



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

EFFECTO SINERGICO DE LA DEAFERENTACION COLINERGICA DEL NUCLEO BASAL MAGNOCELULAR (NBM) Y LA LESION EXCITOTOXICA EN AMIGDALA EN EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A SABORES.

295214

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA.

P R E S E N T A :

LUIS RAMIREZ TREJO

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI



Universidad Nacional
Autónoma de México



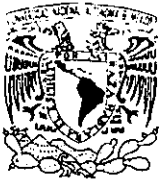
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza

Dr. Alejandro Cravioto Quintana.
Director de la
Facultad de Medicina
Presente.

Por medio del presente le informamos que la tesis "*Efecto sinérgico de la deafferentación colinérgica del NBM y la lesión excitotóxica en amígdala sobre el condicionamiento aversivo a sabores*" que presenta el alumno: Luis Ramírez Trejo con número de cuenta 09338456-7 reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza

Dr. Federico Bermúdez Rattóni

Dr. Juan Fernández Ruíz

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Raúl Paredes Guerrero.

Agradecimientos.

Antes que nada quiero agradecer al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por su apoyo durante la realización de esta tesis. Los Doctores: Miguel Ángel Morales Mendoza, Juan Fernández Ruiz, Raúl Paredes Guerrero y la Doctora: Margarita Martínez Gómez, tuvieron a bien revisar mi tesis con una rapidez y precisión que les agradezco.

Mis amigos en el laboratorio me enseñaron más de lo que unas simple líneas pueden agradecer. Gracias Vincent, por la filosofía, y las letras, y los libros, etc.; Leti, por tu solidaridad; Ranier, por tu ayuda con la bibliografía y las discusiones que me permitieron entender tantas cosas; Áraxi, porque me acuerdo de tu amistad a pesar de la lejanía; Luis Téllez, marido mío: has escuchado estoicamente tantas explicaciones mías que mereces reconocimiento especial.

Mención aparte merece Humberto, absolutamente nada en este trabajo hubiera sido posible sin tu ayuda.

Mis amigos en la licenciatura hicieron más que disfrutable mi paso por biomédicas, afortunadamente están aquí y aquí permanecerán:

Cei, porque de dos pusilánimes que hacían enfurecer a Auster hemos pasado a ser dos tipos quizá no menos pusilánimes, pero mas ciertos de que un hombre se mide mas por sus hechos que por sus sueños (esto me lo fusile de Malraux); Miguelito, ni estando del otro lado del gran charco deja de sentirse la compañía que siempre nos hemos dedicado; Ileana, porque pese a la contaminación aún se puede respirar en tus pupilas; Clelia —¿que decir?—, no hay muchas sonrisas de esperanza; guárdame la tuya.

Existen muchas otras personas a las que debería agradecer. Afortunadamente esta no es la última tesis, ni estos son los últimos agradecimientos. Así que seguimos: aunque se nos rompa el barzón sigue la yunta andando...

Índice

Índice.....	1
Abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	4
1.La hipótesis colinérgica del aprendizaje y la memoria.....	4
2. Neuroanatomía del sistema.....	6
2.1. El cerebro anterior basal.....	6
2.2. Neuroanatomía del NBM.....	7
3. Fisiología del NBM: Cognición y Colinergismo.....	12
3.1. En busca de la especificidad.....	12
3.2. 192IgG –saporina: la búsqueda consumada.....	14
3.3. NBM y atención.....	16
4. El Condicionamiento Aversivo a Sabores (CAS).....	16
4.1. El Cas como un paradigma de Aprendizaje.....	16
4.2. El sustrato neuronal.....	21
4.2.1. La corteza insular: integración de alto nivel.....	24
4.2.2. Otros sistemas de neurotransmisores.....	25
5.Amígdala, NBM y CAS: una confusión prometedora.....	25
Objetivos.....	30
Planteamiento del problema e Hipótesis.....	31
Material y Métodos.....	33
Resultados.....	37
Discusión.....	45
Conclusiones.....	49
Referencias.....	50

Mayo, 1998

Aprendizaje.

Para Cei: porque tal vez también
padezca de estos dolores.

Estoy aprendiendo a aguantar:

a cargar en mis párpados mis sueños impotentes;
a soportar en mi suspiro mi daga y mi suerte;
a conocer cenizas inmóviles en mis heridas;
a limpiar mis evasiones, y hacer de cuenta que no me tragan con sus bocas de cadáveres.

A alizar con el temblor de mi boca las búsquedas instantáneas de mis puños en mis manos.

Estoy aprendiendo a dominar la traza metálica de mis pasos:

le enseño a mis piernas a no odiarme,
les convezo todos los días — con argumentos irrefutables— de que correr no es saludable.

Acostumbro a mi espalda a mi misma posición en este mi mismo catre.

La instruyo con tesón acerca de las ventajas de no afanarse.

Estoy luchando día con día:

deshaciendo torbellinos, inmovilizando escalofríos y sofocando a mis sonidos para que no salten.

Y mas aún: lo estoy logrando: estoy triunfando en mi mirada...

la someto y la subyugo aquí frente al espejo en que envejezco

se rebela y me amenaza;

yo sólo contengo,

la reprimo,

la concentro,

la reduzco a los límites extendidos por su infinito,

y la sostengo en mis alas de ángel podrido para evitar que un día escape...

y en el revuelo del espejo por fin...

por fin se decida a matarme...

estoy aprendiendo..., aprendiendo a no suicidarme...

Luis Ramírez Trejo

A Tacha y a Luis: por demostrar que no se necesita entender a alguien para comprenderlo, y mas aún si ese alguien es su hijo

A las Bestias: 23 años no serían suficientes para agradecerles el que sean mis hermanas.

A Concha: por su historia

A los trilambdos: *carpe diem*

A mis hermanos: Rodrigo y Cris, y a la adecuación inclusiva: Alan Viyei.

Abreviaturas

ABL	Amígdala Basolateral
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterasa
AMPA	Ácido DL alfa amino 3- hidroxí-5-metil-isoxazolepropónico
Amg	Amígdala
Cab	Cerebro anterior basal
CAS	Condicionamiento Aversivo a Sabores
Ci	Corteza Insular
ChAT	Transferasa de la Acetilcolina
EG	Estímulo Gustativo
IBO	Iboténico
IgS	IgG-saporina
Ka	Kaínico
LiCl	Cloruro de litio
NBM	Núcleo Basal Magnocelular
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
PBN	Núcleo Parabraquial del Puente
Quis	Ácido Quiscuálico
SI	<i>Substantia innominata</i>
TTX	Tetradotoxina

Resumen.

La identificación del sustrato neuronal y de los procesos celulares necesarios para el aprendizaje son el objetivo fundamental de la neurobiología en este campo. Este objetivo tiene importantes repercusiones tanto teóricas como prácticas. Por ejemplo: la posible instrumentación de terapias para aminorar los efectos de enfermedades del aprendizaje y la memoria como la enfermedad de Alzheimer.

En este contexto, hay una extensa información en donde se ha descrito que el Núcleo Basal Magnocelular (NBM) está involucrado en distintos tipos de aprendizaje, entre ellos el Condicionamiento Aversivo a Sabores (CAS).

La conexión de este núcleo y la corteza insular (centro de integración de la información gustativa) por vía colinérgica ha hecho ponderar la importancia de la acetilcolina como neurotransmisor clave en este proceso de aprendizaje. Estudios efectuados con varios tipos de lesiones no específicas para neuronas colinérgicas en este núcleo han producido graves deterioros en varios tipos de aprendizaje. La reciente utilización de la inmunotoxina IgG-saporina (IgS) como toxina específica para esta vía colinérgica, y sus fallidos intentos en tratar de reproducir los efectos con otras neurotoxinas menos específicas pone en duda la relevancia de esta vía.

La posible importancia de la vía NBM-Amígdala-Corteza ha sido subrayada recientemente por algunos trabajos que la evalúan de forma indirecta.

El presente trabajo pretende establecer la relevancia que cada una de estas vías tiene sobre el CAS, un paradigma de aprendizaje robusto y ampliamente detallado. Para ello, se compara el efecto de la IgS administrada en el NBM (lesión específica) con el efecto del NMDA (lesión no específica) sobre el CAS. Por otro lado se observa el efecto del NMDA cuando se administra intraparenquimálmente en la amígdala. Y finalmente se observa el efecto de la lesión inmunotóxica en el NBM y excitotóxica en la amígdala en forma simultánea, explorando con ello la posible interacción entre las dos vías.

Introducción

1. La hipótesis colinérgica del aprendizaje y la memoria.

El proceso de envejecimiento va acompañado de un deterioro en varias funciones del organismo, entre ellas la ejecución tanto sensorial como motora, y de manera muy particular el deterioro paulatino que suele observarse en las funciones cognitivas (Muir, 1997). Dentro de este contexto, la demencia es caracterizada como un grupo de condiciones que propician un deterioro gradual de las habilidades intelectuales, al punto que el funcionamiento social y laboral puede verse gravemente afectado. La enfermedad de Alzheimer (demencia primaria) es una de las dos categorías en que se pueden dividir todos los tipos de demencia (Muir, 1997). El comienzo de esta enfermedad —que se da típicamente en la quinta década del individuo— conduce a desarrollar patrones de deterioro cognitivo que se parecen en varios aspectos a la demencia senil (demencia secundaria) (Coyle *et al.*, 1983). El análisis neuropatológico de los cerebros provenientes de individuos de ambas afecciones presentan anormalidades características que sugieren bases biológicas comunes. Dentro de estas evidencias destacan: la formación de placas neuríticas, filamentos proteínicos helicoidales que suelen acumularse dentro de los cuerpos celulares de las neuronas, y el hecho de que ambas enfermedades puedan presentarse de forma autosómica dominante en algunas familias.

Por otro lado, uno de los hallazgos que sugirió un importante papel para la acetilcolina (ACh) en los procesos de memoria, fue el hecho de que exámenes post-mortem de individuos que en vida habían presentado síntomas de demencia

tipo Alzheimer mostraban índices de actividad de Transferasa de la Acetilcolina (Choline Acetyltransferase: ChAT) anormalmente bajos (Perry *et al.*, 1978). Esta enzima es considerada un marcador bioquímico para neuronas colinérgicas, ya que participa en la síntesis de Ach. Este tipo de efectos también fueron observados en individuos en demencia senil (Constantinidis, 1978).

Posteriormente se demostró una pérdida de neuronas colinérgicas en el cerebro anterior basal (Cab) en personas que habían padecido Alzheimer. Paralelamente, se sabe que drogas (como la escopolamina y la atropina) que bloquean los receptores celulares a acetilcolina afectan las habilidades mnemónicas (Bartus, 1982). Además, dichos efectos parecen revertirse con drogas colino-miméticas. También, se probó que pacientes afectados por Alzheimer mejoraban sus capacidades mnemónicas cuando se les administraba fármacos de este tipo (Bartus, 1982).

Aunque la evidencia aún es controvertida, la integración de todos estos estudios instrumentaron lo que vino a denominarse "Hipótesis colinérgica de la disfunción mnemónica" (Bartus, 1982), y que en principio establece que el empeoramiento observado en el aprendizaje y la memoria, tanto en los individuos con demencia senil como en aquellos que sufren de demencia tipo Alzheimer, es atribuible al decaimiento en los sistemas colinérgicos del cerebro anterior basal. En su formulación inicial esta hipótesis —de ser corroborada— debería satisfacer los siguientes requerimientos:

a.- Deben encontrarse disfunciones específicas en marcadores colinérgicos en los cerebros de sujetos que sufren disfunciones mnemónicas relacionadas con la edad.

b.- La interrupción artificial de las funciones colinérgicas centrales en sujetos jóvenes deben inducir deterioros conductuales que mimeticen las pérdidas cognitivas que se encuentran en individuos viejos.

c.- El incremento apropiado de la actividad colinérgica central en los individuos viejos debe reducir significativamente los deterioros cognitivos relacionados con el envejecimiento.

