci & Hernández, 1999).

Además, Guzmán-Ramos et al. (2012), mostraron a través de la técnica de microdiálisis, que existen dos eventos de liberación glutamatérgica: tanto en el momento de la inducción de malestar gástrico como a los 45 minutos posteriores a la asociación EC-EI; la segunda liberación de glutamato en la BLA podría estar asociada con la consolidación del CAS, ya que la inyección de un antagonista de los receptores NMDA en la BLA antes de la segunda liberación de glutamato impide la consolidación del CAS.

III.3.3 Norepinefrina

La norepinefrina al ser parte de las catecolaminas, comparte la misma vía de síntesis que la dopamina. La síntesis de norepinefrina ocurre principalmente en el núcleo locus coeruleus (LC), ubicado en el tronco encefálico (Purves, 2007), la cual comienza a partir del aminoácido no esencial, L- tirosina, después la enzima tirosina hidroxilasa forma L-dopa; la enzima dopa descarboxilasa forma la dopamina, y finalmente la enzima dopamina- β -hidroxilasa la convierte en norepinefrina o noradrenalina. Se han identificado 5 receptores, α_1 , α_2 y β_1 , β_2 y β_3 , los cuales están acoplados a proteínas G, al activarse el receptor α_1 se promueve la activación de fosfolipasa C para producir IP3 y DAG que a su vez activan PKC. En caso de los receptores β , su cascada empieza mediante la activación de adenilato ciclasa (AC) que, a su vez, produce AMPc, la cual activa PKA (Stansfield, 2014).

Se ha registrado que el LC aumenta su actividad ante estímulos que desencadenan respuestas de miedo y ansiedad, debido a sus conexiones con la amígdala central y lateral (Gu et al., 2020 & Herry & Johansen, 2014). Además, el papel de la

norepinefrina en la amígdala está ampliamente documentado en diferentes paradigmas de miedo condicionado (Mark et al., 1975, Miranda et al., 2003 & Schiff et al., 2017); ya que la inhibición de los receptores beta-adrenérgicos en la amígdala, mediante la administración de propranolol, afecta negativamente la ejecución de la tarea (Miranda et al., 2003). Además, McIntyre, Hatfield & McGaugh (2002), reportaron que existe una elevación sostenida de norepinefrina hasta por 2 horas después de la adquisición de una tarea de inhibición evitatoria, por lo que estaría implicada en la consolidación de dicha tarea. Adicionalmente, Guzmán-Ramos et al. (2012), encontraron un incremento en la liberación de norepinefrina en la BLA en tres ocasiones: cuando se le presenta el EC (sacarina), durante la administración del LiCl y 45 minutos aproximadamente después de la asociación EC-EI. En el mismo estudio, la administración de propranolol, antagonista de los receptores β -adrenérgicos, en la BLA antes de la tercera liberación de norepinefrina ocasionó un déficit en la consolidación de la tarea. Por lo que se ha hipotetizado que la liberación de norepinefrina está relacionada a los procesos de aversión y de consolidación de la memoria

III.4 Corteza Insular

El término “ínsula” proviene del latín “isla” por su ubicación en el cerebro, ya que se encuentra escondida al interior de la cisura silviana. Se ha descrito que la CI en humanos y primates está plegada profundamente dentro del surco lateral de cada hemisferio (Nieuwenhuys, 2012). En los roedores, la CI está expuesta sobre la superficie lateral del hemisferio, encima de la fisura rinal. Tiene una porción anterior y posterior, con aferencias y eferencias a diferentes estructuras (Gogolla, 2017). Esta área recibe aferencias del LC, núcleos de rafé (NF), área ventral tegmental (VTA) y del núcleo basal de Meynert (BN); a su vez también tiene conexiones recíprocas con otras estructuras de interés como la amígdala, hipotálamo, corteza frontal, somatosensorial, tálamo, bulbo olfatorio e hipocampo (Gogolla, 2017).

La CI está dividida en tres porciones: granular, disgranular y agranular. Esto hace referencia a la presencia o ausencia de capa IV en la corteza, la cual contiene neuronas granulares. La capa granular es la única zona de la corteza insular que no

envía proyecciones a la amígdala. En cambio, la región disgranular tiene una mayor cantidad de conexiones hacia la amígdala (Shi & Cassell, 1998). Además, la región disgranular ha recibido cierta atención pues se ha asociado a funciones de tipo propioceptivo (Forget, Pushparaj & Le Foll, 2010; Ogawa, Murayama & Hasewaga, 1990) y de elección (Pushparaj et al., 2015). La capa agranular está dividida en dos secciones: rostral y ventral. La parte dorsal tiene proyecciones hacia el núcleo parvocelular, media y posterior del tálamo; a través de trazadores anterógrados también se ha confirmado que también tiene conexiones glutamatérgicas hacia la amígdala lateral y basolateral (Shi & Casell, 1998; Kobayashi, 2011).

III.4.1 Papel de la CI en el CAS

La CI tiene un papel fundamental para la correcta adquisición, consolidación (Bermúdez-Rattoni & McGaugh 1991; Schafe & Bernstein, 1998, Yamamoto et. al., 1994 & Bermúdez-Rattoni, 2004) y evocación (Yamamoto, Matsuo & Kawamura, 1980) del CAS; ya que las lesiones en la CI hechas antes del entrenamiento o de la prueba provocan una disminución en el mantenimiento de la tarea. Además, Gallo, Roldan & Bures (1992), inactivaron la CI mediante la infusión de tetrodotoxina (TTX) antes y después de la adquisición, ocasionando una disrupción en el establecimiento de la tarea de CAS. Asimismo, se ha encontrado que la administración de escopolamina, un antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos, impide el establecimiento del CAS (Naor & Dudai, 1995). De manera similar, en un trabajo realizado por Berman et al. (2000), se encontró que los receptores a glutamato, β -adrenérgicos, dopamina y GABA-A en la CI participan en la adquisición de la tarea.

Otros trabajos también han confirmado el papel funcional de la CI en el establecimiento del CAS; por ejemplo, la liberación de glutamato y dopamina posteriores a la adquisición de la tarea, son necesarios para que la tarea se pueda consolidar (Guzman-Ramos et al., 2010). Además, la actividad de AMPc está involucrada en la consolidación de la tarea, ya que al administrar un análogo del AMPc (8-Br-cAMP), se observó una mejora en la ejecución del CAS (Miranda &

McGaugh, 2004). También se ha observado que la inhibición de síntesis de proteínas en la CI impide la consolidación de la tarea del CAS (García-DeLaTorre et al., 2009). De igual manera, la inhibición de la síntesis de proteínas por medio de un inhibidor transcripcional como el DRB ocasiona un déficit en la consolidación del CAS incluso si es administrado 7 horas después de la adquisición (Rodríguez-Blanco, Rivera-Olvera & Escobar, 2019). Asimismo, la expresión de genes de expresión temprana favorece la consolidación de la memoria, ya que la inhibición farmacológica de la expresión de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) en la en CI impide el establecimiento de la tarea (Guzmán-Ramos et al., 2010). En la fase de evocación, los receptores AMPA también están involucrados en la ejecución de la tarea, ya que la inactivación de los receptores AMPA afectó negativamente la realización de la tarea. Por lo que la actividad de los receptores AMPA es esencial para evocar la tarea (Berman et al., 2000). De esta manera, se puede concluir que la CI está involucrada en las tres fases de la memoria, y que depende de diferentes sistemas de neurotransmisores, tales como el glutamatérgico y catecolaminérgico.

IV. Vía Amígdala basolateral a Corteza insular

Como se ha revisado anteriormente, tanto la BLA como la CI están involucradas en la adquisición, consolidación y evocación del CAS; además, ambas estructuras están altamente interconectadas (Gherlach et al, 2019). La proyección de la BLA hacia la CI está reportada desde hace tiempo en un trabajo realizado por Krettek & Price (1974), utilizando un marcador (prolina tritiada) inyectada en el núcleo amigdalino se observaron proyecciones hacia la CI. Esta proyección también participa en el CAS; esto debido a que la activación de la vía asociada al malestar gástrico mostró una respuesta facilitadora en la amígdala y la corteza insular (Yamamoto, Azuma & Kawamura, 1984; Kayyal et al., 2019).

Un estudio más reciente (Abe et al, 2020), mostró que la actividad de CI en la tarea de CAS está estrechamente relacionada a la actividad de la BLA; Además que la actividad singular por sí misma es incapaz para establecer un CAS esto es debido a la actividad concomitante que tiene la amígdala en este proceso, ya que se ha

mostrado que, si la amígdala se inactiva durante el periodo de adquisición, la liberación de dopamina y glutamato no ocurre en CI, y esto trae como consecuencia que no se consolide el CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010 & Guzmán-Ramos et al., 2012). Otro aspecto funcional de esta vía, es que la inducción de estimulación de alta frecuencia en BLA produce LTP en CI a través de la actividad de los receptores NMDA, lo que indicaría que ambas áreas estarían relacionadas (Escobar, Chao & Bermúdez-Rattoni, 1998). Adicionalmente, la estimulación de la vía produce una notable mejoría en el CAS (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000).

IV.1 Importancia de la reactivación de la vía BLA-CI

La reactivación neuronal se ha pensado como un proceso en el cual, la actividad repetida de redes neuronales hace más eficiente las conexiones necesarias para establecer los trazos de memoria, a esto se le ha denominado “teoría de la reactivación del trazo” (Hoffman & McNaughton, 2002). Para el caso del CAS, se ha registrado un aumento en la actividad electrofisiológica en la amígdala, a través de electrodos, después de 30 minutos de haberse realizado el condicionamiento (Yamamoto & Fujimoto, 1991), la cual está vinculada a la actividad de los receptores NMDA dependientes a glutamato. Adicionalmente, en Guzmán-Ramos et al. (2010), se encontró que la liberación de glutamato y dopamina, después de 45 minutos post-adquisición al CAS, es dependiente de la actividad de la amígdala, ya que la inactivación de la amígdala con TTX impide la reactivación neuroquímica en CI, lo que provoca que los animales no puedan consolidar la tarea. Como se mencionó anteriormente, existe una reactivación neuroquímica en la amígdala, observado como una liberación de glutamato y norepinefrina (Guzmán-Ramos et al., 2012). Se ha propuesto que la reactivación asociada a glutamato y catecolaminas desencadena cascadas de actividad que a su vez estaría vinculada a la síntesis de proteínas (Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2011), probablemente esta actividad podría estar vinculada a genes de expresión temprana como Arc que es fundamental para la consolidación del CAS (Guzman-Ramos et al., 2011). También se han registrado oleadas de actividad transcripcional después de 7 horas (Rodríguez-Blanco et al., 2018), lo que indicaría que existen diferentes ventanas de

consolidación posteriores a la adquisición del CAS. Por lo tanto, es probable que el proceso de consolidación del CAS requiere de las reactivaciones para la correcta formación de la tarea.

IV.2 Optogenética y memoria

Para valorar la técnica de optogenética y su relevancia en el estudio de la memoria, es necesario hacer un poco de historia. A inicios del siglo XX el biólogo alemán Richard Semon propuso la teoría del *engrama*, la cual postulaba que la memoria es el conjunto de trazos de memoria que se han formado y que de alguna manera se encontraban en el cerebro. El mecanismo por el cual, estos trazos se evocaban se llamó *ecforia* (Robins, 2018). La teoría de Semon quedó en cierta medida olvidada, ante la incapacidad de ponerla a prueba debido a las técnicas adecuadas para contrastarlas. En el 2005, se desarrolló por primera vez la tecnología para que las neuronas expresen una opsina capaz de ser activada por luz (Zemelman et al., 2005). Las opsinas son proteínas que se activa por la luz (Terakita, 2005), y han sido identificadas en diferentes organismos, siendo la más utilizada la expresada en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Fenno, Yizhar & Deisseroth, 2011). Particularmente, la opsina Channelrodopsin permite el paso de iones de sodio, lo que a su vez la hace útil para despolarizar a una neurona. La expresión neuronal de las opsinas requiere de la secuencia genética de la opsina en un vector, el cual contiene también al promotor por el cual la neurona expresa el canal. El promotor más utilizado es CAMKII que está asociado a la actividad de la célula, por estar regulado por calcio (Fenno, Yizhar & Deisseroth, 2011).

Además de las opsinas que promueven la activación neuronal, existen otras opsinas utilizadas para hiperpolarizar neurona, entre las que se encuentra la arqueopsina que saca iones de potasio y la halorodopsina que es una bomba de iones de cloro (figura 6). Cada opsina anteriormente mencionada, se activa a cierta longitud de onda, por ejemplo, en caso del canal de rodopsina (ChR2) su actividad alcanza un punto máximo aproximadamente a 425 nm (figura 6).