2. Neuroanatomía del sistema.

2.1. El cerebro anterior basal.

El término de "cerebro anterior basal" (Cab) se refiere a un grupo heterogéneo de estructuras, tanto telencefálicas como diencefálicas, que se encuentran localizadas en la parte ventral del cerebro, por debajo o al nivel de la comisura anterior (Alheid y Heimer, 1988).

Las principales regiones que lo conforman son: el continuo hipotalámico preóptico-anterior, el núcleo septal, el lecho del núcleo de la estria terminalis, el núcleo de la banda diagonal, la *substantia innominata* (SI) que incluye el núcleo basal de Meynert, el *nucleus accumbens*, el tubérculo olfativo, la corteza olfatoria y el núcleo amigdalóide (Alheid y Heimer, 1988).

Dentro del cab es posible reconocer tres sistemas principales, que a la sazón se encuentran estrechamente relacionados, estos son: El sistema estriatopallidal, la amígdala centro-medial y su extensión en la parte media del cerebro anterior rostral, y el complejo identificado como neuronas corticopetales del cab. El enigmático territorio que generalmente ha sido referido como "*substantia*

innominata" parece estar compuesto de porciones de estos tres sistemas (Alheid y Heimer 1988).

Existen numerosos estudios en los cuales se ha corroborado cambios significativos —tanto bioquímica como histológicamente— en alguna o varias de las estructuras del cab en desórdenes del sistema nervioso tales como: esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Alzheimer. Los resultados de los estudios llevados a cabo —tanto desde la perspectiva clínica, como desde la fisiológica y conductual— dejan poca duda acerca del importante papel que juega el cab en toda una serie de conductas que van desde instintos básicos hasta funciones cognitivas complejas (Alheid y Heimer, 1988).

Las estructuras del cab están involucradas en varias reacciones conductuales, tales como: sueño, conducta de alimentación o forrajeo, agresión, atención y particularmente aprendizaje. Existe evidencia de que la mayoría de estos patrones conductuales se ve afectada por drogas colinérgicas (Wenk y Bigl 1980).

2.2. Neuroanatomía del Núcleo Basal de Meynert.

La primera descripción exacta que se hizo de este núcleo fue llevada a cabo por Von Kolliker, quien lo nombró de esta forma en honor a su descubridor (Wenk, 1997). El describe las células nerviosas del Nucleus de Meynert como células multipolares, con un rango de tamaño de 20 a 30 μm , que con frecuencia aparecen fuertemente teñidas —en una forma parecida a las células del *Locus Coeruleus*—, sólo que en éstas la tinción no es muy consistente (Gorry, 1963). El núcleo basal de Meynert (nBM) se extiende dentro de la *substantia innominata* de Reichet (SI); dicha área está a su vez inmersa en la región sublenticular. (Wenk,

97). Cabe mencionar que la SI no tiene límites definidos y no es definida como una unidad anatómica (Gorry, 1963). Como ya fue mencionado, la *substantia innominata* está compuesta por tres sistemas reconocibles, íntimamente relacionados: el sistema estriatopallidal, la amígdala centro-medial y su extensión en la parte media del cerebro anterior rostral, y el complejo identificado como neuronas corticopetales del cab (Adlher y Heimer, 1988).

En primates el nBM está conformado por grupos de células agregadas (islas) más o menos conectadas. Sin embargo, existen también muchas neuronas aisladas que invaden la lámina medular entre el putamen y el globus pallidum, y que infiltran el núcleo septal y la parte horizontal del núcleo de la banda diagonal de Broca (Wenk y Bigl, 1980). De acuerdo a varios estudios el nBM contiene una población de neuronas colinérgicas de gran tamaño que muestran una proyección amplia y aparentemente difusa a los campos ipsilaterales de la neocorteza frontal, temporoparietal, sensorio-motora y occipital; así como, al bulbo olfatorio, y la formación hipocampal (Wenk y Bigl, 1980). Por otro lado, también existen neuronas no colinérgicas en esta región basal que puede proyectar a la corteza (Alheid y Heimer, 1988; Candy *et al.*, 1985).

Es interesante señalar que dado que el nBM pareciera seguir una gradación filogenética —es decir que su volumen y diferenciación estructural se incrementa en aquellos phyla con sistemas nerviosos centrales más complejos (por ejemplo: cetáceos y primates)—, se ha sugerido que el nBM puede ser considerado como un marcador del grado de desarrollo del cerebro (Gorry, 1963), esto es, este incremento en la diferenciación del nBM corresponde a una diferenciación total del cerebro y en particular a un desarrollo de las regiones neocorticales (altamente

correlacionadas con funciones cognitivas complejas). Esto es importante, porque el desarrollo del NBM durante el curso de la evolución y su correlación con una complejidad progresiva y el desarrollo de la inteligencia, lo hacen un excelente candidato para el desempeño de un papel trascendente en funciones integrales y conductuales de gran relevancia (Wenk y Bigl, 1980)

El llamado "complejo colinérgico basal", incluye la estructura homóloga del núcleo basal de Meynert en la rata, que es denominada Núcleo Basal Magnocelular (NBM). El complejo colinérgico basal, además del NBM comprende a otras estructuras del cab: septum medio, área preóptica media, la región ventral pallidum/sustantia innominata, la banda diagonal, la ansa lenticularis y los aspectos laterales del área hipotalámica (Bigl *et al.*, 1982). Este complejo provee de una amplia y organizada inervación colinérgica aferente a varias zonas cerebrales, entre ellas: el manto neocortical, el bulbo olfatorio, el hipocampo y la amígdala (Bigl *et al.*, 1982; Lehman *et al.*, 1980).

Por medio de estudios basados en la concentración de acetilcolinesterasa (AChE) y ChAT se estableció que el arreglo de las células del NBM dentro de la SI en la rata es menos ordenado en comparación con los primates (Wenk y Bigl, 1980; Sofroniev *et al.*, 1982; Fibiger, 1982). Así pues, el NBM está conformado por grupos difusos localizados tanto dentro de la SI, como en el pallidum ventral y la parte ventral del *globus pallidus dorsal* (Everitt *et al.*, 1987). Además pueden encontrarse muchas células aberrantes del NBM mezcladas con neuronas del núcleo entopeduncularis (Divac, 1976). El NBM muestra una inervación amplia pero no difusa hacia la neocorteza (Bigl *et al.*, 1982). Shute y Lewis (1967)

precisaron, mediante estudios de distribución de AChE, que esta inervación es principalmente colinérgica y que comprende la mayor parte de la entrada extrínseca de acetilcolina en la neocorteza de mamíferos.

Por otro lado, mediante estudios de marcadores fluorescentes combinados con marcadores colinérgicos se ha comprobado la existencia de aferencias del NBM a la amígdala (Nagai *et al.*, 1982) y al núcleo reticular del tálamo (Hallanger *et al.*, 1987). Ulteriormente, se precisó que el núcleo basolateral de la amígdala (ABL) recibe una amplia inervación colinérgica de células localizadas en el NBM, y que, en contraste con las células colinérgicas que inervan la corteza dichas células no presentan el receptor p75 al factor de crecimiento neural NGF (Heckers y Mesulam, 1994). Al parecer el resto de los núcleos amigdalinos también reciben una inervación colinérgica del NBM, pero sus aferencias son tanto positivas como negativas para el p75 (Heckers y Mesulam, 1994). Por otro lado, los estudios de marcadores fluorescentes identificaron células del NBM marcadas con el marcador fluorescente pero negativas para el marcador colinérgico. Esto implica que también hay una aferencia del NBM a la amígdala no colinérgica (Nagai *et al.*, 1982). Con respecto al tálamo las aferencias son en su mayoría colinérgicas, aunque también se observaron no colinérgicas (Hallanger *et al.*, 1987).

Las vías de que inervan al NBM son las mismas que se observan respecto al *globus pallidus*, y provienen del putamen, la amígdala y el tálamo (Haring, 1986). Estas relaciones anatómicas se observan tanto en la figura 1 como —de forma esquematizada— en la figura 2.

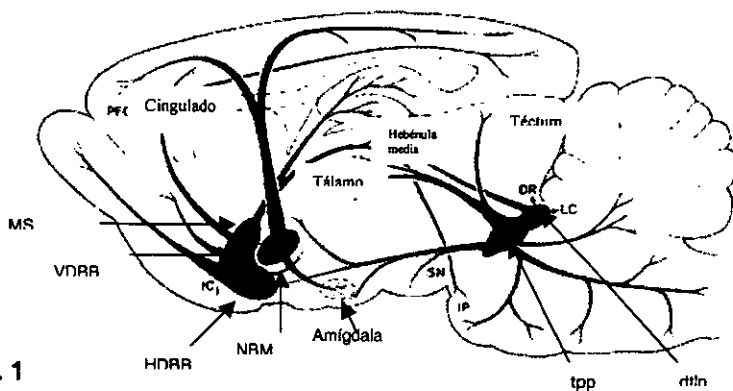


Fig. 1

Distribución de las neuronas colinérgicas y sus proyecciones en el cerebro de rata. Abreviaturas: MS, septum medio; VDBB, núcleo vertical de la banda diagonal de Broca; HDDB, núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca; NBM, núcleo basal magnocelular; tpp, núcleo del pedunculopontino tegmentado; dltm, núcleo laterodorsal tegmentado; PFC, corteza prefrontal; ICj, isla de Calleja; SN, sustancia negra; IP, nucleus interpeduncular; DR, rapé dorsal; LC, locus coeruleus (Modificado de Everitt, 1998).

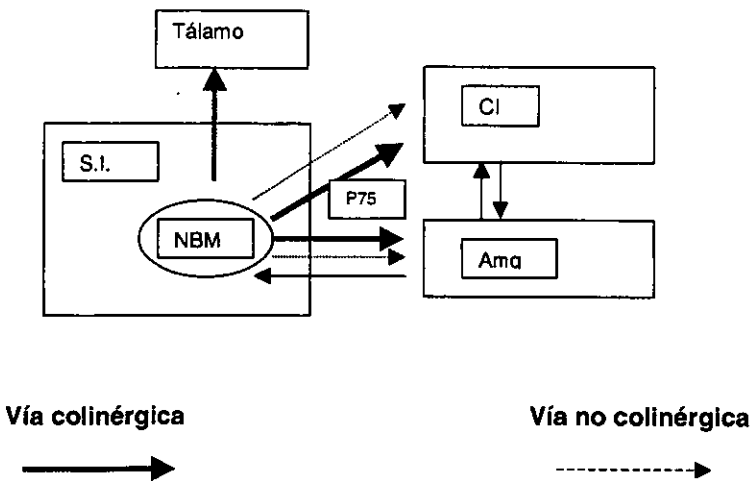


Fig. 2. Esquema de las relaciones anatómicas de sistema

3. Fisiología del NBM: Cognición y Colinergismo.

3.1. En busca de la especificidad.

Gran parte del interés que se le ha dedicado al NBM inició a partir de los indicios sobre la depauperación, tanto en número como en tamaño y función de las células colinérgicas del núcleo basal de Meynert, asociada con la edad y la enfermedad de Alzheimier (Whitehouse *et al.*, 1981). Este fue uno de los argumentos instrumentales que parecen apoyar la ya mencionada "Hipótesis colinérgica de la disfunción de la memoria". Ello, aunado a la evidencia farmacológica, estimuló un gran número de estudios que se enfocaron en el desarrollo de modelos animales de demencia, basados en el bloqueo colinérgico y la lesión del sistema colinérgico del cerebro anterior basal (Dunnett y Barth, 1991).

Los primeros estudios que exploraron los efectos de lesionar el NBM en tareas de aprendizaje utilizaron técnicas de lesión sumamente inespecíficas: entre ellas pulsos de radiofrecuencia (Dubois *et al.*, 1985; Hepler *et al.*, 1985a) y lesiones electrolíticas (Miyamoto *et al.*, 1985; Lo Conte *et al.*, 1982). Este tipo de lesiones daña tanto los cuerpos celulares como los axones que pasan o se encuentran adyacentes al NBM. Con estos estudios se observaron graves efectos en prevención pasiva y laberinto en T, algunos de los paradigmas de aprendizaje más usados. Sin embargo, la atribución de dichos efectos al daño en el sistema colinérgico se vuelve difícil, ya que se ha comprobado que este tipo de lesiones reducen la inervación dopaminérgica y noradrenérgica a la corteza (Dubois *et al.*, 1985), además de dañar las fibras de paso.