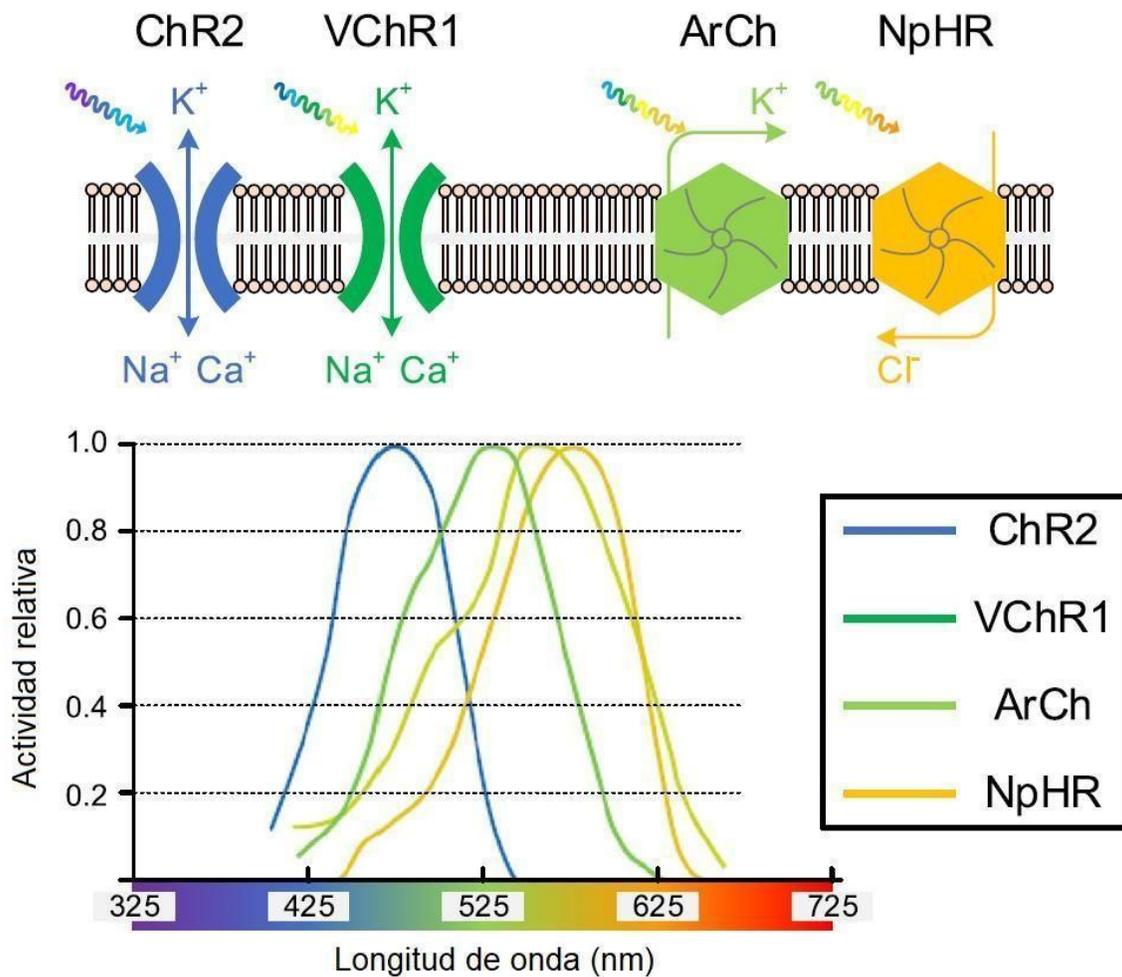


Figura. 6. Funcionamiento de las opsinas. Diferentes opsinas tienen diferente mecanismo y responden a diferente longitud de onda. (Tomado de Lee et al., 2020)

La optogenética ha servido para poner a prueba las propuestas realizadas por Richard Semon sobre la naturaleza de la memoria, ya que con esta técnica también se puede mapear las células que se activan a partir de una experiencia. El auge de la técnica en cierta medida ha podido detectar grupos neuronales asociados al “complejo de engrama” que corresponde a diferentes regiones del cerebro implicadas en aprendizajes complejos, esto ha sido ejemplo del miedo o recuerdo falsos (Josselyn & Tonegawa, 2020). Esto ha sido más explorado por el equipo liderado por Tonegawa, quien ha podido marcar las neuronas implicadas en el establecimiento de memorias asociadas al miedo (Liu et al., 2012). Además, se han podido crear recuerdos falsos activando a las neuronas asociadas a una

conducta de miedo, facilitando el entendimiento de los mecanismos generales del miedo.

IV.2.1 Optogenética y CAS

Desde hace tiempo se sabe que el cerebro tiene ciertas ventanas en la codificación y consolidación de memorias, esto es un problema en la investigación del cerebro ya que se necesita una técnica que pueda alterar o modificar algunas de esas ventanas para obtener información sobre el ¿Qué? ¿Dónde? ¿Cuándo?

¿Cómo? De la memoria. Por ello, la técnica de optogenética ha supuesto una gran ayuda en dilucidar estas preguntas en la formación de la memoria. Debido a este análisis más fino, se ha podido identificar la importancia de la vía que va de BLA a NBM, además que dichas interacciones dependen de tiempos específicos (Arieli et al., 2020), esto igual aplica para las neuronas de BLA y la corteza gustativa (Pietti et al., 2012) es el mismo caso de las neuronas del PBN, que su actividad asociada a un EC, también genera aversión (Carter, Hang & Palmiter, 2015).

También, se ha podido identificar de manera más precisa las diferentes representaciones que tiene el cerebro de los sabores, por ejemplo, al estimular las neuronas que detectan el sabor amargo en moscas asociado con un EC (fructuosa) se puede generar un CAS (Keene & Masek, 2012), de igual manera se ha logrado identificar zonas de la corteza insular que responden al sabor amargo y dulce en ratones, al ser estimuladas dichas áreas los animales respondieron ya sea mostrando menos preferencia o más hacia una sustancia (Peng et al., 2015). De una forma similar, se han inhibido durante la adquisición la corteza insular, mostrando una afectación en la tarea de CAS (Flores et al., 2018). Por lo anterior, ahora se sabe que distintas regiones tienen una interacción temporal precisa que permite al organismo aprender a evitar ciertas sustancias.

V. Planteamiento del problema

Para el establecimiento de memorias aversivas se requiere la participación de diferentes estructuras cerebrales, de las cuales tanto en la amígdala en la porción basolateral como de la CI se les ha identificado como estructuras preponderantes en la formación del CAS. Además, se ha observado que existen cambios neuroquímicos en ambas estructuras que favorecen la consolidación del CAS. También se ha demostrado que existen conexiones recíprocas entre la BLA y la CI y que podrían tener un papel funcional en el establecimiento de memorias aversivas. Por lo tanto, es probable que las conexiones monosinápticas provenientes de la BLA hacia la CI sean una vía relevante para la formación de memorias aversivas. Asimismo, la vía BLA-CI podría ser un circuito que participe de forma general en el establecimiento de memorias aversivas asociadas a sabores como a otros estímulos.

V.1 Justificación

El estudio de las memorias de tipo aversivo, ha sido un tema de especial interés desde la antigüedad. Tanto por su interés filosófico asociado a menudo al sufrimiento como en la neurociencia, por ser el tipo de memorias más robustas. La investigación de este tipo de memorias es un paso necesario para el entendimiento de los procesos neurobiológicos del CAS. De esta manera, la investigación de la implicación de la vía BLA-CI y su reactivación en este proceso, permitiría aumentar nuestros conocimientos acerca del por qué son tan robustas estas memorias en su adquisición y consolidación, lo que tendría implicaciones en el estudio de trastornos psicológicos en los cuales las memorias de tipo aversivo impiden a ciertas personas tener una vida libre de sufrimiento.

V.2 Objetivo General

Determinar si la estimulación optogenética de la vía BLA-CI puede generar el establecimiento de memorias asociativas de aversión asociadas tanto al contexto o al sabor.

V.3 Hipótesis

La estimulación optogenética de la vía BLA-CI provocará memorias aversivas asociadas al lugar y al sabor.

VI. Metodología

VI.1 Animales

Se emplearon ratas tipo Wistar machos de 280 - 300 g (n=86) del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, las cuales fueron puestas en cajas de acrílico, y permanecieron a una temperatura de 22 °C, sometidas a un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. El tratamiento experimental fue durante el día. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo al comité de Ética del Instituto de Fisiología Celular (DOG-158-20), basado en los lineamientos del National Institute of Health (NIH).

VI.2 Infusión de virus e implantación de férulas

Para la infusión del virus, se anestesiaron a los animales con ketamina (70 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), para después colocarlos en un aparato estereotáxico. Se hicieron trépanos bilaterales en el cráneo, a la altura de la BLA en las coordenadas AP: -2.8mm, L: \pm 5mm, DV: -5mm respecto a Bregma (Paxinos & Watson, 1998). Para infundir los vectores virales se usaron dos jeringas de microinyección de 10 μ L (Hamilton Co, EUA) montadas en una bomba de infusión (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). El volumen total administrado de los vectores AAV-CaMKII-hChR2-eYFP y AAV-CaMKII-eYFP fue de 0.5 μ L bilateralmente y administrados a

una velocidad de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, se dejó un tiempo de difusión de 3 minutos posterior a la inyección. Las inyecciones se realizaron mediante agujas dentales que descendieron DV: -7.8mm. Los animales tuvieron un periodo de 3 semanas de recuperación para la expresión óptima del vector.

VI.3 Implantación de férulas

En la misma cirugía, se implantaron bilateralmente férulas que contenían una fibra óptica de 9 mm (Thorlabs) en las coordenadas de CI AP: +1.2mm, L: \pm 5.5mm, DV : -5mm (Paxinos & Watson, 2006), éstas fueron fijadas con cemento dental acrílico y tornillos.

VI.4 Estimulación láser

Después del tiempo de recuperación, los animales fueron estimulados optogenéticamente durante los experimentos conductuales. Para estimular las terminales que expresaron la opsina ChR2 del vector AAV-CaMKII-hChR2-eYFP, se utilizó un láser azul y de potencia 50mW (Laser Glow Technologies) ajustado a 10 mW. El láser a su vez fue conectado a un estimulador programado con una tarjeta arduino para que los pulsos fueran de 20 Hz (45 ms apagado, 5 ms encendido). Para cada estimulación, el láser permaneció encendido por 10 minutos (LaLumiere, 2014). Esto fue necesario, ya que en otros estudios se ha reportado que 20 Hz son los necesarios para generar cambios en la amígdala basolateral (Johansen, Hamanaka & Ledoux, 2010).

VII. Procedimientos experimentales

VII.1 Condicionamiento de aversión al sabor

Una vez recuperados de la cirugía, los animales fueron privados de agua durante 24 hrs. Posteriormente, los animales fueron dotados de agua a las 10:00 hrs. con dos bebederos de agua con 30 mL cada uno durante 15 minutos, se registró el consumo de agua para establecer una línea basal de consumo durante tres días. Por la tarde, a las 18:00 hrs, los animales fueron expuestos a un bebedero con 15

mL de agua para evitar la deshidratación. En el día 4 se realizó la adquisición de CAS en donde se les presentaron dos bebederos de 30 mL con sacarina al 0.1% por 15 minutos. Adicionalmente, se agregó el grupo NaCl, día de la adquisición recibió una inyección intraperitoneal de solución salina [NaCl (0.15 M, 7.5 mL/Kg) 15 minutos después de haber sido expuesto a la sacarina. También se agregó, el grupo LiCl el cual recibió una inyección intraperitoneal de cloruro de litio [LiCl (0.15 M, 7.5 mL/Kg)] 15 minutos después de ser expuesto a la sacarina.

Para los grupos de optogenética, siguieron el mismo procedimiento que los anteriores mencionados en NaCl y LiCl, pero con diferencia que quince minutos después del consumo se estimuló la vía BLA-CI (Sac+Est1+Est2) mediante estimulación láser por 10 minutos, esto se realizó para emular el componente aversivo que se utilizó en un anterior protocolo (Guzmán-Ramos et al., 2010); 30 minutos después de la primera estimulación, la vía BLA-CI fue estimulada de nueva cuenta por 10 minutos. En los dos días que siguieron se les suministró agua con el mismo régimen, dos bebederos de agua a las 10 hrs y un bebedero a las 18:00 horas (Figura 7). En el séptimo día se realizó la prueba de Memoria de Largo Plazo (MLP), la cual consistió en presentar dos bebederos de 30 mL, uno con sacarina al 0.1% y el otro con agua. Se calculó el índice de preferencia con la siguiente fórmula: (Sacarina consumida/ sacarina + agua).

Se formaron otros dos grupos llamados “Sac + est1” y “Sac + est2”, en el primer grupo se realizó solo una estimulación, con la cual se pretende demostrar que la reactivación a través de la estimulación es necesaria para el establecimiento del CAS. En el caso de Sac + est2, se realizó la estimulación después de los 45 minutos, durante el periodo de reactivación que se ha descrito (Ver apartado 4.1); de esta manera se pretende demostrar que tanto la actividad asociada a la adquisición como en la reactivación en conjunto son necesarias para la formación de una memoria aversiva. También fue necesario saber si una sola estimulación prolongada sin reactivación sería capaz de formar un CAS. Para ello, el grupo denominado “Sac + estimulación prolongada” recibió una estimulación optogenética de 20 minutos continuos, 15 minutos después de que se les presentara la sacarina. Dicho grupo

demostraría si una sola activación prolongada, equivalente a dos estimaciones, sería capaz de formar un CAS (Tabla 1).

El último grupo eYFP, es un control el cual tiene como diferencia que el vector no expresa la opsina que es sensible a la luz del láser, sin embargo, cursó con el mismo tratamiento conductual y de estimulación.

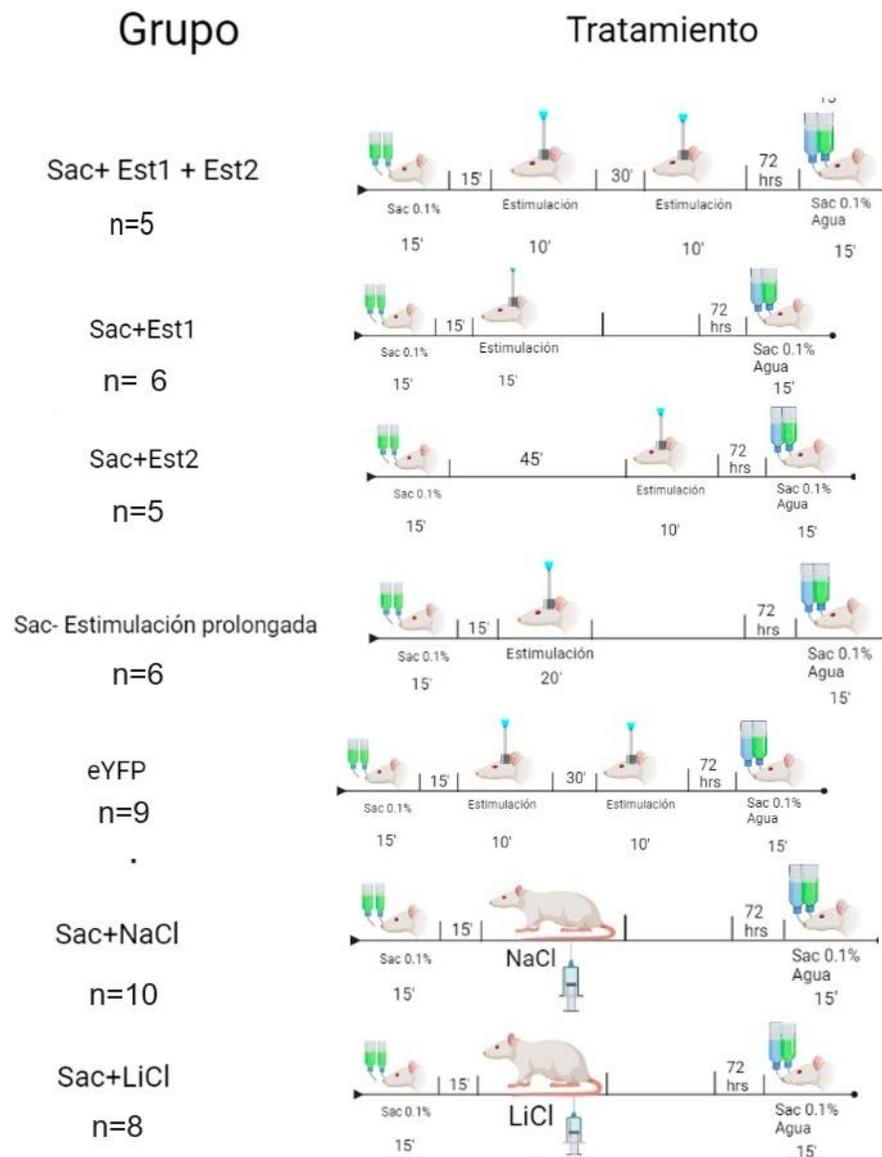


Figura 7. Representación del procedimiento de CAS con los diferentes grupos.

Grupo	Descripción	Dosis/ Intensidad
Sac+NaCl	Presentación de sacarina por 15 minutos y 15 minutos después recibirán una i.p. de solución salina	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) NaCl (0.15 M, 7.5 mL/Kg) i.p.
Sac + LiCl (0.15 M)	Presentación de sacarina por 15 minutos y 15 minutos después recibirán una i.p. de LiCl	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) LiCl (0.15 M, 7.5 mL/Kg) i.p.
Sac + Estimulación prolongada	Presentación de sacarina por 15 minutos y 15 minutos después recibirán una estimulación optogenética prolongada.	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) Estimulación optogenética (20 min, 10 mW /20 Hz)
Sac + Est1 + Est2	Presentación de sacarina por 15 minutos y 15 minutos después recibirán una estimulación optogenética de 10 min, 30 minutos después recibirán una segunda estimulación optogenética	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) Estimulación optogenética 1 (10 min,10 mW/20 Hz) + Estimulación optogenética 2 (10 min,10 mW/20 Hz)
Sac + Est1	Presentación de sacarina por 15 minutos y 15 minutos después recibirán una estimulación optogenética de 10 min	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) Estimulación optogenética (10 min, 10 mW/20 Hz)

Sac + Est2	Presentación de sacarina por 15 minutos y 45 minutos después recibirán una estimulación optogenética de 10 min	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) Estimulación optogenética (10 min, 10 mW/20 Hz)
eYFP AAV-CamKII-eYFP	Presentación de sacarina por 15 min y 15 min después recibirán una estimulación optogenética de 10 min, 30 min después recibirán una segunda estimulación optogenética en animales que solo expresan la proteína reportera	Sacarina (30 mL a una concentración de 0.1%) Estimulación optogenética 1 (10 min, 10 mW/20 Hz) + Estimulación optogenética 2 (10 min, 10 mW/20 Hz)

Tabla 1. Grupos del experimento de condicionamiento de aversión al sabor (CAS).

VII.2 Condicionamiento de aversión al lugar (CAL)

Para realizar el paradigma de aversión al lugar (CAL) se utilizó una caja de dimensiones (95x25x50 cm), la cual está dividida en tres compartimentos, blanco, gris y negro. Los compartimentos blanco y negro tuvieron rejillas y señales táctiles para su discriminación. Este procedimiento fue llevado a cabo con otro conjunto de ratas que se les infundió el mismo vector que las anteriores ratas, y también se les implantó bilateralmente las férulas donde recibieron la estimulación laser (Figura 8). En un principio, se determinaron el número de adquisiciones necesarias para generar aversión al lugar, para ello en el día 1, se realizó el pretest donde los animales exploraron libremente la arena de exploración y se registró el tiempo de permanencia para cada sujeto en los compartimentos, el ensayo duró 10 minutos. En el día 2, los animales fueron confinados al compartimento negro donde se realizó una estimulación optogenética bilateral de la vía BLA-CI durante 10 minutos, los sujetos fueron devueltos a su caja hogar durante 30 minutos, y después se les colocó por 10 minutos en la zona de menor preferencia. Dependiendo del grupo, los

animales fueron expuestos entre 1 a 3 ensayos donde fueron estimulados optogenéticamente. En el postest se les dejó a los animales pasar por los diferentes compartimentos durante 10 minutos y se registró su tiempo de permanencia en cada compartimento.

Un grupo de animales recibió una administración intraperitoneal de LiCl. Para ello, en el día 2 se administró LiCl [0.4 M (7.5 mL/Kg)] en el lugar preferido, por 10 minutos. Después de 4 horas, los animales fueron administrados con solución salina (7.5 mL/Kg) en el lugar no preferido. El día de la prueba, los animales exploraron libremente por 10 minutos, y se registró el tiempo de permanencia entre los compartimentos blanco y negro (Figura 8).

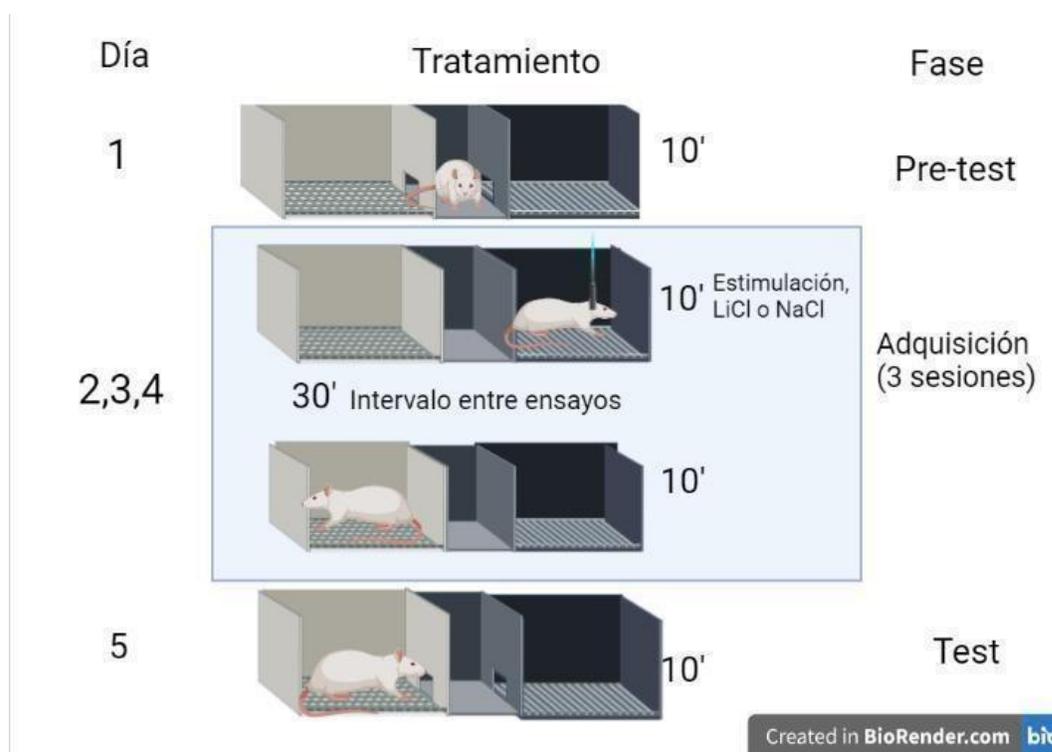


Figura 8. Representación esquemática del procedimiento del CAL, con sus diferentes fases y tratamientos que se realizaron dependiendo el día (estimulación bilateral, NaCl, LiCl y eYFP). Para los grupos de NaCl y LiCl el intervalo entre ensayos fue de 4 horas.

Para comprobar que la aversión se debe al malestar gástrico y no a la inyección i.p., se realizó un grupo control a los que se les administró solución salina [(7.5 mg/Kg NaCl)]. También se añadió el grupo eYFP, que es el vector que no expresa la opsina sensible a la luz, pero se utiliza como control.

Para medir la aversión a un compartimento en específico, se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de preferencia: $(\text{lugar preferido durante el pre test} / [\text{lado blanco} + \text{lado gris} + \text{lado negro}]) \times 100$. El porcentaje de cambio respecto al pretest es una medida que indica que tanto cambió el comportamiento el animal después de los tratamientos, para ello se siguió la siguiente fórmula (Porcentaje de cambio = $(\% \text{ post test} - \% \text{ pre test})$). Por último, se quiso saber qué grupo a partir de la estimulación, era capaz de provocar mayor aversión entre los animales que componían cada grupo. Para ello, se formaron tres grupos, los cuales tenían un criterio de inclusión cada uno (Preferencia > 10%), neutralidad (entre el 10% y -10%) y aversión (Preferencia % < -10%) (Cullity et. al., 2021) (Tabla 2).

Se determinó no añadir el grupo LiCl + optogenética, porque ya existe un estudio anterior sobre la modulación de glutamato sobre la actividad de la vía BLA-CI en una tarea de CAS, se encontró una mayor aversión (Miranda et al., 2005). Adicionalmente, existe otro estudio con la administración de agonistas a receptores β -adrenérgicos y glutamato en la amígdala (Osorio-Gómez et al., 2019), se encontró al igual que el anterior estudio una mayor aversión, por lo que una estimulación optogenética en la misma vía muy posiblemente ocasionaría el mismo resultado.

Grupo	Descripción	Dosis/ Intensidad
NaCl n=6	Se inyectó NaCl como control.	(7.5 mg/Kg NaCl)
STIM n=9	Se hicieron 3 grupos dependiendo del número de adquisiciones (1 ADQ, 2 ADQ y 3 ADQ).	Estimulación optogenética (10 min, 10 mW /20 Hz)
LiCl n=5	Grupo control-positivo, se indujo un CAL asociado al contexto inyectando LiCl.	(LiCl 0.4 M, 7.5mL/Kg)
eYFP n=8	Estimulación optogenética de animales que no expresaron la opsina.	Estimulación optogenética (10 min, 10 mW/20 Hz)

Tabla 2. Grupos experimentales del CAL.

VII.3 Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó el software Prisma 8. Para el CAS y CAL, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias entre los grupos, para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró una $p < 0.05$ como valor significativo para las diferencias entre los grupos.

VII.4 Histología

Después de haber terminado los experimentos, los animales fueron perfundidos con el fin de extraer el cerebro para los análisis histológicos. Para ello, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico i.p. y, a través de una jeringa insertada en el ápex del corazón de la rata, se les infundió con solución salina al 0.9 % durante 15 minutos. Después de haber terminado este procedimiento, se infundió paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en buffer de fosfato sódico (PBS, por sus siglas en inglés). Al finalizar, el cerebro fue removido y se colocó en un envase de 15 mL de PFA al 4% disuelto en PBS. Para crioproteger los tejidos, el cerebro fue colocado en un gradiente de sacarosa y PBS durante tres días, con concentraciones de 10%, 20% y 30%. Se cortaron los cerebros a 40 μm con un criostato (Leica CM

1520, EUA) y las muestras se conservaron con PBS para su posterior tinción.

VII.5 Tinción de DAPI

Los tejidos fueron teñidos con DAPI (4', 6'Diaminide-2'-phenylindole dihydrochloride), que es un marcador fluorescente que se une a adenina y timina, por lo que es útil para marcar núcleos celulares. Para ello, se utilizó un protocolo que consiste en 3 lavados con PBS, 10 minutos para cada uno. Terminando esto, los tejidos fueron inmersos en DAPI (300 nM) durante 15 minutos. Al finalizar, se realizaron tres lavados con PBS, similares a los descritos anteriormente; posteriormente, los tejidos fueron montados en portaobjetos con un medio de montaje utilizado para preservar la fluorescencia de los tejidos (DAKO; Abcam, UK).