Las lesiones químicas con excitotoxinas son más selectivas que las lesiones previamente mencionadas, ya que sólo destruyen los cuerpos celulares en el sitio

de inyección pero no las fibras de paso (Coyle *et al.*, 1983). El ácido iboténico (IBO) y el Kainico (KA) fueron las primeras neurotoxinas que se aplicaron en diversas regiones del cab —entre ellas el NBM—, con el objetivo de evaluar su efecto en tareas de aprendizaje. Múltiples reportes acreditan efectos negativos en distintas tareas de aprendizaje como: prevención pasiva y activa (Miyamoto *et al.*, 1985; Hepler *et al.*, 1985a); laberinto en T, laberinto radial (Hepler *et al.*, 1985 a,b; Dunnett ,1991; Mayo *et al.*, 1988); tareas de apareamiento retardado de claves(Dunnett, 1985); laberinto de dieciséis brazos (Murray y Fibiger, 1985); laberinto de agua (Miyamoto *et al.*, 1985; Riekkinen *et al.*, 1991). Sin embargo, en el caso del Kainico se comprobó que dada la magnitud del daño no específico, particularmente en el palido ventral y dorsal, esta toxina no es apropiada para estudios conductuales como consecuencia del daño al sistema colinérgico del NBM (Dunnett *et al.*, 1987). Con respecto al IBO se demostró que la disminución colinérgica que este produce no correlaciona con el nivel de daño cognitivo; además, de que al igual que el KA, daña a células del *globus palidus* dorsal y ventral (Everitt *et al.*, 1987). Ya que la pérdida neuronal colinérgica se confunde con la destrucción general de células a través del *globus palidus*, resulta problemático una interpretación colinérgica de los daños conductuales que se observan con este par de toxinas.

La posterior aparición de otras neurotoxinas como el NMDA, el AMPA y el ácido quisquálico (Quis) permitió efectuar estudios comparativos acerca de los distintos efectos de estas toxinas en los paradigmas de aprendizaje. Varios estudios comparan los efectos entre el Quis y/o AMPA vs el IBO y/o NMDA inyectados en el NBM, y muestra que los últimos dos producen mayores daños en memoria a

pesar de que los deterioros en la ChAT cortical son similares para las tres excitotoxinas (Connor, 1991; Dunnett *et al.*, 1987; Evenden *et al.*, 1989; Riekkinen *et al.*, 1991; Waite *et al.*, 1994; Ammassari-Teule, 1993). Principalmente la utilización de AMPA, que produce un daño colinérgico casi total y un daño no específico aún menor que el Quis, no produjo ningún daño en el aprendizaje de varias tareas (Page *et al.*, 1991; Waite *et al.*, 1994). El siguiente candidato en la búsqueda de un agente específico fue el AF64A, un inhibidor del transporte de colina, los indicios iniciales parecían indicar que, administrada intraventricularmente, no daña otros sistemas neuronales como los de catecolaminas e indolaminas (Torres *et al.*, 1994), y el daño a los sistemas colinérgicos era aun mayor que el AMPA; por desgracia, se comprobó que al ser administrado intraparenquimálmente, produce extensos daños tisulares y destrucción neuronal inespecífica (McGurk *et al.*, 1987).

A partir de todo lo anterior el corolario podría dividirse en dos partes:

- a) Las neurotoxinas pueden incrementar la especificidad de las lesiones al dejar intactas las fibras de paso en la vecindad del NBM, incluyendo las fibras dopaminérgicas y noradrenérgicas, esta selectividad depende de la dosis y el tipo de neurotoxina usada, y en ningún caso esta selectividad es total (Dekker *et al.*, 1991).
- b) Conforme se obtuvieron toxinas cada vez más específicas, con respecto al sistema colinérgico del NBM, se observó que los daños conductuales fueron menores o incluso nulos.

3.2. 192IgG –saporina: la búsqueda consumada.

Una nueva y poderosa aproximación al problema de la especificidad emergió con el acoplamiento del anticuerpo monoclonal 192IgG para el receptor de baja afinidad de NGF p-75 con la toxina vegetal saporina, esta toxina actúa inactivando ribosomas y con ello deteniendo la síntesis proteica (Wiley, 1992). En el caso de este receptor se encuentra casi exclusivamente en las neuronas colinérgicas magnocelulares que inervan a la corteza (Dawbarn *et al.*, 1988), aunque también hay evidencia de que existe en las células no colinérgicas de Purkinje del cerebelo (Wiley, 1992). Al administrar esta toxina a nivel intraventricular se ha observado una pérdida casi total de neuronas colinérgicas del septum, la banda diagonal de Broca y el NBM (Book *et al.*, 1992); además se ha comprobado un franco decremento en la actividad de ChAT en la neocorteza, el hipocampo y el área septal (Nilsson *et al.*, 1992). En estos estudios se observaron decrementos en la ejecución del laberinto de agua, pero dichos efectos —debido a la administración intraventricular— podían deberse al daño de las células de Purkinje que residen en el cerebelo. Sin embargo, se ha demostrado que la inmunotoxina 192IgG-saporina (IgS) inyectada directamente en el NBM induce una pérdida selectiva de las proyecciones colinérgicas corticales dependientes de NGF (Heckers y Mesulam, 1994), produciendo una reducción cortical de ChAT de más del 80% (Berger *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1994; Wenk, 1994). Pese a esta deafferentación colinérgica cortical jamás alcanzada con otras toxinas, esta inmunotoxina ha fallado en reproducir los daños en aprendizaje observados con otras excitotoxinas como: laberinto de agua (Torres *et al.*, 1994; Baxter *et al.*, 1995; Dornan, 1997, Berger *et al.*, 1994), prevención pasiva (Torres *et al.*, 1994; Wenk, 1994), tareas

de apareamiento de posición (Torres *et al.*, 1994), laberinto en T (Wenk *et al.*, 1994) y CAS (Gutiérrez, 1999).

Estos resultados parecen concordar con el hecho de que aquellas toxinas que producen un mayor daño en el sistema colinérgico del NBM no tienen efecto en tareas de aprendizaje, y ponen en duda la importancia de la inervación colinérgica cortical en el aprendizaje.

3.3 NBM y atención.

Un hecho destacable es que existen reportes que asocian al NBM con procesos de atención. La atención ha sido definida como una activación neuronal puntualizada de cierta red, que es relevante para una tarea cognitiva específica (Wenk, 1997). Esencialmente la atención es la expresión conductual cognitiva de un mecanismo neuronal que selecciona la información relevante, usualmente sensorial, y simultáneamente ignora información irrelevante para un cierto objetivo específico (Wenk, 1997). La utilización de IgG-saporina produjo déficits en tareas relacionadas con la atención (McGaugy *et al.*, 1995). Lo que ha conducido a proponer que la vía colinérgica del NBM a la corteza interviene principalmente en procesos de atención más que en aprendizaje.

4. El Condicionamiento Aversivo a Sabores (CAS).

4.1 El Cas como un paradigma de Aprendizaje.

El aprendizaje en su definición más sucinta es la generación o modificación de representaciones internas de la realidad basadas en la experiencia previa (Dudai, 1989). El aprendizaje asociativo es aquel en el que el organismo aprende

relaciones entre eventos de la realidad, estos eventos pueden ser estímulos o acciones. Como se verá a continuación el fundamento del Cas es precisamente la asociación entre un estímulo y una acción. A saber, un sabor novedoso y el efecto que este tiene en el estado interno del organismo.

Una de las características más importantes en el mantenimiento de la homeóstasis en los animales es la capacidad de éstos para seleccionar, a partir de las fuentes disponibles de alimento, una dieta adecuada y balanceada que contenga los nutrientes apropiados. En este sentido, es de vital importancia la utilización de la experiencia previa para efectuar dicha elección. Ello es una demostración espectacular de la adaptación a un ambiente en continuo cambio. Este rasgo es fundamentalmente el principio a partir del cual surge el CAS, como un paradigma en el cual el sujeto adquiere aversión a un sabor novedoso cuando su consumo es seguido de un malestar interno.

Dicho malestar interno puede ser producido de varias formas, entre ellas: irradiación con rayos Gama (García 1955), irritación gástrica producida a partir de la administración de cierto agente irritante, usualmente LiCl (Bures *et al.*, 1988), estimulación por rotación (Gallo *et al.*, 1999), administración de ciertos fármacos como anfetaminas y carbacol (Bielavska y Bures, 1994) o incluso en humanos la sugestión verbal (García, 1985). Esta capacidad es de suma importancia en la identificación de sustancias tóxicas que se encuentran en el ambiente.

Es claro que este fenómeno es sumamente complejo como para ser usado como tal en análisis de laboratorio. Con el fin de simplificarlo y facilitar su evaluación cuantitativa la innovación en la dieta es restringida a un solo sabor novedoso cuando la comida a la que habitualmente está acostumbrado el sujeto no está

disponible (García y Koelling, 1966). En el experimento estándar las ratas son adaptadas a un régimen de privación de líquidos durante la mayor parte del día y entrenadas a consumir su ración de agua en un periodo de 15 minutos diarios a una misma hora. Posteriormente se le presenta al animal el sabor novedoso (por ejemplo sacarina o sal) disuelto en agua, y se registra el volumen consumido para su posterior comparación con la línea de consumo asintótica de los días previos. Este sabor novedoso funge como estímulo condicionado (EC) que es apareado horas después con el malestar gástrico (estímulo incondicionado-EI) y que produce una serie de síntomas característicos del envenenamiento (respuesta incondicionada-RI). Después de un periodo, usualmente marcado por el número de días necesarios para reestablecer el nivel de consumo de agua previo a la adquisición, se expone al individuo de nuevo al estímulo condicionado (es decir el sabor), lo que revela un marcado decremento en el consumo del fluido respecto de la primera exposición (respuesta condicionada-RC) (Bures 1997)(Fig. 3).

Pese a que frecuentemente se piensa en el CAS como uno más de los muchos condicionamientos clásicos, este no cabe en dicho rubro, dado que el CAS es perfectamente factible sin una respuesta incondicionada identificable. Por ejemplo: la radiación gamma produce efectos aversivos apropiados sin mostrar émesis o cualquier otra conducta identificable con la RI. Así pues, lo que distingue al CAS de los condicionamientos clásicos es que la RC es parte del repertorio de respuestas provocadas en la modalidad sensorial para el EC, en este caso el gusto. Aunque la respuesta es apropiada para el EI, en el que el malestar frecuentemente produce decrementos en el consumo de comida, el decremento

no es general, sino que es específica al EC. La RC no es similar a la respuesta provocada por el EC antes del condicionamiento, sino más bien opuesta. Por lo que el EI no actúa como un provocador de las principales características de la RC. Lo que en realidad hace es cambiar la respuesta provocada por el EC de una forma (ingestiva) a otra (aversiva) (Chambers,

1990). Así pues, la asociación entre el sabor novedoso y el malestar posibilita un cambio en el valor hedónico de una determinada sustancia (Kiefer, 1985).

El CAS se caracteriza por dos principios generales que lo diferencian de los paradigmas tradicionales de aprendizaje: la capacidad de establecer el aprendizaje aún cuando el intervalo de tiempo entre CS y el US pueda ser de varias horas (García, 1985) y la sobresaliente persistencia del aprendizaje después de un solo apareamiento entre lo ingerido y el malestar del organismo (Chambers, 1990).

El CAS es un fenómeno ampliamente observado en todo tipo de animales: pese a que la divergencia entre invertebrados y vertebrados ocurrió hace 500 millones de años, existen ejemplos caracterizados en ambos grupos con rasgos casi idénticos. En realidad aún no tenemos suficientes datos que determinen, con toda precisión, si estos paralelismos se deben a que es un rasgo ancestral que ha sido heredado de manera homóloga a través de la filogenia de los animales; o por el contrario —y más probablemente— ha evolucionado en múltiples ocasiones, y lo que observamos son las convergencias de dicho fenómeno evolutivo. Cualquiera que sea el patrón, la universalidad del proceso sugiere la importancia que reviste este proceso en la sobrevivencia de los organismos y por tanto su posible valor adaptativo.