VII.6 Microscopía

Para analizar los tejidos tratados con la tinción DAPI y la expresión de eYFP, se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss, EUA) del Departamento de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular.

VIII. Resultados

VIII.1 Histología

Tal como se describió en la sección de metodología (véase apartado 6.2 Infusión de virus e implantación de férulas), la infusión se realizó en la amígdala basolateral. Se encontró señal de eYFP en dicha estructura, como se indica en la figura 9, de igual manera se observó señal en CI (Figura 10). Indicando la expresión del vector desde BLA a CI.

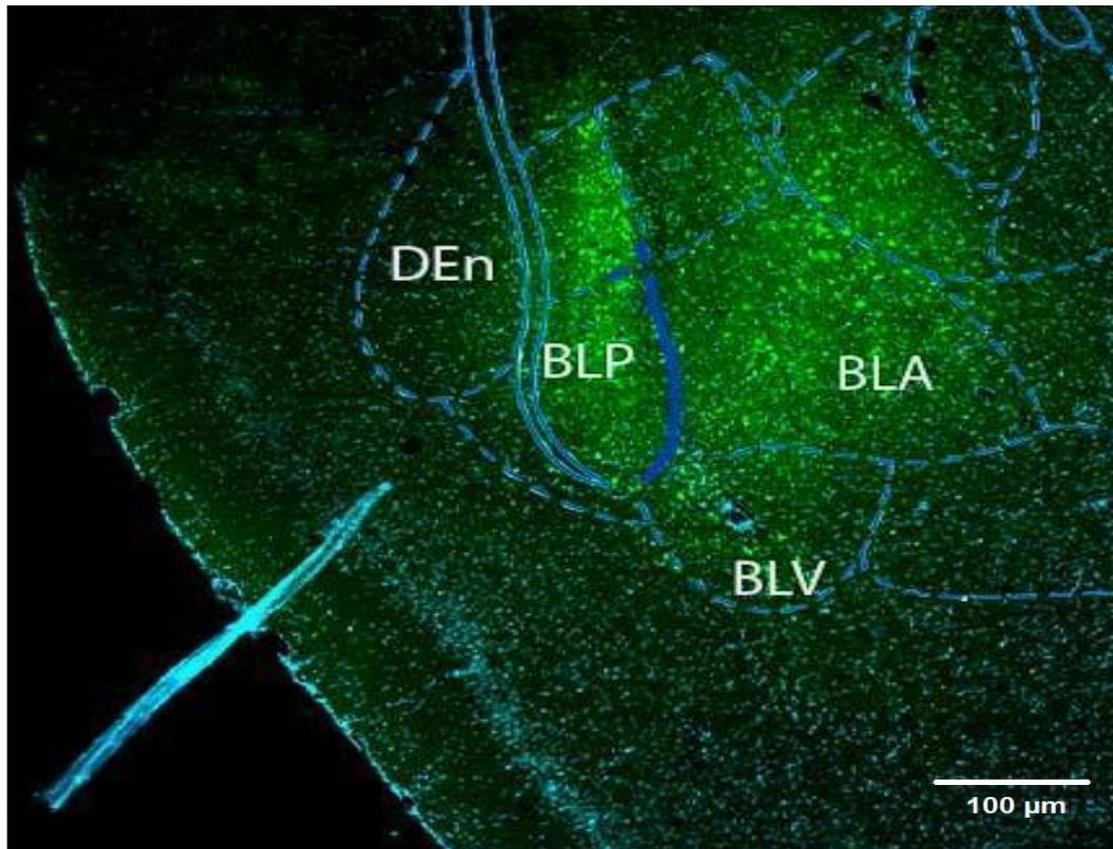


Figura 9. Vista coronal de la amígdala basolateral. Se muestra la expresión de eYFP en la zona de la amígdala. Abrev. amígdala basolateral (BLA), dorso piriforme (DEn), amígdala basolateral posterior (BLP), amígdala basolateral ventral (BLV).

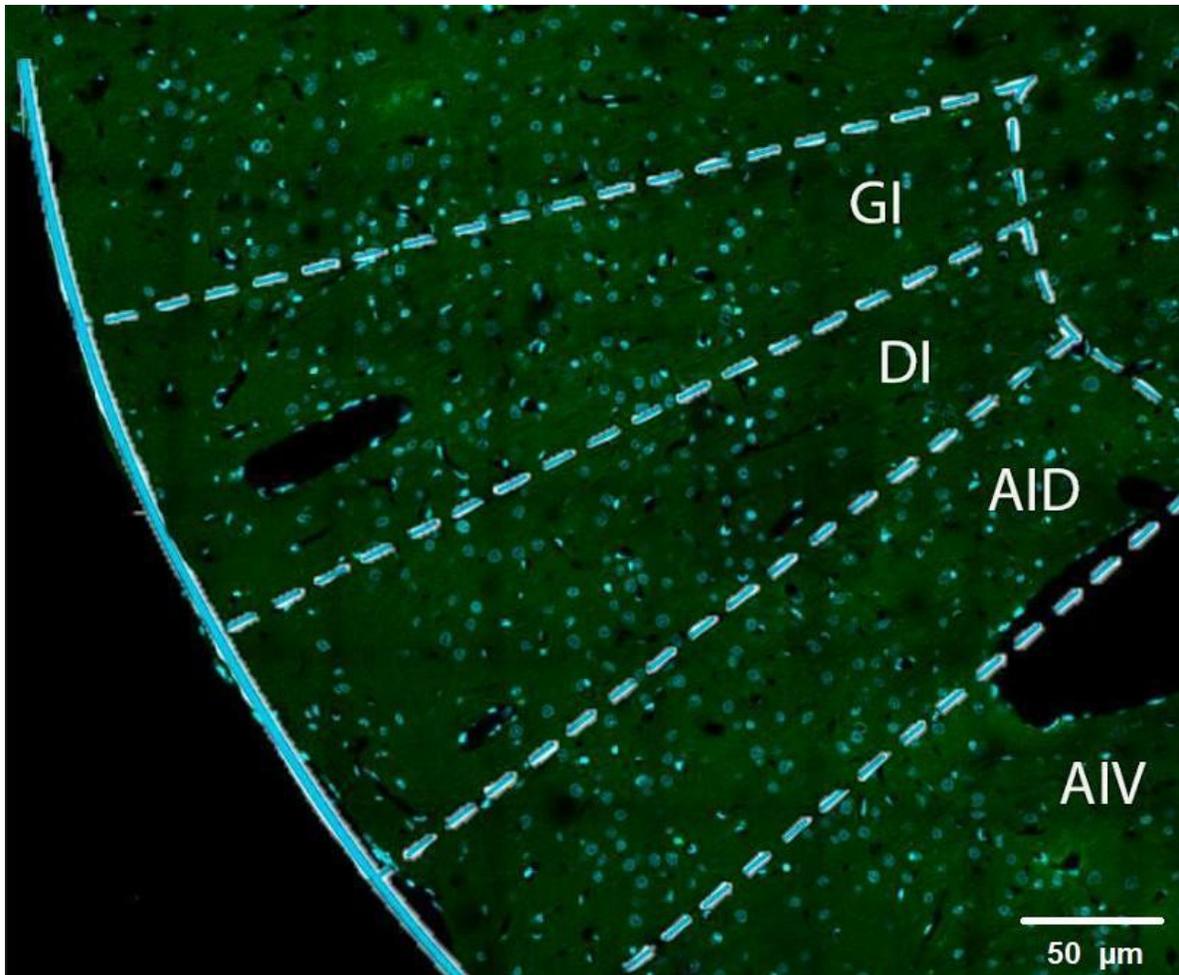


Figura 10. Vista coronal de la corteza insular. Se observa señal de eYFP, lo que indica que son las terminales sinápticas provenientes de BLA. Abrev. Ínsula granular (GI), ínsula disgranular (DI), ínsula anterior dorsal (AID), ínsula anterior ventral (AIV).

VIII.2 La estimulación optogenética provoca una aversión similar a la administración de LiCl.

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los consumos de los distintos grupos durante la línea basal de consumo de agua.

($H_{(7,49)} = 10.92$ $p > 0.05$) (Figura 11).

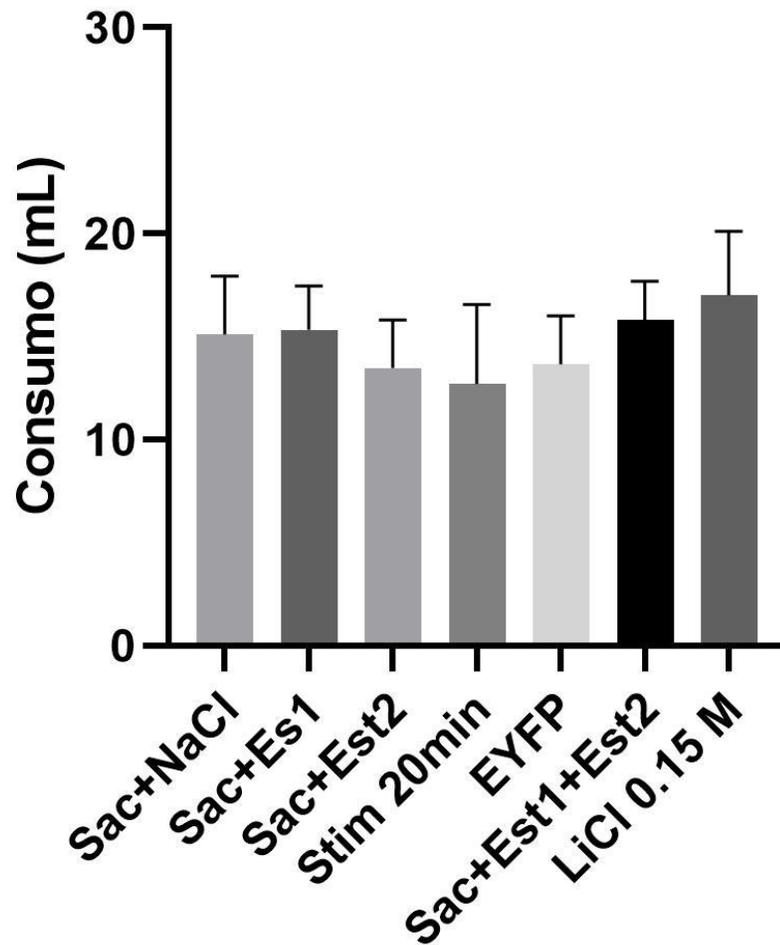


Figura 11. Líneas basales de consumo. El consumo de agua es similar entre los grupos en los días previos a la adquisición ($H_{(7,49)} = 10.92$ $p > 0.05$). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar

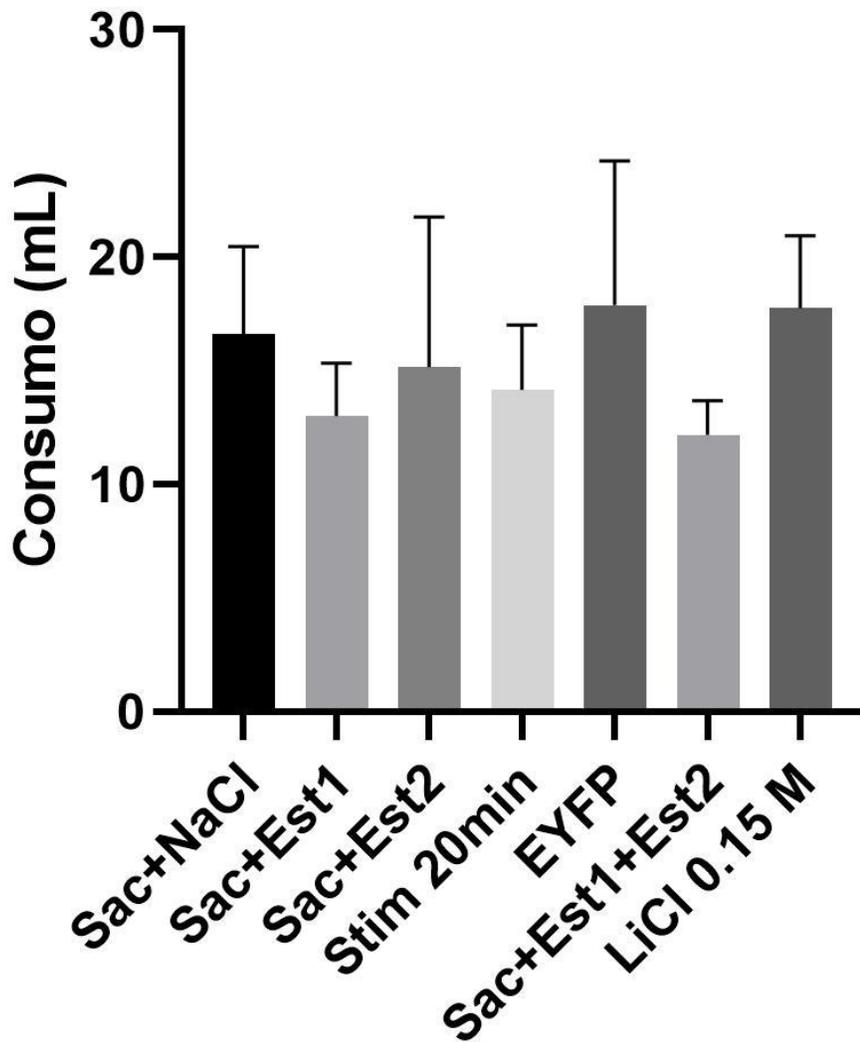


Figura 12. Consumo de los animales entre los diferentes tratamientos.

Se encontró una diferencia significativa, pero no entre grupos ($H_{(7,49)} = 12.69$ $p > 0.05$). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar

También se midió el consumo total durante la adquisición para saber si la estimulación o los tratamientos pudieron haber afectado el consumo de los animales. El test de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas ($H_{(7,49)} = 12.69$ $p > 0.05$), pero la prueba de Dunn no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

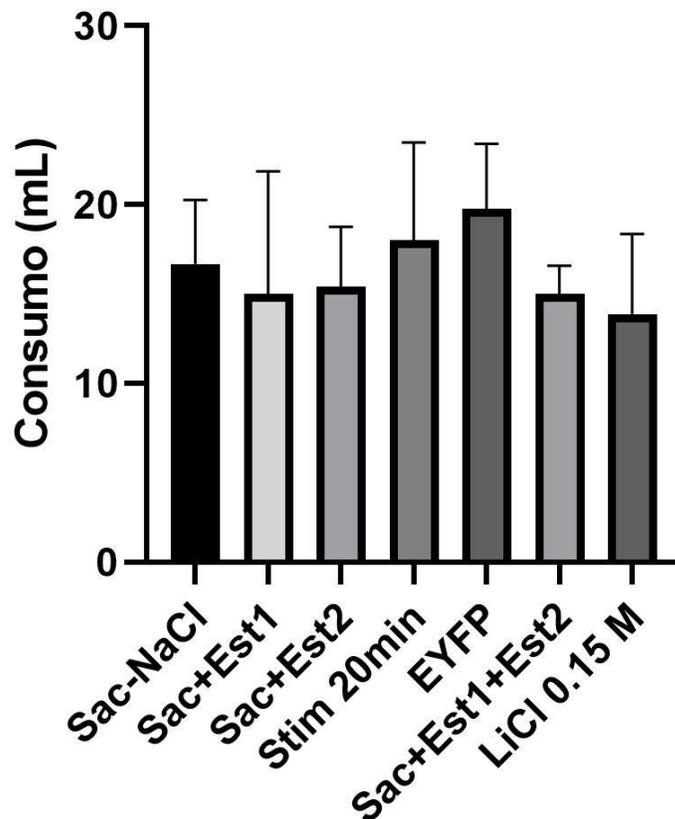


Figura 13. Las diferentes manipulaciones no afectaron el consumo total durante la prueba. Todos los grupos tienen un consumo bastante similar durante la prueba ($H_{(7,49)} = 10.22$ $p > 0.05$). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar

En la MLP no se observaron diferencias en el consumo total (sacarina+agua) entre los grupos debidos al tratamiento, tal como se muestra en la Figura 13, el análisis ($H_{(7,49)} = 10.22$ $p > 0.05$) no mostró diferencias significativas.

Se corrió Kruskal-Wallis para observar diferencias en el índice de consumo entre los diferentes tratamientos, la cual mostró diferencias significativas entre todos los grupos ($H_{(7,49)} = 26.70$ $p < 0.05$). La prueba de Dunn mostró que el grupo de dos estimulaciones (Sac+Est1+Est2) fue significativamente diferente a los grupos controles tanto (NaCl) ($p < 0.05$), eYFP ($p < 0.05$), (Est1) ($p < 0.05$), estimulación durante la reactivación (Est2) ($p < 0.05$) y durante la estimulación de 20 minutos (Stim20) ($p < 0.05$) (Figura 14).

De esta manera, se demuestra que la doble estimulación (Sac+Est1+Est2) genera una aversión comparable al del grupo que recibió un tratamiento por inyección de LiCl ($W = 0.2997$, $p > 0.05$).

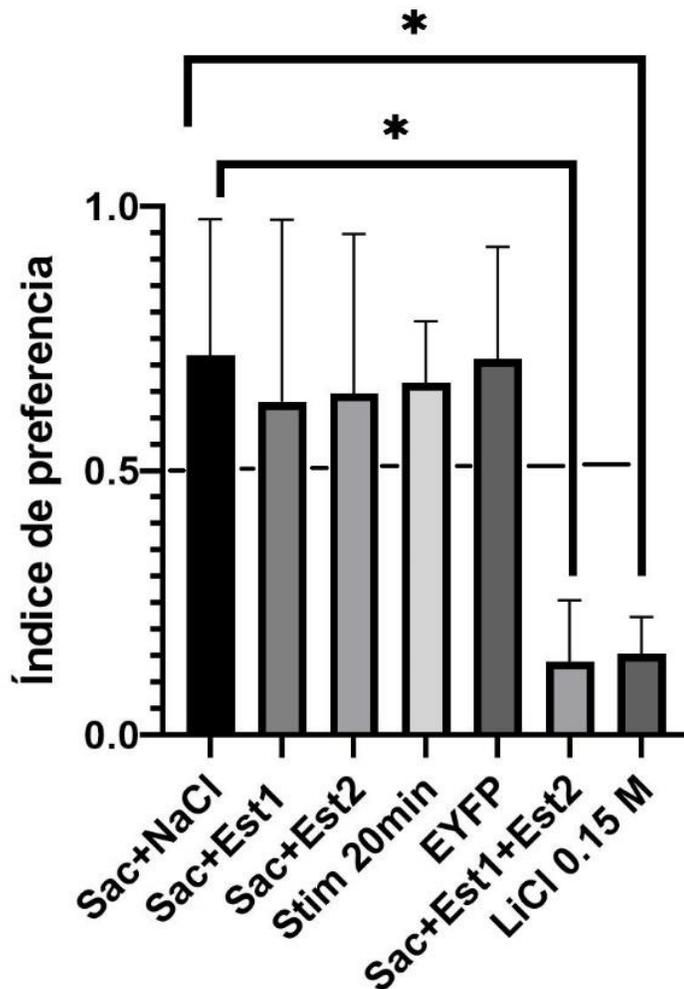


Figura 14. La estimulación optogenética en dos momentos genera un CAS similar al del LiCl. Se encontró diferencia significativa entre los grupos ($H_{(7,49)} = 26.70$ $p < 0.05$), prueba de Dunn reveló que tanto el grupo de dos estimulaciones (SAC+Est1+Est2) y LiCl fue diferente a los demás grupos. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. La línea punteada representa el azar.

VIII.3 Efectos de la estimulación en el CAL

VIII.3.1 Determinación de la aversión

Como se mencionó anteriormente (apartado 7.2 Condicionamiento de Aversión al lugar) se determinaron los ensayos necesarios para generar aversión a través de la estimulación. En el pretest, el grupo de una sola adquisición se encontró una diferencia significativa ($H_{(3, 21)} = 13.56$ $p < 0.05$), en la comparación múltiple con el test de Dunn se observó que los animales pasaron más tiempo en el compartimento negro en comparación al compartimento blanco ($p < 0.05$) y gris ($p < 0.05$). Mostrando así, una preferencia del compartimento negro. En el grupo de 2 adquisiciones, no se encontraron diferencias significativas entre los compartimentos ($H_{(3, 21)} = 2.234$ $p < 0.05$) Por último, el grupo que fue sometido a tres adquisiciones se encontraron diferencias significativas ($H_{(3, 36)} = 23.36$ $p < 0.05$); La comparación múltiple llevada a cabo por el test de Dunn encontró diferencia significativa entre el compartimento negro ($p < .05$) y el gris ($p < 0.05$). Lo que significa que prefirieron el compartimento negro (Figura 15 A).

En el día del postest los animales del grupo de una adquisición no se encontraron diferencias significativas ($H_{(3, 21)} = 2.234$ $p > 0.05$). En el grupo con dos adquisiciones, tampoco se encontraron diferencias significativas en la permanencia en los compartimentos ($H_{(3, 15)} = 0.6200$ $p > 0.05$). Finalmente, en el grupo con tres adquisiciones, el test de Kruskal no mostró significativas ($H_{(2, 24)} = 5.447$ $p < 0.05$), se realizó la prueba U de Mann-Whitney entre el lugar gris y negro, el cual se mostró una diferencia significativa ($U = 4.12805$ $p < 0.05$) (Figura 15 B).

Se calculó el índice de preferencia y se corrió la prueba de Kruskal-Wallis donde no se encontraron diferencias significativas ($H_{(3, 22)} = 4.517$ $p > 0.05$); no obstante, el análisis pos-hoc sí se encontró una diferencia significativa entre los grupos de dos y tres adquisiciones ($p < 0.05$) (Figura 15 C). También se analizaron los tiempos de exploración después de la estimulación (Figura 16), para saber si la estimulación pudo afectar la conducta motora. Se corrió la prueba de Kruskal-Wallis, pero no se encontraron diferencias significativas ($H_{(4, 38)} = 1.363$ $p > 0.05$).

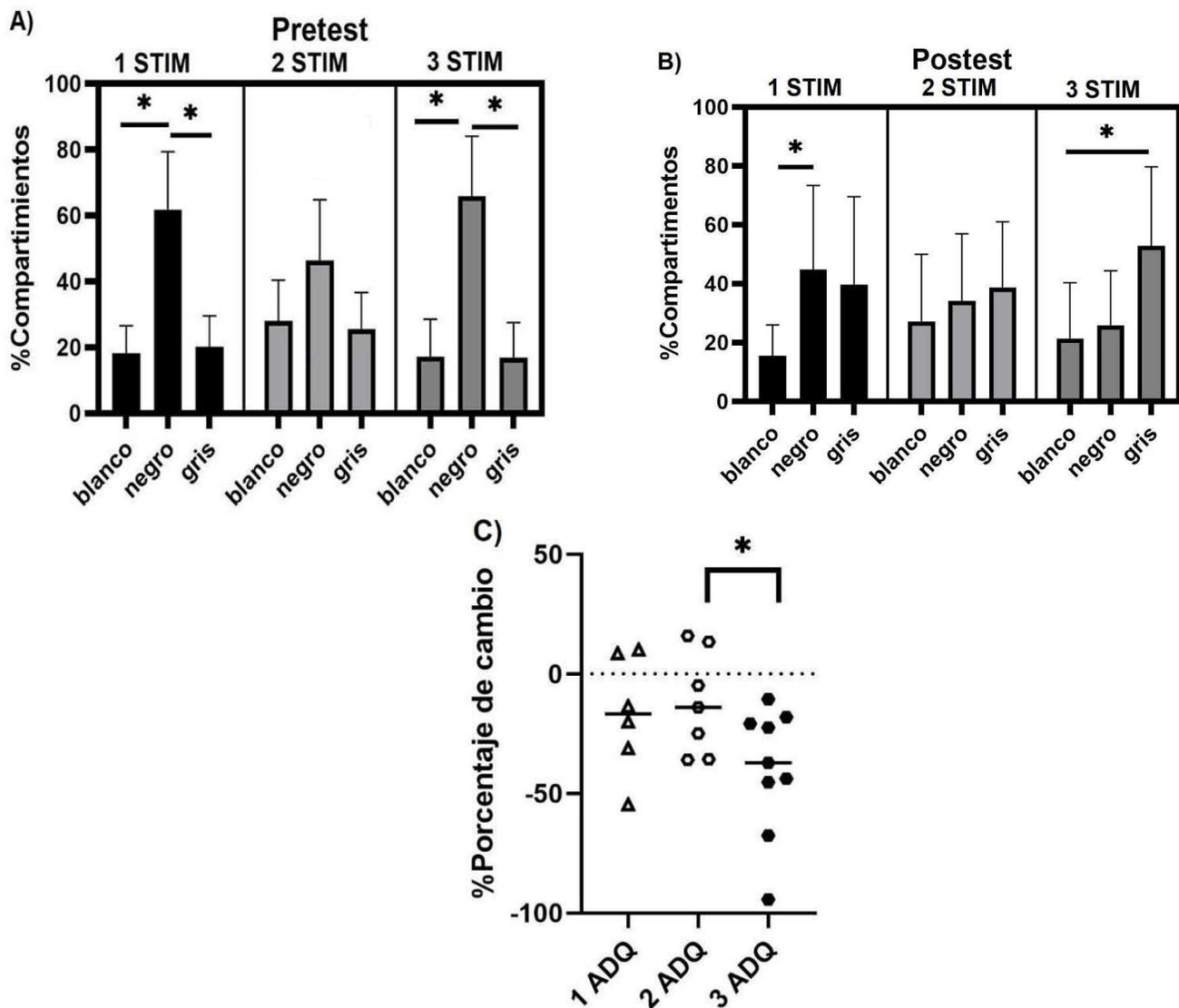


Figura 15. Cambios en las preferencias de los animales a causa de la estimulación. A) Se observa que en el pretest como significativamente los animales prefirieron el lado negro en comparación a los otros dos compartimentos B) En el grupo de una estimulación, se sigue observando una diferencia significativa en la preferencia por el lugar negro, en cambio en el grupo de 3 estimulaciones, se observa una reversión significativa C) Se encontró que tres adquisiciones provocaron un cambio en la preferencia significativamente mayor que el grupo de las dos adquisiciones. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

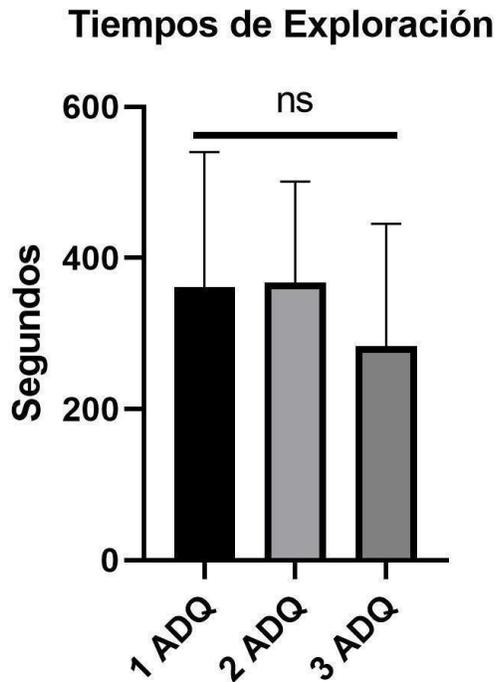


Figura 16. Tiempos de exploración postest entre las diferentes estimulaciones
 No se encuentran diferencias significativas entre los tiempos de exploración entre las diferentes estimulaciones ($H_{(4, 38)} = 1.363$ $p > 0.05$) (blanco + negro). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

VIII.3.2 La estimulación optogenética genera aversión al lugar

Con el fin de conocer si los diferentes tratamientos tuvieron un efecto en la conducta de exploración en ambos compartimentos, se realizó la prueba Kruskal-Wallis para comparar el tiempo de exploración entre los grupos que pasaron en los compartimentos blanco y negro, los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre grupos ($H_{(4, 37)} = 2.655$ $p > 0.05$) De tal manera, que los efectos de la estimulación no afectaron los tiempos de exploración de los animales.