PROTOCOLO CAS CON UNA BOTELLA

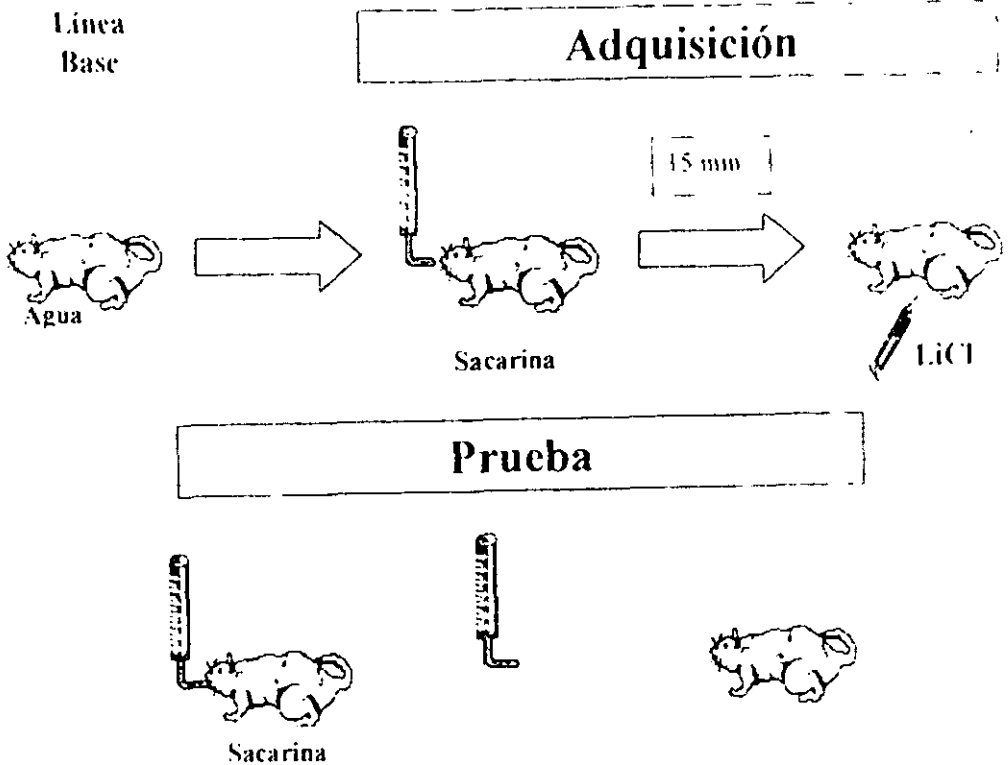


Figura 3. Los sujetos son adaptados a un régimen de privación de líquidos durante la mayor parte del día y entrenadas a consumir su ración de agua en un periodo de 15 minutos diarios a una misma hora (línea base). Posteriormente se le presenta al animal el sabor novedoso (por ejemplo sacarina o sal) disuelto en agua y después de 15 minutos se le administra al sujeto intraperitonealmente un irritante gástrico (LiCl), este es el proceso de adquisición del aprendizaje. Durante la prueba se registra el volumen consumido del sabor a prueba para su posterior comparación tanto con el consumo de la adquisición, como con la línea de consumo de los días previos.

4.2. El sustrato neuronal.

Durante el CAS la información gustativa, en primer lugar, es llevada principalmente por dos nervios craneales: el facial (VII) y el glossofaríngeo (IX), con una pequeña contribución del vago (X). Todas estas fibras convergen tanto en la porción anterior como en la región rostral del Núcleo del Tracto Solitario (NTS); que también recibe información tanto del tracto gastrointestinal por medio del vago, como del Área postrema (AP), que es sensible a las toxinas transportadas por vía sanguínea; y del sistema vestibular (que es sensible a la náusea causada por movimiento). El Núcleo Parabraquial Pontino (PBN) medial es el siguiente relevo en la transferencia de la información a partir del NTS, este núcleo presenta comunicación directa con la CI (Lasiter *et al.*, 1982) y el AP. A partir de aquí la información diverge en dos cursos: el PBN manda proyecciones a las estructuras ventrales del cab como el núcleo central de la amígdala (que parece que también recibe proyecciones del NTS), el hipotálamo lateral, la *substantia innominata*, y al núcleo de la base de la estria terminalis (BNTS). Por otro lado una segunda proyección parte al núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPMpc). Fibras del VPMpc proyectan a la neocorteza gustativa (GN), en particular a la corteza insular (CI), que en la rata se encuentra localizada en el aspecto anterolateral de la corteza. La CI finalmente proyecta en vías descendentes al VPMpc, la amígdala central, PBN y NST (Chambers 1990).

El malestar producido por el agente inductor es canalizado en dos formas: a través de las aferentes vagales que transmiten el efecto del malestar gástrico a la región caudal del NTS; alternativamente, la toxina puede ser absorbida por medio de la

sangre, en cuyo caso es detectada en el Área Postrema (AP), que proyecta finalmente al NTS, de ahí la información se encausa al PBN y a la corteza CI. En el caso del LiCl no está bien claro el proceso mediante el cual produce el malestar, al parecer utiliza ambas vías: la sanguínea— siendo captado en el AP— y la canalizada por irritación gástrica a través de las aferencias vágales.

Hay un acuerdo generalizado acerca de que el primer punto en que se da la integración de la información gustativa y las señales viscerales tiene lugar en el NTS, y que la expresión conductual de la adquisición y retención del Cas requiere de la participación de las estructuras del cab, así como de la CI (Bures *et al.*, 1997) (Figura 4).

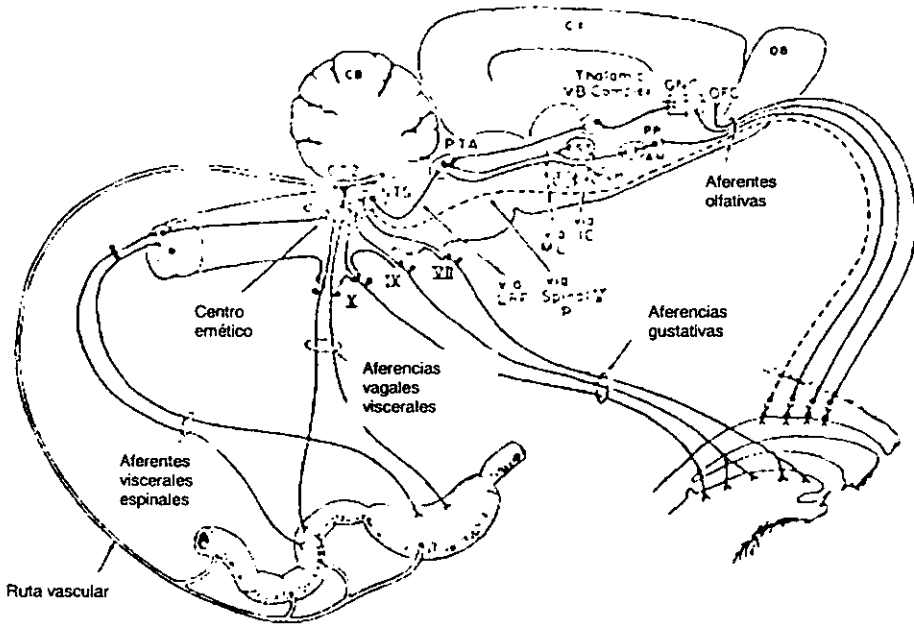


Figura 4. Representación de las vías viscerales y gustativas en las ratas.

Abreviaturas (AM) amígdala, (CB) cerebellum, (CTZ) quimiorreceptor de la zona de disparo, (CX) corteza, (GNC) Neocórtex gustatoria, (IC) cápsula interna, (LH) hipotálamo lateral, (LRF) formación reticular lateral, (ML) lemnisco medio, (NTS) Núcleo del tracto solitario, (OB) Bulbo olfativo, (OFC) neocórtex orbito-frontal, (PP) corteza prepiriforme, (PTA) área pontina del gusto, (SI) *substantia innominata*, (ST) nucleus subtalámico, (VB) complejo ventrobasal talámico
(Modificado de Kiefer, 1985)

4.2.1. La corteza insular (CI): integración de alto nivel.

La corteza insular en la rata es definida como un área que se extiende en la dirección rostrocaudal de la corteza frontal lateral a la corteza perirhinal; y del límite ventral de la corteza somatomotora a la corteza piriforme en la dirección dorsoventral. La localización particular de la CI así como sus conexiones sugieren fuertemente que esta región cerebral juega un papel importante en la integración y posiblemente en el almacenamiento de la información visceral y sensorial. Las conexiones que pueden ser importantes para el procesamiento de aprendizaje incluyen: la amígdala, el núcleo dorsomedial del tálamo y la corteza prefrontal (Bures *et al.*, 1998). Se sabe que la inactivación reversible de la CI afecta la adquisición del aprendizaje aversivo como del laberinto de agua (Bermúdez *et al.*, 1991b). Por otro lado, una gran cantidad de reportes subrayan la importancia de la CI en la asociación de los distintos aspectos relacionados con la información gustativa (Aggleton *et al.*, 1981; Nachman y Ashe, 1974; Kiefer, 1985), más no en la respuesta hedónica a nuevos sabores. Así pues las ratas lesionadas en CI muestran daños en la adquisición y retención de los estímulos gustativos, pero responden normalmente en la detección de dichos estímulos. Es decir: son incapaces de cambiar el valor hedónico de un determinado sabor que es seguido por un malestar sistémico (y por lo tanto no pueden aprender), pero si pueden evadir los sabores naturalmente aversivos y responder a los naturalmente hedónicos (Kiefer, 1985).

4.2.2. Otros sistemas de neurotransmisión.

Cabe mencionar que recientemente Berman *et al.* (2000) analizaron el efecto de varios sistemas de neurotransmisión, encontrando que varios de ellos son necesarios para consumir el CAS. Sin embargo, existen diferencias en la especificidad de efectos sobre la memoria. Una gran variedad de receptores en la CI, entre ellos: glutamatérgicos, adrenérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos, y gabaérgicos son necesarios para la adquisición del CAS. Sin embargo, los receptores a GABA y AMPA son también indispensable durante la evocación, sugiriendo un papel importante en la integración de la información necesaria para el CAS

5. Amígdala, NBM y CAS: una confusión prometedora

La "amígdala" o "el complejo amigdalino" es un sistema al que se le describe como una región altamente diferenciada próxima al polo temporal de los hemisferios cerebrales (Swanson y Petrovich, 1998). Clásicamente, se le divide en dos grupos principales: uno, filogenéticamente más antiguo, compuesto por los núcleos medial, central y cortical; y otro, de aparición más reciente comprendido por los núcleos basal y lateral (Bures *et al.*, 1997). Sin embargo, existe la opinión de que la amígdala en su conjunto no es una unidad anatómica ni funcional, sino que es una serie de estructuras sumamente heterogéneas que pertenecen a distintos sistemas funcionales (Swanson y Petrovich, 1998). Lo anterior resulta de la evidencia electrofisiológica y clínica que muestra a todas luces lo inadecuado de

dicha clasificación (Richardson, 1973). Sea como fuere, la amg es una de las estructuras del cab cuya participación en el aprendizaje emocional y de regulación de los procesos de atención ha sido ampliamente verificada (Gallagher y Holland, 1994). Está bien establecido que las lesiones del complejo amigdalino interrumpen la adquisición de una amplia variedad de tareas, particularmente aquellas que involucran una motivación aversiva (Bermúdez, 1991). Con respecto al CAS, se observó desde los primeros estudios que las lesiones de tipo electrolítico (Aggleton *et al.*, 1981; Fitzgerald y Burton, 1983), y de remoción tisular (Nachman y Ashe, 1974; Kolb *et al.*, 1977; Fitzgerald y Burton, 1983) de la amígdala basolateral (ABL) afecta la adquisición del CAS. Recientemente se verificó que el mismo efecto tiene la ablación funcional (Roldán y Bures, 1994). Por otro lado, hay evidencia que relaciona la adquisición del CAS con la presencia de ciertas proteínas involucradas en el aprendizaje como la CREB (Lamprecht *et al.*, 1997) y la proteína kinasa C (Yasoshima y Yamamoto 1997). Con respecto a las lesiones excitotóxicas la información es más contradictoria: existen reportes en que se establece que la aplicación de IBO o NMDA no dañan la adquisición del CAS, aunque si lo logra el daño electrolítico (Dunn y Everitt, 1988; Chambers 1990; Bermúdez, 1991). Esto puede deberse, como lo señala Fitzgerald y Burton (1983), a que las lesiones excitotóxicas no dañan las fibras de paso, mientras las lesiones electrolíticas si lo hacen. Sin embargo, Yamamoto (1993, 1991, 1994) y Morris (1999) encuentran a partir de lesiones excitotóxicas con IBO en la ABL que se afecta la adquisición del CAS, por otro lado la amígdala central y lateral no parece tener influencia en este aprendizaje (Galaverna *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1995). Lasiter (1985) concluye exactamente lo contrario, pues en sus

experimentos con excitotoxinas la amígdala central y lateral parecen jugar un papel importante en el CAS, mientras la ABL no parece ser crucial para este aprendizaje.

Como podemos observar la información que emerge a partir de las lesiones excitotóxicas es más bien contradictoria. Las diferencias en estos resultados podrían ser el reflejo de la aplicación de distintas excitotoxinas y procedimientos experimentales (Bures, 1997). Ello es probable, pues como ya fue analizado existen estructuras como el NBM en que distintas excitotoxinas tienen diferentes efectos sobre el aprendizaje.

Por otro lado, aunque el papel que juegan los distintos tipos celulares del NBM en procesos de aprendizajes no ha sido esclarecido, la mayor parte de las veces los efectos negativos en el aprendizaje de las lesiones excitotóxicas en el NBM han sido atribuidos a la deaferentación colinérgica hacia la corteza; es decir al daño en las células colinérgicas que inervan a la corteza. En particular, en el CAS existe evidencia de que lesiones con NMDA en el NBM interrumpen la capacidad para adquirir el aprendizaje de aversión a sabores (López García, 1993; Gutiérrez, 1999). Varios estudios comparan los efectos entre el Quis y el IBO y/o NMDA inyectados en el NBM y muestra que los últimos dos producen mayores daños en aprendizaje a pesar de que los deterioros en la ChAT cortical son similares para las tres excitotoxinas (Connor, 1991; Dunnett *et al.*, 1987; Evenden *et al.*, 1989; Riekkinen *et al.*, 1991), es decir: no hay correlación entre el daño conductual y el deterioro colinérgico cortical.

Adicionalmente, Boegman (1992a) encontró que el IBO y el NMDA aplicados en el NBM, destruyen las conexiones colinérgicas a la corteza y a la amígdala en una

magnitud equiparable; mientras que el Quis y el AMPA, dañan preferentemente a la aferencia cortical, pero no la aferencia a la amígdala. Es Beninger (1994) quien además de consolidar el hecho de que el Quis y el IBO dañan de forma equiparable la ChAT cortical y el IBO afecta más la ChAT amigdalina, verifica que esta última excitotoxina produce mayores efectos en el laberinto en Y. Estos dos últimos reportes sugieren un importante papel de la conexión colinérgica NBM-Amg en el aprendizaje.

Para poner a prueba esta hipótesis Mallet (1995) usa ptálico, un compuesto que previamente había mostrado una mayor selectividad que el Quis para lesionar la vía NBM-Amg, los resultados indican que es el ptálico el que tiene mayores efectos deletéreos en el laberinto en Y.

El corolario de estos estudios puede enunciarse de la siguiente forma: diferentes excitotoxinas cuando son inyectadas en el NBM afectan diferencialmente las proyecciones colinérgicas a la corteza y la amígdala, y aquellas excitotoxinas que producen los mayores daños en el aprendizaje producen el mayor decremento en la ChAT amigdalina (Tabla I) (Beninger 1994). Esta conclusión parece ser apoyada por un estudio reciente en que se administra escopolamina en la amígdala produciendo deterioro en el laberinto en Y (Ingles, 1993).

Toxina en el NBM	Daño a vía NBM-Amg	Daño a Vía NBM-CI	Daño en aprendizaje	Tipo de aprendizaje
IBO	++++++	++++++	Alto	Laberinto en agua ^{16,31,87} , radial de 8 brazos ^{3,31} , radial de 16 brazos ⁷¹ , prevención pasiva y activa, laberinto en T ³¹
NMDA	++++++	++++++	Alto	CAS ⁴⁹ , laberinto en agua ³¹ , prevención pasiva y activa, laberinto en T ³¹
Quis	+	+++++++++	Nulo	Prevención pasiva ⁸⁷ , laberinto en Y ₆₃
AMPA	+	+++++++++	Nulo	Laberinto en Y ⁶³
Ptálico	+++++++++ +	+	Alto	Laberinto en Y ⁶³

Tabla I. Como puede observarse aquellas toxinas que dañan preferentemente la vía NBM-Amg son las que producen deterioros en el aprendizaje.

El hecho de que lesiones en el NBM con NMDA afecten el CAS y que lesiones con IgS no reproduzcan esos efectos (Gutiérrez, 1999), aunado a la importancia que parece tener la vía NBM-Amg en procesos de aprendizaje, pone de relieve la importancia de explorar la vía -NBM-Amg como una vía efectiva de procesamiento del CAS, alternativa a la NBM-CI.

Objetivo General

Caracterizar el papel tanto de la vía NBM- CI como de la vía NBM-Amg-CI en la modulación del Condicionamiento Aversivo a Sabores.

Objetivos particulares.

- 1) Caracterizar el efecto de la lesión excitotóxica en la Amg en el CAS.
- 2) Caracterizar el efecto de la lesión inmunotóxica en el NBM en el CAS.
- 3) Caracterizar el efecto de las lesiones simultáneas: excitotóxica en la amígdala e inmunotóxica en el NBM, sobre el CAS.

Planteamiento del problema.

A partir de las siguientes premisas:

- a) Las lesiones con NMDA en la CI impiden la adquisición en el CAS.
- b) Las lesiones en el NBM más específicas para la vía colinérgica NBM-CI (IgS, AMPA, Quis) no causan deterioro en el aprendizaje.
- c) Las excitotoxinas aplicadas en el NBM que si producen efectos en el aprendizaje son las que más dañan la vía NBM-Amg (IBO, NMDA).
- d) Algunos reportes muestran que las lesiones en Amg dañan el CAS
- e) La Amg y la CI están comunicadas recíprocamente

Se puede suponer que las vías NBM-CI y NBM-Amg-CI constituyen vías discretas distintas para el procesamiento del aprendizaje. Ambas vías son susceptibles de ser exploradas con el fin de evaluar la contribución de cada una de ellas en el proceso de la adquisición del CAS.

Hipótesis

Las vías ascendentes NBM-CI y NBM-Amg-CI constituyen vías discretas distintas que tienen un efecto independiente sobre el procesamiento del CAS.

Por lo tanto, ambas vías son susceptibles de ser exploradas con el fin de evaluar la contribución de cada una de ellas en el proceso de la adquisición del CAS.

Con este marco se pueden establecer las siguientes predicciones:

- Si la vía NBM-Amg-CI es la única necesaria para la adquisición del CAS, entonces lesiones excitotóxicas en Amg deben impedir el aprendizaje.
- Si el CAS es dependiente de la vía colinérgica NBM-CI entonces la IgS en el NBM debe impedir el aprendizaje.
- Si ninguna de las dos vías anteriores es crucial para el aprendizaje, la única forma de explicar que las lesiones excitotóxicas con NMDA en el NBM impidan el aprendizaje, es suponer que se trata de un sistema redundante entre ambas vías.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 49 ratas de la cepa Wistar con un rango de peso de 250-300 gramos. Las ratas fueron colocadas en cajas individuales y mantenidas en un ciclo constante de 12 horas de luz/oscuridad. Todas las manipulaciones conductuales fueron hechas en el ciclo de luz.

Procedimientos Quirúrgicos.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (65 mg/Kg) y colocados en un aparato estereotáxico. Las lesiones fueron realizadas por medio de la inyección de toxinas a través de una aguja dental calibre 30, conectada a una tubería de teflón unida a una microjeringa de vidrio de 10 μ l montada en una bomba de microinyección. Todas las lesiones siguieron las coordenadas indicadas por Paxinos y Watson (1986). El protocolo de lesiones se detalla a continuación.

Diseño Experimental.

Se formaron 6 grupos con distintos tratamientos: uno de ellos recibió infusiones bilaterales de NMDA en el NBM (n=8): exNBM. A otro se le aplicaron bilateralmente inyecciones de IgG-saporina (n=8) en el NBM: inNBM. Un tercer grupo, exAM, recibió infusiones bilaterales de NMDA en la amígdala basolateral (n=8). En otro se lesionó al NBM con IgS y simultáneamente a la amígdala con NMDA (n=8): inNBM-exAM. Un quinto grupo recibió inyecciones bilaterales de sustancia vehículo tanto en el NBM como en la amígdala (n=7): CNBM-AM. Un último grupo permaneció sin operarse como grupo control intacto(n=9):INT.

(Tabla II).

Tabla II. Diseño experimental. En la primera columna se muestran los grupos que son denominados con dos componentes: la partícula en minúsculas denota el tipo de lesión (excitotóxica o inmunotóxica), la partícula en mayúsculas indica la estructura lesionada (NBM o AMG)

Grupo	n	Toxina	Coordenadas		
			Anteroposterior	Lateral	Dorso-ventral
inNBM	8	IgS	-0.8	±2.5	-7.5
exNBM	8	NMDA	-0.8	± 2.5	-7.5
inNBM- exAM	8	IgS- NMDA	-0.8, -1.8	± 2.5, ± 4.7	-7.5, -0.8
exAM	8	NMDA	-1.8	± 4.7	-0.8
CNBM-AM	7	--	-0.8, -1.8	± 2.5, ± 4.7	-7.5, -0.8
INT	9	--			

Después de un periodo postoperatorio de dos semanas todos los animales fueron sujetos a un entrenamiento de CAS siguiendo el siguiente protocolo.

Procedimiento de CAS.

Dos semanas después de la cirugía todos los animales fueron privados de agua durante 24 horas. Posteriormente se les permitió beber agua cada 12 horas por 15 minutos, y se les midió el consumo. Cuando alcanzaron un nivel asintótico en el consumo, se efectuó la adquisición con el sabor novedoso: sacarina disuelta en

agua (1g/l). Quince minutos después se les indujo malestar gástrico administrándoles LiCl intraperitonealmente (.15 M; 7.5 ml/kg). Los siguientes tres días se les dio agua insabora durante los 15 minutos reglamentarios. Después, a manera de prueba se les dio a los sujetos agua con sacarina a la misma concentración que en la adquisición, y se les midió el consumo como una estimación de la fuerza de la aversión.

Histología.

Con el objetivo de observar el efecto sobre la vía NBM-Amg de las lesiones inmunotóxicas y excitotóxicas en el NBM se llevó a cabo el siguiente protocolo. Inmediatamente después del estudio conductual cinco animales de los grupos control, lesión intrabasal de NMDA e intrabasal de IgG- saporina fueron seleccionados aleatoriamente. Los animales fueron perfundidos por medio intrarterial con 100 ml de solución salina (0.6%) y 100 ml de fijador (paraformaldehído 4%, glutaraldehído al 0.1%, en buffer fosfato 0.1 M). Después fueron retirados los cerebros y de ellos se obtuvieron secciones coronales de 40 μm . A estos cortes se les procesó en una histoquímica para acetil-colinesterasa. Primero se les incubó una noche en un Buffer de acetato de sodio 50 mM; pH 5.0, 4 mM de sulfato de cobre, 16 mM de glicina, 4 mM de acetilcolina yodada y .1 mM de ethopropazina. Después de la incubación, el tejido fue sumergido en una solución reveladora (1% sulfuro de sodio) por 10 minutos. Posteriormente se captaron imágenes por computadora para la ABL usando una cámara DDC acoplada aun microscopio de luz. Después de la segmentación

automática de la ABL, se obtuvo el color medio de la densidad de la ABL usando una escala de grises de 256 niveles. Se analizaron seis secciones bilaterales a través de la ABL. El valor promedio de la media de grises entre las secciones fue determinado para cada cerebro.