Tiempos de exploración

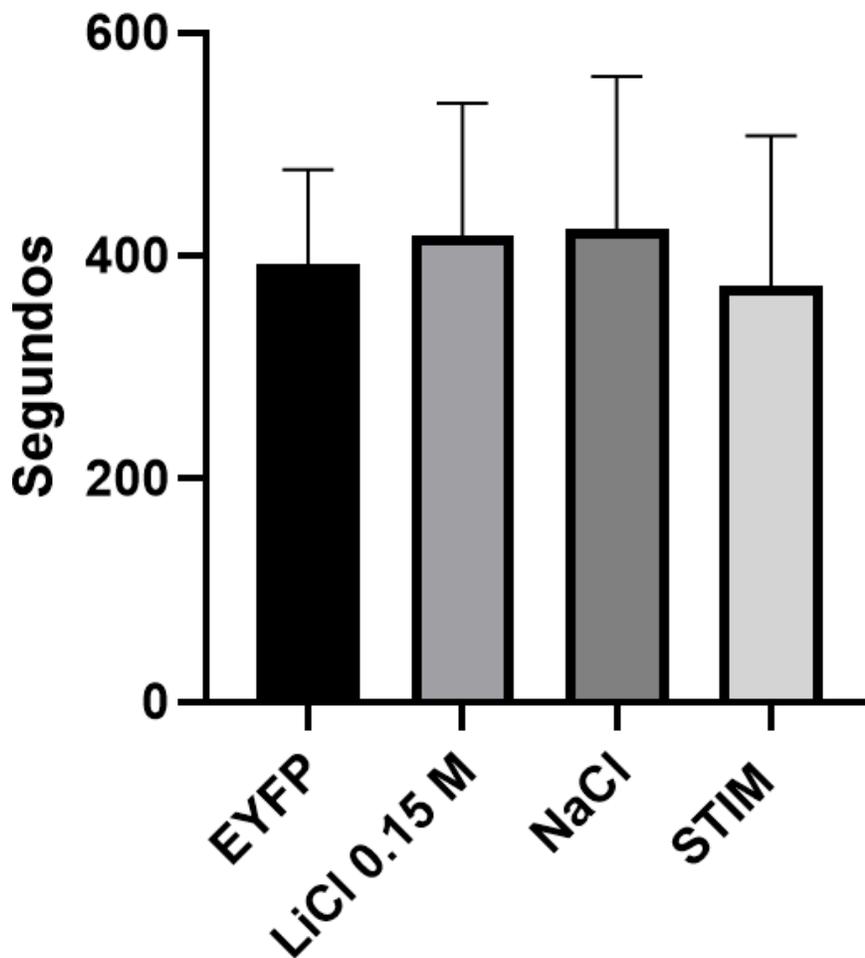


Figura 17. Tiempos de exploración del posttest. No se encuentran diferencias significativas entre los tiempos de exploración de los distintos tratamientos ($H_{(4, 37)} = 2.655$ $p > 0.05$). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

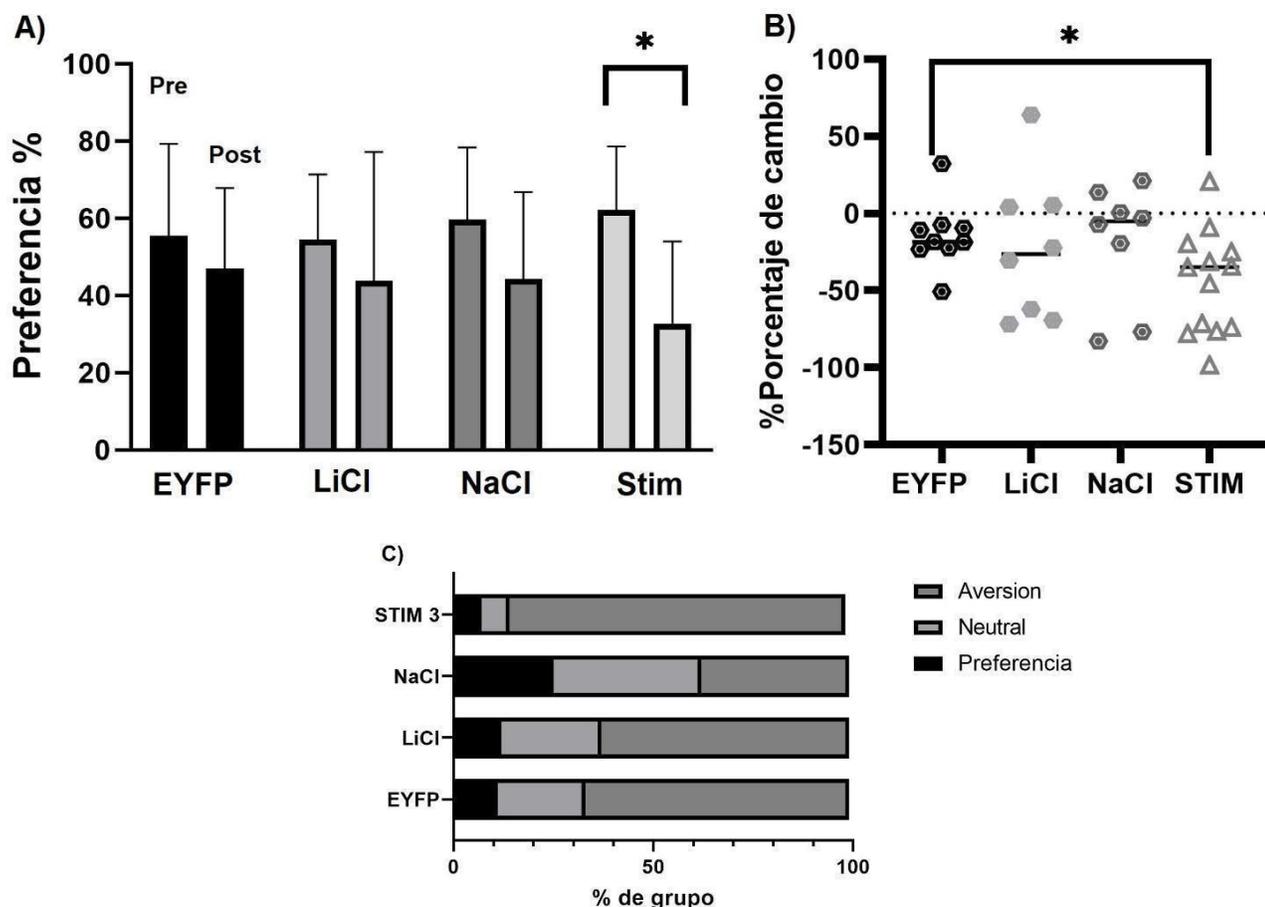


Figura 18. La estimulación de la vía BLA-CI genera aversión. (A) Se observan los diferentes porcentajes de preferencia tanto en el pre y el post test, se encontró una diferencia significativa entre la pre y post estimulación. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. (B) El porcentaje de cambio en el post test, el grupo estimulado es significativamente diferente al grupo EYFP. (C) La proporción entre los distintos grupos, se muestra que el grupo estimulado provocó una mayor cantidad de animales tuvieron aversión en comparación a los otros grupos.

En el análisis de los resultados de la preferencia entre el pre vs postest se encontró que el grupo estimulado fue el único que mostró una clara aversión ($U= 2.178$ $p < 0.05$). El siguiente análisis se evaluó el cambio de preferencia respecto al pretest, para ello se evaluó el porcentaje de cambio; se encontró una diferencia significativa entre los grupos EYFP y STIM ($U= 23$ $p < 0.05$). Por último, se vio que tanto los tratamientos afectaron la preferencia de los sujetos, para ello se les dividió en animales que desarrollaron, preferencia, neutralidad y aversión (Ver 6.2

Condicionamiento de aversión al lugar). Como se observa en la Figura 18 C, hay un alto porcentaje de animales con aversión en el grupo estimulado, a diferencia de los grupos control cuyo porcentaje es bastante similar (Figura 18 C). Lo que muestra que la estimulación optogenética provocó un efecto aversivo casi en la totalidad de sujetos que componían el grupo.

Basado en lo anterior, se puede decir que la estimulación optogenética generó una aversión robusta en los animales tratados únicamente bajo un protocolo de tres adquisiciones, los animales que antes preferían un lugar desarrollaron una aversión diferente al del grupo control EYFP.

IX. Discusión

Los experimentos realizados muestran que la estimulación optogenética de la vía BLA-CI favorece el establecimiento y consolidación de memorias aversivas, tanto al sabor como al lugar. Además, el condicionamiento de aversión al sabor requiere de una activación que emule el EI y de una reactivación que promueva la consolidación. Los eventos de actividad observados en la amígdala basolateral y corteza insular durante la post-adquisición son necesarios para la consolidación de memorias aversivas al sabor. No obstante, el establecimiento de un condicionamiento de aversión al lugar requiere de varios ensayos.

En el presente trabajo observamos que la activación de la vía BLA-CI, mediante estimulación optogenética, durante el proceso de adquisición, así como de los eventos de reactivación asociados a la consolidación puede inducir una memoria gustativa de aversión. En relación a los eventos asociados a la consolidación, se ha descrito que existen periodos de post aprendizaje en el hipocampo que están vinculados a la formación de memorias en diferentes tareas de aversión; además, la interrupción de estos periodos post-aprendizaje provoca una seria afectación en la ejecución de la tarea (Girardeu, Inema & Buzaky, 2017). De manera similar al hipocampo, la amígdala también muestra estos periodos de post-aprendizaje (Cox

et al., 2020). Los periodos post-aprendizaje son necesarios para la generación de memorias a largo plazo, tal como se ha mostrado en el caso del CAS (Guzmán-Ramos et. al, 2010), en los que se registró la liberación de glutamato y norepinefrina tiempo después de la adquisición del CAS; el bloqueo de los receptores NMDA y β -adrenérgicos en la BLA, durante el periodo post-aprendizaje, impide la consolidación de la memoria de largo plazo. En contraparte, la activación y reactivación de receptores NMDA y β -adrenérgicos induce un CAS (Osorio-Gómez, Bermúdez-Rattoni & Guzmán-Ramos, 2019). El presente trabajo va en consonancia con lo anteriormente descrito, ya que la activación optogenética de la vía BLA-CI y su posterior reactivación generan una memoria de aversión al sabor. No obstante, queda por demostrar si la estimulación optogenética de la vía promueve la liberación de los mismos neurotransmisores que se han registrado y con la misma intensidad.

En los resultados obtenidos, se observó que solo los animales a los que se les estimuló dos veces generaron aversión al sabor. Los grupos a los que se les dio una estimulación prolongada o una sola estimulación, sin importar el momento, no establecieron una memoria aversiva. Estos datos sugieren que se requiere de la activación de la vía BLA-CI en momentos específicos durante la adquisición y durante la consolidación que hacen posible la memoria a largo plazo (Ramirez-Amaya et al., 2005, McGaugh, 2000; Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2011), los cuales podrían residir en la actividad glutamatérgica y dopaminérgica que se da en la CI posterior al aprendizaje (Guzman-Ramos et al, 2010 & Guzmán-Ramos et. al., 2012).

El establecimiento del CAS puede deberse a que la activación neuronal por medio de la estimulación optogenética modifica la densidad postsináptica. Además, las sinapsis silentes pueden activarse a través de la estimulación, este mecanismo se ha vinculado a la actividad postsináptica de los receptores NMDA y AMPA principalmente (Sinnen et al., 2017), cuya presencia es abundante en las neuronas espinosas glutamatérgicas de BLA. La segunda estimulación estaría

“des-silenciando” la sinapsis, por lo que iniciaría el proceso de consolidación faltante, lo que se traduciría en un aumento en la actividad excitatoria necesaria para la consolidación de la memoria, para la posterior evocación de la memoria, tanto en la amígdala como en CI.