Las células colinérgicas basales se tiñen intensamente para acetilcolinesterasa y muestran una recuperación particularmente rápida de la actividad enzimática después de la administración del inhibidor irreversible di-isopropilfluorofosfato (DFP). Este procedimiento revela fácilmente los somas colinérgicos del cab y sus procesos proximales. Por lo tanto se usó este método para verificar el efecto de las lesiones en el sistema colinérgico NBM-CI. Tres animales de cada uno de los tres grupos mencionados fueron sujetos a este procedimiento. El régimen de DFP-colinesterasa fue ejecutado, conforme al procedimiento de Bigl (1982), de la siguiente manera: los animales fueron inyectados intramuscularmente con 1.8 mg/kg de DFP dos horas antes de la perfusión. Una vez que se obtuvieron los cerebros y fueron cortados, las secciones fueron sometidas al proceso normal de acetilcolinesterasa ya detallado.

De los grupos INT e in NBM se tomaron cortes con el fin de realizar inmunohistoquímicas para el receptor de NGF p75. Estas se realizaron usando el protocolo estándar ABC avidina-biotina (Hsu *et al.*, 1981).

Resultados.

Condicionamiento Aversivo a Sabores.

Para establecer la comparación en el consumo de líquidos entre grupos se utilizó la ANOVA. Para los análisis Post-hoc, se utilizó la prueba de Fisher. Durante la etapa de línea base no se encontraron diferencias entre los grupos ($F_{(5,42)}=0.57$).

El consumo medio de línea base fue de: 14.94 ± 0.69 , 15.84 ± 1.23 , 14.87 ± 0.61 , 17.25 ± 1.0 , 17.55 ± 1.21 , y 17.47 ± 0.52 para cada uno de los siguientes grupos: INT, inNBM, exAM, inNBM-exAM, exNBM y CNBM-AM. Tampoco durante la adquisición se encontraron diferencias entre los grupos ($F_{(5,42)}=0.66$; $p > 0.05$).

Sin embargo, durante la presentación del sabor novedoso en la prueba se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que algunos grupos aprendieron y otros no ($F_{(5,42)}=19.38$; $p < 0.001$) (figura 5)

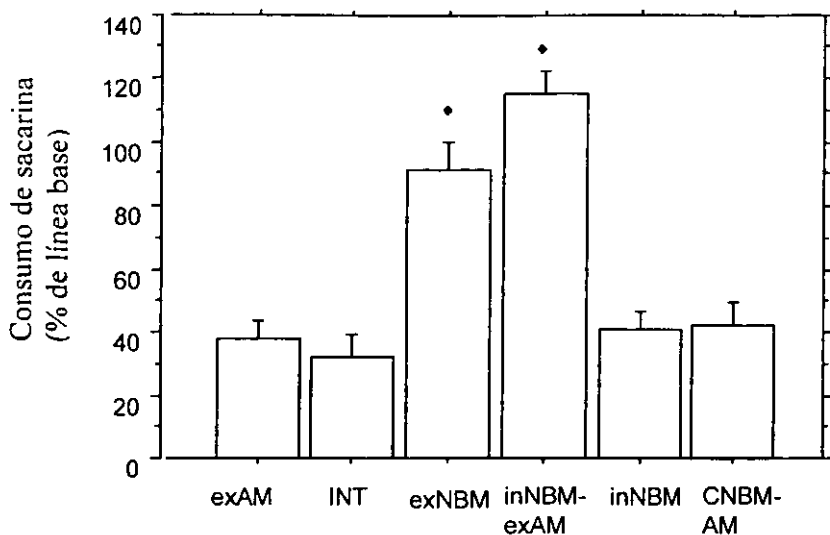


Fig. 5. Diferencias durante la prueba ente los diferentes grupos. Como puede observarse los grupos exNBM y inNBM-exAM son los que no aprendieron, el resto de los grupos muestran un CAS normal.

La prueba *post hoc* de Fisher muestra que los grupos que fueron lesionados con NMDA en el NBM (exNBM) y simultáneamente con IgS en el NBM y NMDA en la amg (inNBM-exAM) sufrieron un efecto negativo en la adquisición del CAS. Lo anterior se infiere a partir de su alto nivel de consumo cuando se les compara tanto con el grupo intacto (INT) como con el control de vehículo (CNBM-AM). Los grupos lesionados en el NBM con IgS (inNBM) y en la amg con NMDA (exAM) tuvieron un nivel de consumo estadísticamente indistinguible de los controles tanto intactos como vehículo.

Verificación de las lesiones.

Todas las lesiones en el NBM efectuadas tanto con NMDA como con IgS fueron verificadas por medio de DFP-colinesterasa. La destrucción específica de las

células colinérgicas con p75, causada por la infusión de IgS fue verificada por inmunohistoquímica p75 (figura 5: A,D). La correcta lesión por medio de NMDA en el NBM y la ABL fue verificada por medio de histoquímica de colinesterasa (Figura 6: B,E,C,F)

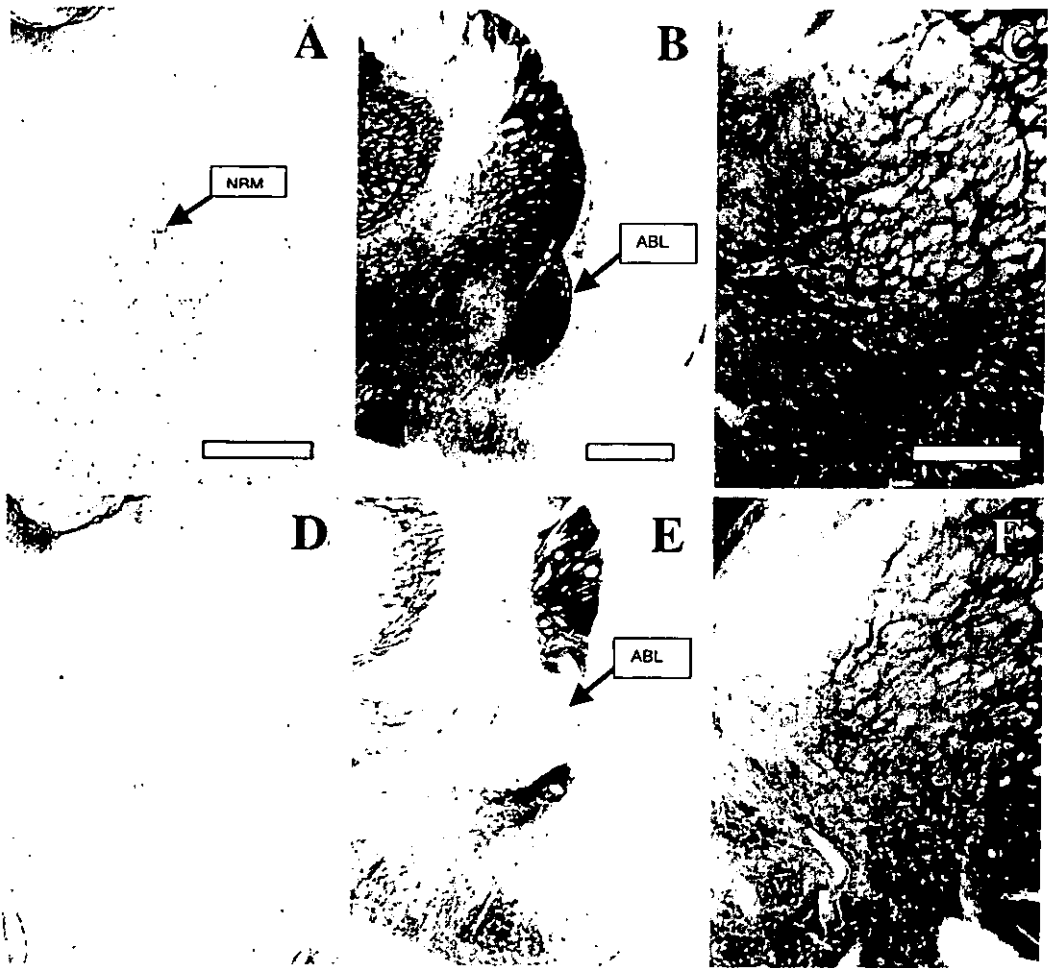


Figura 6 Confirmación de las lesiones. En A una inmunohistoquímica del NBM contra p75 muestra las células colinérgicas que son inexistentes en el individuo con la lesión de IgS: D. En B una tinción para AChE muestra la ABL de un control que contrasta con la lesión con NMDA en esta estructura (E). En C se observamos una tinción para AChE una colinesterasa en el NBM en un control versus un sujeto lesionado con IgS (F). La barra representa 600 μm .

La comparación de los efectos de lesiones en el NBM por NMDA e IgS sobre la ABL, fue efectuada mediante la comparación de dichos grupos con el control en la tinción de colinesterasa. La siguiente tabla muestra las diferencias que se encontraron en la tinción amigdalina, entre los animales con lesiones de NMDA en comparación a los controles ($F_{(2,12)} = 8.83$ $p < 0.01$). Sin embargo, dichas diferencias con respecto a los controles no se observan en los sujetos lesionados en el NBM con IgS (figura 7), corroborando lo observado por otros autores (Heckers, 1994, Heckers 1994, Mallet 1995).

Análisis de densidad de color de fibras positivas para AChE en ABL

CTR	Igs	EXNBM
198+1-09.75	196.304+/-5.67	155+1-8.11

Tabla 3. Como podemos observar la densidad en amígdala es menor en los individuos lesionados excitotóxicamente en el NBM.

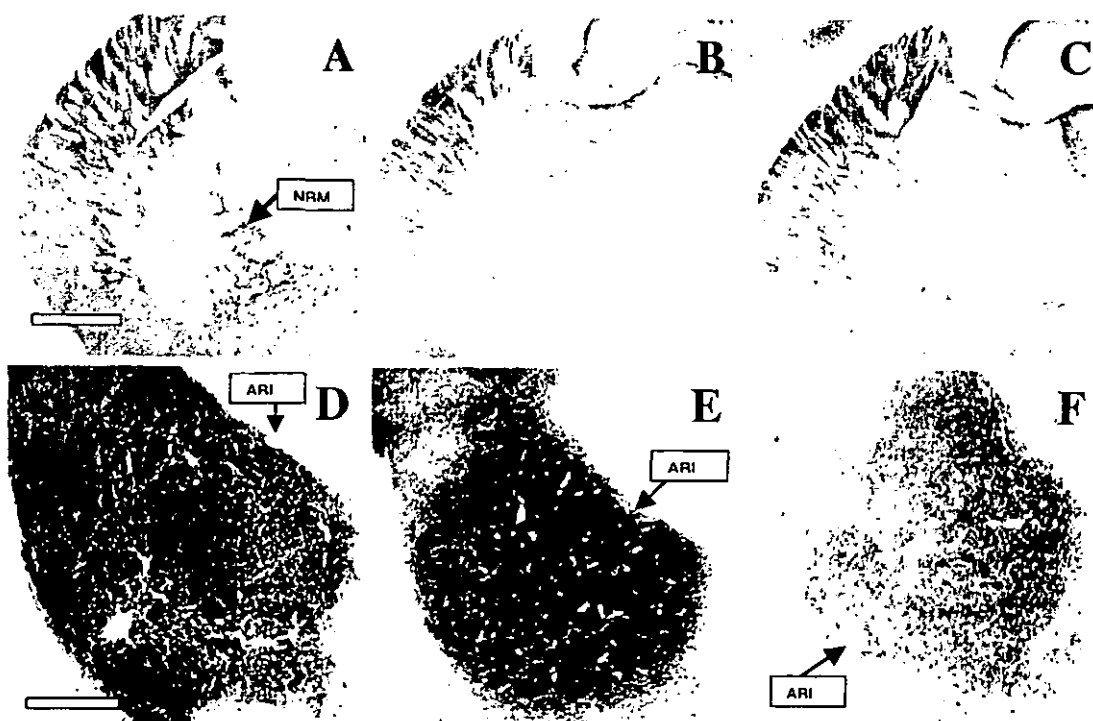


Figura 7. En A, B y C observamos un ensayo de AChE en el NBM en individuos control, IgS y exNBM; las correspondientes fotografías de la amígdala se observan en la misma secuencia inferior (D, E y F). Mientras que la IgS no dañó la vía NBM-Amg (dada la tinción en amígdala), la lesión excitotóxica sí daña esta vía, dado que la Amg resulta negativa para esta tinción. La barra representa 200 μ m.