En el periodo de reactivación, tanto la dopamina como el glutamato muestran un aumento de su liberación (Guzmán Ramos et al., 2010). La entrada iones Ca^{+2} provocada por la estimulación activaría CAMKII, que bien podría activar la vía cAMP/ PKA/CREB, que sería responsable de la expresión de *Arc*, lo que a su vez generaría los cambios plásticos vinculados a la memoria. La actividad de *Arc* se ha vinculado con la generación de nuevas espinas dendríticas, que son necesarias para la consolidación de la memoria (Kim, Kim & Um, 2018; Guzmán-Ramos et al., 2018). Sería importante conocer, si la estimulación optogenética generaría la expresión de genes de expresión temprana que fueran similares a la expresión en forma natural.

En relación a memorias contextuales de aversión, se observó una aversión al lugar debido al repetido número de ensayos, mostrando de este modo que la vía BLA-CI también está involucrada en la adquisición de memorias contextuales de aversión. Anteriormente se demostró que la inhibición de las proyecciones provenientes de BLA hacia la CI provocó una aceleración de la extinción de una memoria contextual, lo que indica que la vía BLA-CI también estaría integrando la información proveniente del contexto (Gil-Lievana et al., 2020). Esto va acorde a lo encontrado en el CAL, en donde el grupo estimulado optogenéticamente adquirió una aversión en el lugar. El papel de la CI también ha sido ampliamente documentado en tareas contextuales, ya que participa en la asociación entre el tono y el estímulo aversivo (de Paiva et al., 2021), y cuando hay una lesión en esta área afecta negativamente en la consolidación de tareas aversivas asociadas al contexto (Shi et al., 2020). La CI también se le ha relacionado con la percepción emocional en su asociación con estados del cuerpo (Zaki, Davis & Ochsner, 2012), esto podría indicar que la ínsula es la que le estaría dando una valencia interna ya sea positiva o negativa de los

estímulos que se presentan ante el organismo. Prueba de ello, pacientes que tienen lesiones en la CI no son capaces de cambiar su respuesta ante estímulos negativos o positivos (Berntson et al., 2011). Muy posiblemente, la estimulación optogénica en cierta medida provocó un cambio de valencia interna del organismo relacionada al lugar preferido y, por lo tanto, cambió su preferencia.

Otro aspecto a destacar de los presentes resultados, fue la ausencia de aversión del grupo LiCl, esto podría explicarse de dos formas: La primera podría deberse a que hay ciertos tipos de asociaciones más fáciles de realizar debido a la modalidad sensorial asociada (García & Koelling, 1966). Otra explicación también se da a partir que la cúspide del efecto LiCl que es a partir de los 20 minutos, que es el tiempo necesario para que el animal experimente los efectos del LiCl; a los 10 minutos no se encuentra una aversión significativa (Hernández-Matías, Bermúdez-Rattoni & Osorio-Gómez, 2021). Además, que las memorias aversivas relacionadas al contexto requieren de una consolidación en el sueño (Girardeau, Inema & Buzaky, 2017). La posible explicación del porqué la estimulación optogénica produjo un CAL, se podría encontrar en que la estimulación podría estar generando una valencia aversiva al organismo, lo que le facilita la asociación entre el contexto y la aversión, lo que no siempre es posible por un malestar gástrico.

Interesantemente, el establecimiento de un CAL se dio después de tres ensayos, lo que muestra que el cambio a una valencia negativa requiere un cierto número de ensayos, o en cierta medida que el contexto prediga el miedo, requisito determinante para este tipo de asociaciones (Lin, Chiou & Chang, 2020). Además, el CAL requiere de otras áreas involucradas en la adquisición y en la consolidación de la tarea; en un estudio reciente se encontró que el hipocampo ventral sería un área que estaría involucrado tanto en la adquisición como en la consolidación (Hernández-Matías, Bermúdez-Rattoni & Osorio-Gómez, 2021). Otra posible explicación, puede ser debido a que dicha vía estaría principalmente codificando aversión al sabor, por lo que fueron necesarias más estimulaciones debido a que hay ciertas asociaciones más fáciles de establecer que otras, dependiendo del

sentido involucrado, es decir, para los organismos no es tan fácil asociar el malestar estomacal con el contexto (Miller & Domjan, 1981).

Finalmente, la Teoría del Engrama propuesto por Tonegawa et. al (2015), hace referencia a las vías necesarias que forman el engrama de memoria. El presente trabajo podría enmarcarse bajo esta línea ya que como se ha mostrado, la vía BLA-CI está implicada en la adquisición y consolidación del CAS. No obstante, es necesaria una mayor investigación, parecida a los métodos del equipo de Tonegawa (Liu et al., 2012 & Ramirez et al., 2013), para dilucidar la especificidad de la vía en la formación de memorias aversivas. Particularmente para caracterizar la vía y los grupos celulares específicos que se activan tanto en la adquisición y en la posterior reactivación. Esto es importante de señalar, debido a que los trabajos de Tonegawa y otros investigadores que han utilizado esta técnica, no hacen referencia a las reactivaciones, y es importante saber si las reactivaciones inciden en las mismas neuronas activadas inicialmente, ya que esto sería lo más cercano a una *ecforia* natural. Dentro de la teoría del engrama, Tonegawa ha señalado la existencia de engramas activos y silentes; en una etapa temprana de la memoria, el hipocampo junto con la amígdala estaría involucrados en la formación de memorias recientes y en su posterior maduración (consolidación). En el futuro será importante estudiar si en la etapa de reactivación optogenética también se involucra al hipocampo, el cual teóricamente está involucrado en esta maduración de engramas (Tonegawa, Morrissey & Kitamura, 2018).

X. Conclusiones

La activación de la vía BLA-CI tanto en la adquisición como en la reactivación, induce una memoria aversiva a un sabor. De igual manera, la actividad de la vía está implicada en la adquisición de la aversión asociada al contexto.

La formación de una memoria aversiva, a través de la estimulación optogenética, es comparable a la generada por el cloruro de litio (LiCl). Por lo tanto, la actividad de la vía BLA-CI es parte de un mecanismo neurobiológico general de aversión y responde diferencialmente entre la aversión al contexto y al sabor.

XI. Referencias

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.

Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, 11(2), 180-187.

Álvarez, J. G. (2012). *Breve historia del cerebro*. Crítica.

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. *The Journal of Physiology*, 598(23), 5505-5522.

Arrigoni, E., & Saper, C. B. (2014). What optogenetic stimulation is telling us (and failing to tell us) about fast neurotransmitters and neuromodulators in brain circuits for wake–sleep regulation. *Current opinion in neurobiology*, 29, 165-171.

Alves, F. H., Gomes, F. V., Reis, D. G., Crestani, C. C., Corrêa, F. M., Guimaraes, F. S., & Resstel, L. B. (2013). Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. *European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2300-2307.

Bass, C. E., Grinevich, V. P., Vance, Z. B., Sullivan, R. P., Bonin, K. D., & Budygin, E. A. (2010). Optogenetic control of striatal dopamine release in rats. *Journal of neurochemistry*, 114(5), 1344-1352.

Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning*

& *Memory*, 15(9), 618-624.

Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991) Insular Cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain research*, 549(1), 165-170.

Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 209-217.

Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 12(5), 447-449.

Berntson, G. G., Norman, G. J., Bechara, A., Bruss, J., Tranel, D., & Cacioppo, J. T. (2011). The insula and evaluative processes. *Psychological science*, 22(1), 80-86.

Benfenati, F. (2007). Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed*, 78(Suppl 1), 58-66.

Bernard, J. F., Alden, M., & Besson, J. M. (1993). The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 329(2), 201-229.

Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V., & Dudai, Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1–2 and formation of a memory trace. *Journal of Neuroscience*, 20(18), 7017-7023.

Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. A. (2020). *Neuroscience: Exploring the Brain*,

Enhanced Edition: Exploring the Brain. Jones & Bartlett Learning.

Bennett, M. R. (2001). *History of the Synapse.* CRC Press.

Brown, S., & Sharpey-Schafer, E. A. (1888). XI. An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey's brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)*, (179), 303-327.

Bunge, M., & Ardila, R. (2002). *Filosofía de la psicología.* Siglo XXI.

Brady, S., Siegel, G., Albers, R. & Price, D. (2011) Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology. Academic Press

Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S. A., Silva, A. J., Davis, S., & Laroche, S. (2003). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1432), 805-814.

Blinder, J., Desai, R., Graves, W. & Conant, I. (2009) where is the semantic system? A critical review and meta-analyses of 120 functional neuroimaging studies. *Cerebral cortex*, 19(12), 2767-2796

Carter, M. E., Han, S., & Palmiter, R. D. (2015). Parabrachial calcitonin gene-related peptide neurons mediate conditioned taste aversion. *Journal of Neuroscience*, 35(11), 4582-4586.

Christian, K. M. (2010). *Cerebellum: Associative Learning.*

Corkin, S. (1965). Tactually-guided maze learning in man: Effects of unilateral cortical excisions and bilateral hippocampal lesions. *Neuropsychologia*, 3(4), 339-351.

Cox, R., Rüber, T., Staresina, B. P., & Fell, J. (2020). Sharp wave-ripples in human amygdala and their coordination with hippocampus during NREM sleep. *Cerebral cortex communications*, 1(1)

Cullity, E. R., Guérin, A. A., Madsen, H. B., Perry, C. J., & Kim, J. H. (2021). Insular cortex dopamine 1 and 2 receptors in methamphetamine conditioned place preference and aversion: Age and sex differences.

Damasio, A. (2003) En busca de Spinoza. Crítica. España

de Paiva, J. P. Q., Bueno, A. P. A., Corrêa, M. D. S., Oliveira, M. G. M., Ferreira, T. L., & Fornari, R. V. (2021). The posterior insular cortex is necessary for the consolidation of tone fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 179, 107402.

De Robertis, E. D., & Bennett, H. S. (1955). Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *The Journal of Cell Biology*, 1(1), 47-58.

Duvarci, S., & Pare, D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82(5), 966-980.

Eiling, Y., Evangelina G. & Thompson-Schill (2013) Semantic memory. The oxford Handbook of cognitive Neuroscience, volume 1: Core Topics. Edited by Kevin N. Ochsner and Stephen Kosslyn.

Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain research*, 779(1-2), 314-319.

Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain research*, *852*(1), 208-212.

Fenko, L., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2011). The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience*, *34*, 389-412.

Forget, B., Pushparaj, A., & Le Foll, B. (2010). Granular insular cortex inactivation as a novel therapeutic strategy for nicotine addiction. *Biological psychiatry*, *68*(3), 265-271.

Fudge, J., & Tucker, T. (2009) Amygdala projections to central amygdaloid nucleus subdivisions and transition zones in the primate. *Neuroscience*, *158*(2), 819-841

Flores, V. L., Parmet, T., Mukherjee, N., Nelson, S., Katz, D. B., & Levitan, D. (2018). The role of the gustatory cortex in incidental experience-evoked enhancement of later taste learning. *Learning & Memory*, *25*(11), 587-600.

Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Hunt, E. L. (1957). Spatial avoidance in the rat as a result of exposure to ionizing radiation. *The British journal of radiology*, *30*(354), 318-321.

Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, *122*(3160), 157-158.

García-DeLaTorre, P., Rodríguez-Ortiz, C. J., Arreguin-Martínez, J. L., Cruz-Castañeda, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2009). Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learning & Memory*, *16*(9), 514-519.

Gallo, M., Roldan, G., & Bureš, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular

cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural brain research*, 52(1), 91-97.

Gehrlach, D. A., Dolensek, N., Klein, A. S., Roy Chowdhury, R., Matthys, A., Junghänel, M., ... & Gogolla, N. (2019). Aversive state processing in the posterior insular cortex. *Nature neuroscience*, 22(9), 1424-1437.

Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Current Biology*, 27(12), R580-R586.

Gil-Lievana, E., Balderas, I., Moreno-Castilla, P., Luis-Islas, J., McDevitt, R. A., Tecuapetla, F., & Bermúdez-Rattoni, F. (2020). Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory. *Communications biology*, 3(1), 1-11.

Girardeau, G., Inema, I., & Buzsáki, G. (2017). Reactivations of emotional memory in the hippocampus–amygdala system during sleep. *Nature neuroscience*, 20(11), 1634-1642.

Graybiel, A. & Grafton, s. (2015) The striatum: where the skills and habits meet. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8)

Gross, C. G. (1999). *Brain, vision, memory: Tales in the history of neuroscience*. MIT Press.

Gu, Y., Piper, W. T., Branigan, L. A., Vazey, E. M., Aston-Jones, G., Lin, L., ... & Sears, R. M. (2020). A brainstem-central amygdala circuit underlies defensive responses to learned threats. *Molecular psychiatry*, 25(3), 640-654.

Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2011). Post-learning molecular reactivation underlies taste memory consolidation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 79.

Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni,

F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of neurochemistry*, 114(1), 226-236.

Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P. & Bermúdez-rattoni, F. (2012) Post-acquisition release of glutamate and norephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learning & Memory*, 19(6), 231-238

González, A., Moreno, N. (2009). Evolution of the Amygdala: Tetrapods. In: Binder, M.D., Hirokawa, N., Windhorst, U. (eds) *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Hawkins, R. D., Kandel, E. R., & Bailey, C. H. (2006). Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. *The Biological Bulletin*, 210(3), 174-191.