Resumen de resultados

A partir de la evidencia previa y de los resultados obtenidos en este trabajo podemos elaborar la siguiente tabla con el fin de visualizar mejor las características del sistema.

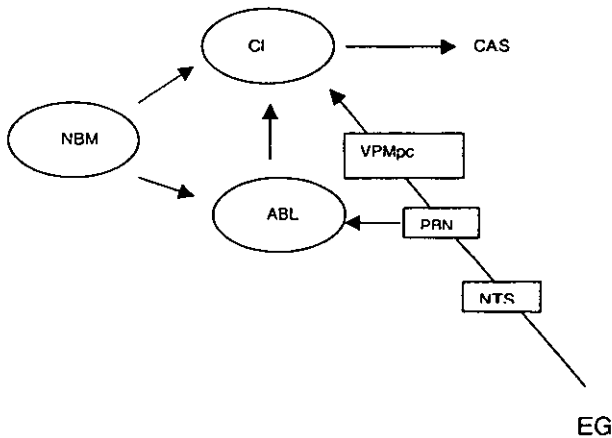
Tabla 4. Efectos de los distintos tipos de lesiones en el CAS

Lugar de Lesión	Tipo de lesión (Selec.Ach)	Vías Dañadas	Aprendizaje
Corteza Insular (NMDA)	Generalizada		No
NBM (NMDA)	Generalizada	NBM-CI; NBM-ABL	No
NBM (IgS)	Específica	NBM-CI	Sí
Amígdala (NMDA)	Generalizada	Amg-CI	Sí
NBM (IgS)-Amg(NMDA)	Específica/ Generalizada	NBM-CI; NBM-Amg-CI	No

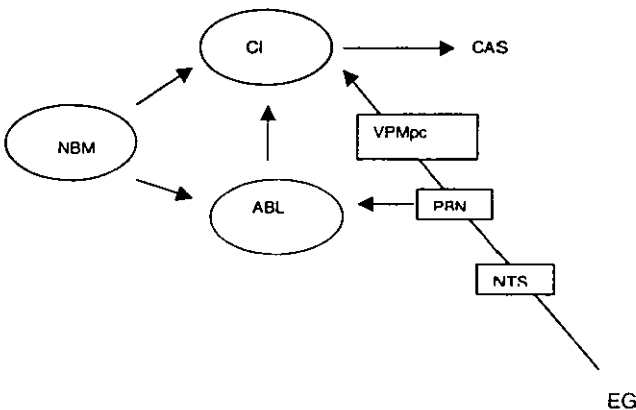
Como podemos observar la corteza insular parece ser el punto de convergencia de las dos vías NBM-CI y NBM-Amg-CI. Si la vía colinérgica que parte del NBM a la CI fuera crucial para el aprendizaje, la lesión específica de esta vía debería causar deterioros en el CAS; dado que estos no se observan, descartamos el hecho de que esta vía sea indispensable para poder consumir el CAS. Al parece la ABL al igual que en otros reportes, tampoco tiene efectos sobre el CAS; por lo que al parecer el relevo amigdalino es también prescindible en la consumación del CAS. El hecho de que las lesiones generalizadas en el NBM con NMDA cause deterioros en el aprendizaje parece ser atribuible a que daña simultáneamente las dos vías ascendentes. Ello es verificado por el hecho de que las ratas que fueron lesionadas simultáneamente en el NBM de forma específica para la vía colinérgica

(IgS) y en forma generalizada para la Amígdala (NMDA), sean las únicas que repiten el patrón de deterioro observado en las lesiones excitotóxicas del NBM. La conclusión por lo tanto es que la información necesaria para el CAS es llevada por las dos vías y es procesada de forma redundante a través de las vías NBM-CI y NBM-Amg-CI, sin que ninguna de ellas sea estrictamente imprescindible en la consumación del CAS. En la figura 8 se esquematiza el modelo que proponemos:

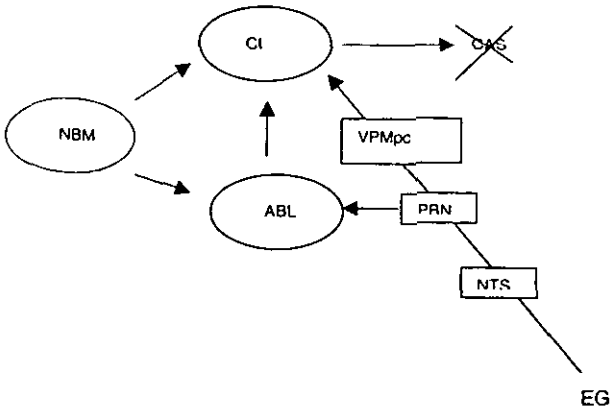
Fig. 8



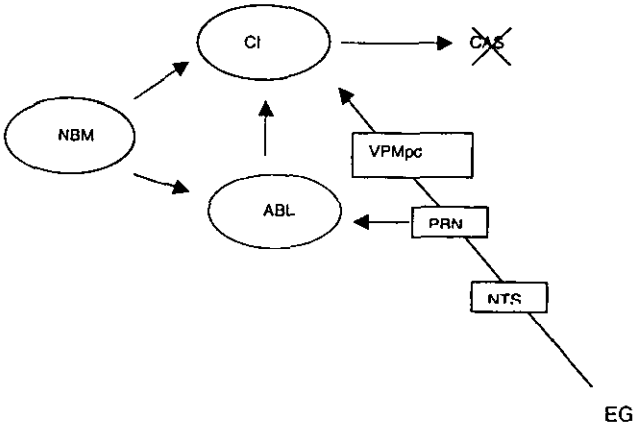
A) Durante la lesión específica para la vía colinérgica del NBM a la CI, no se observan efectos sobre el Cas, pues la información es conducida por medio de la amígdala (Estímulo gustativo:EG).



B) Durante la lesión excitotóxica con NMDA en la ABL no se observan efectos sobre el Cas, pues la información es conducida por medio de la vía colinérgica NBM-CI



C) Durante la lesión excitotóxica en el NBM realizada con NMDA se afectan las dos vías NBM-ABL y NBM-CI, por lo que el CAS se ve afectado.



D) Durante la lesión simultánea de la vía colinérgica del NBM a la CI y de la ABL, se anulan ambas vías de procesamiento, por lo que el CAS no puede efectuarse.

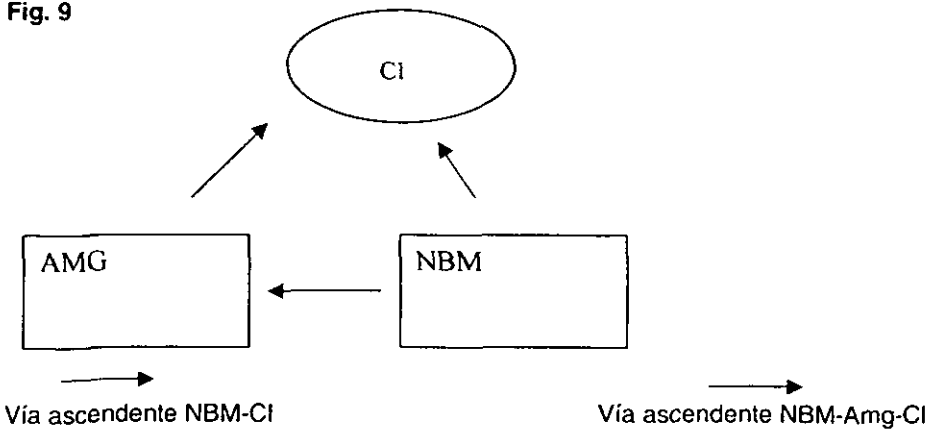
Discusión.

El Cerebro Anterior Basal —en particular el NBM— es sin lugar a duda una de las estructuras que más influyen en la asociación de varias tareas de aprendizaje.

Paralelamente, se sabe que la corteza insular es una estructura involucrada en el proceso de asociación del CAS, pues existe evidencia de que la lesión excitotóxica impide la adquisición de este aprendizaje. En efecto, tanto en la corteza insular como en la amígdala se han identificado procesos celulares fuertemente relacionados con el CAS, principalmente con la percepción del estímulo novedoso; entre estos procesos están: la activación de la PKC, la transcripción génica mediada por cAMP, y la fosforilación de receptores dependientes de NMDA, esto sugiere que ambas estructuras son importantes en la expresión del CAS.

De tal forma que nos encontramos con un sistema de tres componentes, cuyas interacciones con respecto al CAS no han sido suficientemente exploradas, pero que en principio plantea un escenario en que la CI tendría el papel de integrar y asociar la información proveniente de las vías ascendentes NBM-AMG-CI y NBM-CI, como se muestra en la figura 9.

Fig. 9



Tradicionalmente se ha pensado que el hecho de que las lesiones excitotóxicas en el NBM produzcan deterioros en el aprendizaje se debe al daño en el sistema colinérgico que parte de este sistema e inerva a la CI. Sin embargo, partiendo del hecho de que nosotros corroboramos que una destrucción generalizada del NBM a partir de lesiones excitotóxicas (NMDA) produce deterioros graves en el CAS, y que dichos efectos no logran reproducirse cuando se efectúan lesiones específicas para la vía colinérgica que conecta el NBM y la CI (IgS); sugerimos, que esta vía podría no ser tan relevante para la consumación del CAS. Ello, concuerda con la literatura reciente, en que se comparan los efectos de otras excitotoxinas con la inmunotoxina. A saber, en realidad no hay ni un solo paradigma de aprendizaje —probado hasta ahora— que se vea afectado por lesiones específicas del sistema colinérgico del NBM. Asimismo, recordemos que las excitotoxinas que mostraban una mayor selectividad para esta vía (AMPA, Quis) no logran efectos parecidos a otras excitotoxinas de carácter más generalizado (IBO, NMDA).

Ante esta disyuntiva surgen dos posibilidades: el deterioro observado en las lesiones excitotóxicas más que deberse al daño en la vía colinérgica se debe al daño en otras poblaciones celulares no colinérgicas, entre ellas células gabaérgicas y del palido ventral. Y alternativamente este daño podría atribuirse al daño en las células que parten del NBM e innervan la ABL.

Como sabemos existe evidencia contradictoria sobre el papel que juega la ABL en el aprendizaje. Sin embargo Boegman y su grupo (1992 a, 1994) logran establecer que precisamente aquellas excitotóxicas que inyectadas en el NBM afectan preferentemente la vía NBM-Amg (IBO, NMDA, Ka), son las que producen mas

deterioros a nivel de aprendizaje. Por lo tanto la exploración de dicha vía alterna fue una de las prioridades del presente trabajo. Sin embargo, en este trabajo observamos que las lesiones excitotóxicas en la Amg tampoco afectan al CAS. La conclusión que estos sugiere es que esta vía tampoco es crítica para la consumación de este aprendizaje.