Hernández-Matias, A., Bermúdez-Rattoni, F., & Osorio-Gómez, D. (2021). Maintenance of conditioned place avoidance induced by gastric malaise requires NMDA activity within the ventral hippocampus. *Learning & Memory*, 28(9), 270-276.

Herry, C., & Johansen, J. P. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nature neuroscience*, 17(12), 1644-1654.

Hertz, L. (2013). The glutamate–glutamine (GABA) cycle: importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. *Frontiers in endocrinology*, 4, 59.

Hebb, D. (1949). *The organization of behavior*. Wiley

Hoffman, K. L., & McNaughton, B. L. (2002). Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. *Science*, 297(5589), 2070-2073.

Huff, M. L., Emmons, E. B., Narayanan, N. S., & LaLumiere, R. T. (2016). Basolateral amygdala projections to ventral hippocampus modulate the consolidation of footshock, but not contextual, learning in rats. *Learning & memory*, 23(2), 51-60.

Huff, M. L., Miller, R. L., Deisseroth, K., Moorman, D. E., & LaLumiere, R. T. (2013). Posttraining optogenetic manipulations of basolateral amygdala activity modulate consolidation of inhibitory avoidance memory in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3597-3602.

Janiszewski, C., & Wyer Jr, R. S. (2014). Content and process priming: A review. *Journal of consumer psychology*, 24(1), 96-118.

Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2014). Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, 61.

Johansen, J. P., Hamanaka, H., Monfils, M. H., Behnia, R., Deisseroth, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2010). Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), 12692-12697.

Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2017). Heroes of the engram. *Journal of Neuroscience*, 37(18), 4647-4657.

Kandel, E. R., & Pittenger, C. (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354(1392), 2027-2052.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). Principles of neural science, fifth edition. In *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Education.

Kalin, N. H., Shelton, S. E., & Davidson, R. J. (2004). The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *Journal of*

Neuroscience, 24(24), 5506-5515.

Kayyal, H., Yiannakas, A., Chandran, S. K., Khamaisy, M., Sharma, V., & Rosenblum, K. (2019). Activity of insula to basolateral amygdala projecting neurons is necessary and sufficient for taste valence representation. *Journal of Neuroscience*, 39(47), 9369-9382.

Keene, A. C., & Masek, P. (2012). Optogenetic induction of aversive taste memory. *Neuroscience*, 222, 173-180.

Krettek, J. E., & Price, J. L. (1974). A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex. *Brain research*, 67(1), 169-174.

Knuepfer, M. M., Eismann, A., Schutze, I., Stumpf, H., & Stock, G. (1995). Responses of single neurons in amygdala to interoceptive and exteroceptive stimuli in conscious cats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 268(3), R666-R675.

Klüver, H., & Bucy, P. C. (1997). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 9(4), 606-a.

Kobayashi, M. (2011). Macroscopic connection of rat insular cortex: anatomical bases underlying its physiological functions. *International review of neurobiology*, 97, 285-303.

Kim, S., Kim, H., & Um, J. W. (2018). Synapse development organized by neuronal activity-regulated immediate-early genes. *Experimental & molecular medicine*, 50(4), 1-7.

LaLumiere, R. T. (2014). Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Frontiers*

in behavioral neuroscience, 8, 107.

Lemon, C. & Katz, D. (2007) The neural processing taste. *BMC neuroscience*, 8(3), 1-8

Lee, S. C., Amir, A., Haufler, D., & Pare, D. (2017). Differential recruitment of competing valence-related amygdala networks during anxiety. *Neuron*, 96(1), 81-88.

Lee, S. Y., Tsou, C., Liao, Z. X., Cheng, P. H., Huang, P. W., Lee, H. Y., ... & Shieh, G. S. (2020). A programmable EEG monitoring SoC with optical and electrical stimulation for epilepsy control. *IEEE Access*, 8, 92196-92211.

Leff, P., Matus, M., Hernández, A., Medécigo, M., Torner, C., & Antón, B. (2002). Understanding the neurobiological mechanisms of learning and memory: Memory systems of the brain, long term potentiation, and synaptic plasticity. Part III A. *Salud Mental*, 25(3), 64-77.

Luria, A. R. (2015) Las funciones corticales superiores del hombre. Fontamara. México

Likhtik, E., Popa, D., Apergis-Schoute, J., Fidacaro, G. A., & Paré, D. (2008). Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature*, 454(7204), 642-645.

Lin, Y. J., Chiou, R. J., & Chang, C. H. (2020). The reuniens and rhomboid nuclei are required for acquisition of Pavlovian trace fear conditioning in rats. *Eneuro*, 7(3).

Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484(7394), 381-385.

Martínez-García, F., Novajarque, A. & Lanuza, E. (2006) Evolution of the amygdala in invertebrates. *Evolution of the Nervous Systems*. Vol.2, J.H. Kaas, 255-334

Mark, V. H., Takada, I., Tsutsumi, H., Takamatsu, H., Toth, E., & Mark, D. B. (1975). Effect of exogenous catecholamines in the amygdala of a 'rage cat'. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 38(1), 61-72.

Mark, V. H., Takada, I., Tsutsumi, H., Takamatsu, H., Toth, E., & Mark, D. B. (1975). Effect of exogenous catecholamines in the amygdala of a 'rage' cat. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 38(1), 61-72.

McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.

McGaugh, J. L. (2018). Emotional arousal regulation of memory consolidation. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 19, 55-60

McDonald, A. J. (1992). Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain research bulletin*, 28(2), 179-185.

McIntyre, C. K., Hatfield, T., & McGaugh, J. L. (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 16(7), 1223-1226.

Miller, V., & Domjan, M. (1981). Specificity of cue to consequence in aversion learning in the rat: Control for US-induced differential orientations. *Animal Learning & Behavior*, 9(3), 339-345.

Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramírez-Lugo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11417-11422.

Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramírez-Lugo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2003). Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiology of learning and memory*, 80(3), 211-222.

Naor, C., & Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural brain research*, 79(1-2), 61-67.

Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 295-322.

Nieuwenhuys, R. (2012). The insular cortex: a review. *Progress in brain research*, 195, 123-163.

Ogawa, H., Ito, S., Murayama, N., & Hasegawa, K. (1990). Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neuroscience research*, 9(3), 196-201.

Osorio-Gómez, D., Bermúdez-Rattoni, F., & Guzmán-Ramos, K. (2019). Artificial taste avoidance memory induced by coactivation of NMDA and β -adrenergic receptors in the amygdala. *Behavioural Brain Research*, 376, 112193.

Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2018). Neurobiology of neophobia and its attenuation. In *Food neophobia* (pp. 111-128). Woodhead Publishing

Pabba, M. (2013). Evolutionary development of the amygdaloid complex. *Frontiers in neuroanatomy*, 7, 27.

Panguluri, S. K., Kuwabara, N., Kang, Y., Cooper, N., & Lundy, R. F. (2012). Conditioned taste aversion dependent regulation of amygdala gene expression. *Physiology & behavior*, 105(4), 996-1006.

Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.

Peng, Y., Gillis-Smith, S., Jin, H., Tränkner, D., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature*, 527(7579), 512-515.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., & Lamantia, A. S. (2007). *Neurociencia*. Editorial médica panamericana.

Platón (2010). *Diálogos*. Gedisa. España

Pushparaj, A., Kim, A. S., Musiol, M., Zangen, A., Daskalakis, Z. J., Zack, M., ... & Le Foll, B. (2015). Differential involvement of the agranular vs granular insular cortex in the acquisition and performance of choice behavior in a rodent gambling task. *Neuropsychopharmacology*, 40(12), 2832-2842.

Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *Journal of Neuroscience*, 25(7), 1761-1768.

Rada, P., Tucci, S., Murzi, E., & Hernandez, L. (1997). Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain research*, 768(1-2), 338-340.

Reilly, S., & Schachtman, T. R.. (2008). Conditioned taste aversion: neural and behavioral processes. *Oxford University Press*.

Rescorla, R. A., Wagner, A. R., Black, A. H., & Prokasy, W. F. (1972). Classical conditioning II: current research and theory.

Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research*, 140(1-2), 1-47.

Równiak, M., Bogus-Nowakowska, K., Kalinowski, D., & Kozłowska, A. (2022). The evolutionary trajectories of the individual amygdala nuclei in the common shrew, guinea pig, rabbit, fox and pig: A consequence of embryological fate and mosaic-like evolution. *Journal of Anatomy*, 240(3), 489-502.

Rodríguez-Blanco, L. A., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2019). Consolidation of an aversive taste memory requires two rounds of transcriptional and epigenetic regulation in the insular cortex. *Behavioural brain research*, 356, 371-374.

Reynolds, G. S. (1973). *Compendio de condicionamiento operante*. Editorial Ciencia de la Conducta.

Reilly, S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain research bulletin*, 48(3), 239-254.

Reilly, S., & Schachtman, T. R. (Eds.). (2008). Conditioned taste aversion: neural and behavioral processes. *Oxford University Press*.

Reilly, S. & Bornovalova, M. (2005) conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(7), 1067- 088

Schafe, G. E., & Bernstein, I. L. (1998). Forebrain contribution to the induction of a

brainstem correlate of conditioned taste aversion: II. Insular (gustatory) cortex. *Brain research*, 800(1), 40-47.

Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), 11.

Schoenbaum, G., Chiba, A. A., & Gallagher, M. (1998). Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. *Nature neuroscience*, 1(2), 155-159.

Schiff, H. C., Johansen, J. P., Hou, M., Bush, D. E., Smith, E. K., Klein, J. E., ... & Sears, R. M. (2017). β -Adrenergic receptors regulate the acquisition and consolidation phases of aversive memory formation through distinct, temporally regulated signaling pathways. *Neuropsychopharmacology*, 42(4), 895-903.

Shepherd, J. D., & Bear, M. F. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature neuroscience*, 14(3), 279-284.

Shorojava, E. V. (1963). *El problema de la conciencia*. Grijalbo

Shi, C. J., & Cassell, M. D. (1998). Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *Journal of Comparative Neurology*, 399(4), 440-468.

Shi, T., Feng, S., Wei, M., & Zhou, W. (2020). Role of the anterior agranular insular cortex in the modulation of fear and anxiety. *Brain research bulletin*, 155, 174-183.

Shih, M. F., & Wu, C. L. (2017). Gap Junctions Underlying Labile Memory. In *Network Functions and Plasticity* (pp. 31-50). Academic Press.

Stansfield, W. E., Ranek, M., Pendse, A., Schisler, J. C., Wang, S., Pulinilkunnil, T.,

& Willis, M. S. (2014). The pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure. In *Cellular and molecular pathobiology of cardiovascular disease* (pp. 51-78). Academic Press.

Sinnen, B. L., Bowen, A. B., Forte, J. S., Hiester, B. G., Crosby, K. C., Gibson, E. S., & Kennedy, M. J. (2017). Optogenetic control of synaptic composition and function. *Neuron*, 93(3), 646-660.

Squire, L. & Zola, S. (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515-13522

Simon, S. A., de Araujo, I. E., Gutierrez, R., & Nicolelis, M. A. (2006). The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nature reviews neuroscience*, 7(11), 890.

Soto Cabrera, E., González Aguilar, A., & Márquez Romero, J. M. (2010). Síndrome de Klüver-Bucy secundario a metástasis de meduloblastoma. *Neurología (Barc., Ed. impr.)*, 135-136.

Sotelo, C. (2020). The history of the synapse. *The Anatomical Record*, 303(5), 1252-1279.

Sotnikov, O. (2019) Reticular theory of Camilo Golgi and Restructuring electrical synapses in syncytial perforations. *Biology Bulletin*, 46(2), 128-143

Tucci, S., Rada, P., & Hernandez, L. (1998). Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain research*, 813(1), 44-49.

Tulving, E., Schacter, D. L., Mclachlan, D. R., & Moscovitch, M. (1988). Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia. *Brain*

and cognition, 8(1), 3-20.

Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8(3), 198-204.

Terakita, A. (2005). The opsins. *Genome biology*, 6(3), 1-9.

Tonegawa, S., Morrissey, M. D., & Kitamura, T. (2018). The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 485-498.

Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory engram cells have come of age. *Neuron*, 87(5), 918-931.

Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *Journal of comparative and physiological psychology*, 49(4), 381.

Yamamoto, T., & Yasoshima, Y. (2007). Electrophysiological representation of taste memory. *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging*, 113-28.

Yamamoto, T., Matsuo, R., & Kawamura, Y. (1980). Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *Journal of neurophysiology*, 44(3), 440-455.

Yamamoto, T., Azuma, S., & Kawamura, Y. (1984). Functional relations between the cortical gustatory area and the amygdala: electrophysiological and behavioral studies in rats. *Experimental brain research*, 56, 23-31.

Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y., & Sakai, N. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioural brain research*, 65(2), 123-137.

Yamamoto, T., & Fujimoto, Y. (1991). Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain research bulletin*, 27(3-4), 403-406.

Yasoshima, Y., Morimoto, T., & Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain research*, 869(1-2), 15-24.

Yang, Y. & wang, J. (2017) From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. *Frontiers in neural circuits*, 11, 86

Zaki, J., Davis, J. I., & Ochsner, K. N. (2012). Overlapping activity in anterior insula during interoception and emotional experience. *Neuroimage*, 62(1), 493-499.

Zemelman, B. V., Lee, G. A., Ng, M., & Miesenböck, G. (2002). Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron*, 33(1), 15-2