Así pues, nosotros hallamos que ninguna de las dos vías exploradas pueden por sí mismas dar cuenta del CAS. La resolución de este problema emerge del hecho de que los individuos con lesiones dobles, es decir tanto específicas para la vía colinérgica NBM-CI, como generalizada para la vía NBM- Amg-CI, tienen una disrupción del CAS aún más pronunciada que la observada con las lesiones excitotóxicas en el NBM. La conclusión es inmediata: se trata de un sistema redundante en el que ninguna de las vías citadas es indispensable para la consumación del CAS, sino que ambas son equivalentes por lo menos a nivel funcional.

Sin embargo, no podemos excluir el hecho de que un pequeño vestigio de actividad colinérgica, aun existente después de la lesión con IgS en el NBM sea suficiente para que pueda darse el aprendizaje. De medular importancia se vuelve el tratar de esclarecer cual es papel que juega la conexión colinérgica entre la amígdala y el NBM. Así como también precisar el papel de la Ach que se libera durante el CAS por las neuronas colinérgicas basales en la CI. Dado que este pico de acetilcolina no es imprescindible para el aprendizaje es probable que tenga otras funciones. De forma relevante se le ha involucrado en la identificación de un estímulo novedoso, lo que conforma una hipótesis bastante probable. Todos estos

son aspectos que nos ayudarían a precisar la función de las dos vías que inervan la corteza, y que necesitan una exploración más detallada.

Por otro lado en lo que respecta a la hipótesis colinérgica de la memoria, en principio este trabajo propone una revaloración del fenómeno. Para ser concretos recordemos uno de los postulados de dicha hipótesis enunciado por Bartus:

La disrupción artificial de las funciones colinérgicas centrales en sujetos jóvenes deben inducir deterioros conductuales que mimeticen las pérdidas cognitivas que se encuentran en individuos viejos.

Por lo menos en este caso, este postulado parece no cumplirse, ya que la disrupción específica de la vía colinérgica NBM-CI en individuos jóvenes no produjo daños en el aprendizaje. Sin embargo, en general aún no conocemos la actividad de la vía colinérgica del NBM a la amígdala. Ni tampoco el efecto de un posible vestigio de acetilcolina proveniente del NBM en la corteza. Por lo que en realidad no podemos descartar el hecho de que el papel de la acetilcolina en este aprendizaje sea vital para su consumación, si bien es cierto que posiblemente este mas involucrada en otros fenómenos, como la identificación de sabores novedosos, mas que en el aprendizaje *per se*.

Conclusiones

Las conclusiones de los experimentos se enumeran a continuación:

- La lesión excitotóxica en el NBM impide el aprendizaje del CAS.
- La lesión inmunotóxica en el NBM no impide el aprendizaje del CAS.
- La lesión excitotóxica en la amígdala no impide el aprendizaje del CAS.
- La lesión simultánea del NBM inmunotóxicamente y de la amígdala excitotóxicamente impiden el aprendizaje del CAS

A partir de lo anterior se puede inferir lo siguiente:

- Ni la vía colinérgica NBM-CI, ni la vía NBM-AMG-CI son indispensables para el aprendizaje del CAS.
- Ambas vías son redundantes en la transmisión de la información que permite el establecimiento del CAS

Referencias.

1. Aggleton, J.P., Petrides, M. y Iversen, S. (1981), Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversion learning by rats, *Physiology and Behavior*, 27, 397-400.
2. Alheid, G.F. & Heimer, L. (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of *substantia innominata*. *Neuroscience* 27,1-39.
3. Ammassari-Teule, Amoroso, D., Forloni, G.L., Rossi-Arnaud, C., Consolo S. (1993), Mechanical deafferentation of basal forebrain-cortical pathways and neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: comparative effect on spatial learning and cortical acetylcholine release in vivo. *Behavioral Brain Research*, 54,145,152.
4. Bartus, R.T., Reginald, L.D., Beer B., y Lippa A. (1982). The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science*, 217, 408-417.
5. Baxter, M., Bucci, D., Gorman, L., Wiley, R., Gallagher, M. (1995). Selective Immunotoxic Lesions of Basal Forebrain Cholinergic Cells: Effects on Learning and Memory in Rats, *Behavioral Neuroscience*, 109, 4, 714-722.
6. Beninger, R., Kuhnemann, S., Ingles, J., Jhamandas, K., Boegman, R., (1994). Mnemonic deficits in the double Y-maze are related to the effects of nucleus basalis injections of ibotenic and quisqualic acid on choline acetyltransferase in the rat amygdala, *Brain Research Bulletin*, 33, 2: 147-152.
7. Berger-Sweeney, J., Heckers, S., Mesulam, M., Wiley, R., Lappi, D., Sharma, M. (1994). Differential Effects on Spatial Navigation of immunotoxin-induced Cholinergic Lesions of the Medial Septal Area and nucleus basalis magnocellularis. *Journal of Neuroscience*, 14 (7), 4507-4519.
8. Berman, Shoshi Hazvi, Victor Neduva, y Yadin Dudai, (2000) *Journal of Neuroscience*, 20(18):7017-7023
9. Bermúdez-Rattoni, F. y McGaugh, J.L., (1991a), Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion, *Brain Research*, 549, 165-170.
10. Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. Y McGaugh, J.L., (1991b). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 5379-5382.

11. Bielavska, E. y Bures, J., Universality of parabrachialmediation of conditioned taste aversion, (1994), *Behavioral Brain Research*, 60, 35-42.
12. Bigl, V., Woolf, N.J. & Butcher, L.L. (1982) Cholinergic projection from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: A combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase Analysis. *Brain Research Bulletin* 8:727-749.
13. Boegman, R.J., Cockhill, J., Jhamandas, K., y Beninger, R. (1992), excitotoxic lesions of rat basal forebrain: differential effects on choline acetyltransferase in the cortex and amygdala, *Neuroscience*, 51, 1:129-135.
14. Book a., Wiley, R., y Schweitzer, J.B. (1992). Specificity of 192 IgG-saporin for NGF receptor positive cholinergic basal forebrain neuron in the rat. *Brain Research*, 590, 350-355.
15. Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. Y Yamamoto, T., *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*, Oxford University Press, Oxford 1997.
16. Candy, J.M., Perry, R.H., Thompson, J.E. & Oakley, A.E. (1985). Neuropeptide Localization in the Substancia Innominata and Adjacent Regions of the Human Brain. *Journal of Anatomy*, 140,309-327.
17. Connor, D.J. (1991). Behavioral impairments after lesions of the nucleus basalis by ibotanic acid and quisqualic acid. *Brain Research* 555:84-90.
18. Constantinidis, J., (1978). En: *Alzheimer's disease: Senile Dementia and Related Disorders*. Katzman, R., Terry, R., Bick, L., Ed. Raven, p 15.
19. Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M. R., (1983), *Alzheimer's Disease: A disorder of cortical cholinergic innervation*. *Science* 219, 1184-1190.
20. Coyle, J. T., Schawrcz, R. (1989), *The use of excitatory amino acids as selective neurotoxins*. *Methods in chemical Neuroanatomy*. New York: elsevier Science Publisher, Vol I, 508-527.
21. Chambers, K., (1990), *A neural model for conditioned taste aversion*, *Annual Review of Neuroscience*, 13, 373-85.
22. Dawbarn D., Allen, S y Smenenko F.M. (1988). Co-existence of choline acetyltransferase end nerve growth factor receptors in the basal forebrain. *Neuroscience Letters* 94, 138-164.
23. Dekker, J.A., Connor, D. y Thal, L., (1991), *The role of Cholinergic Projections from the Nucleus Basalis in Memory*, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 15:299-317.

24. Divac, I., (1976), Magnocellular nuclei of the dorsal forebrain project to neocortex, brainstem, and olfactory bulb. Review of some functional correlates, *Brain Research*, 93: 385-398.
25. Dornan, W.A., McCampbell, A., Tinkler, G., Hickman, L.J., Banon, A., decker, M. y Gunther, K. (1997), Comparison of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin, *Behavioral Brain Research* 86: 181-189.
26. Dubois, S.B., Mayo, W., Agid, Y., Le Moal, M., Simon, H., (1985), Profound disturbances of spontaneous and learned behaviors following lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat, *Brain Research*, 338: 249-258.
27. Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory*, Oxford University Press, 339 pp.
28. Dunn, L.T.; Everitt, B.J., (1988), Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using excitotoxin ibotenic acid, *Behavioral Neuroscience*, 102, 1:3-23.
29. Dunnett, S. (1985). Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats, *Psychopharmacology* 87: 357-363.
30. Dunnett, S.B., Wishaw, I.Q., Jones, G. y bunch, S. (1987), Behavioral, Biochemical and Histochemical Effects of Different Neurotoxic Amino Acids In
31. jected into Nucleus Basalis Magnocellularis of Rats., *Neuroscience*, 20, 653-669.
32. Dunnet, S. B., Barth, T.W., (1991), Animal models in dementia (with an emphasis on cortical cholinergic systems). En: Wilner, P., ed. *Animal models in psychopharmacology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 10-25.
33. Dunnet, S.B., Everitt, B.J., Robbins, T.W., (1991), The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions, *Trends in Neural Science*, 14, 11:494-501.
34. Everitt, B., Robbins, J., Evenden, J., Marston, H., Jones, G. y Sirkiä, T. (1987), The Effects of Excitotoxic Lesions of the Substantia Innominata, Ventral and Dorsal *Globus pallidus* on the Acquisition and Retention of a conditional Visual Discrimination: Implications for Cholinergic Hypothesis of Learning and Memory. *Neuroscience*, 22, 2: 441-469.

35. Evenden, J.L., Marston, H.M., Jones, G.H., Giardidni, V.m Lanerd, I., Everitt, B.J., Robins, T.W. (1989), Effects of excitotoxic lesions of the *substantia innominata*, ventral and dorsal pallidus on visual discrimination acquisition, performance and reversal in the rat. Behavioral Brain Research 32: 129-149.
36. Everitt, B.J. Robins, T.W. Evenden, J.L., Marston, H.M., Jones, G.H., Sirkkia, T. (1987), The effects of excitotoxic lesions of the *substantia innominata*, ventral and dorsal pallidus on the acquisition and retention of a conditioned visual discrimination: implications for cholinergic hypotesis of learning and memory. Neuroscience, 22:441-469.
37. Everitt, J. Y Trevor, W.R. (1997) Central Cholinergic Systems and Cognition. Annual Review of Psychology 48: 649-684.
38. Fibiger, H.C. (1982). The Organization and Some Projections of Cholinergic Neurons of the Mammalian Forebrain. Brain Research Reviews, 4, 327-388.
39. Fibiger, H.C. (1991), Cholinergic mechanism in learning, memory an dementia: review of recent evidence, Trends in Neural Science, 6, 220-223.
40. Fitzgerald, R.E.; Burton, M.J., (1983), Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by ubdercutting temporal cortex, Physiology & Behavior, 30: 203-206.
41. Galaverna, O.G., Seeley, R.J., berridge, K.C., Grill, H.J., Epstein, A.N. y Schulkín, J., (1993). Lesions of the central nucleus of amygdala. I. Effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. Behavioral Brain Research, 59: 11-17.
42. Gallagher, M. y Holland, P.; (1994); The amygdala complex: Multiple roles in associative learning and attention, Proccedings of the National Academy of Sciences, 91: 11771-11776.
43. Gallo, M., Marquez, S.L., Ballesteros M.A., Maldonado A., (1999), Functional blockade of the parabrachial area by tetratoxin disrupts the acqisition of conditioned taste aversion induced by motion-sickness in rats, Neuroscience letters 265, 57-60.
44. García J., Kimmeldorf, D.F. and Koelling, R.A., Conditionates taste aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation, (1955), SCIENCE, 5, 121-122.
45. García, J. y Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoiding learning. Psychonomic Science 4, 123-124.

46. García , J., Lasiter, P. , Bermúdez-Rattoni F.,y Deems A.,(1985) A general theory of aversión learning, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443, 8-21.
47. Gallagher, M., Holland, P.,(1994). The Amygdala Complex: Multiple Roles in Associative Learning and Attention, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 11771-11776.
48. Gallo,M.,marquez, S.L.,Ballesteros, M.A., Maldonado,A., (1999). Funtional blockade of the parabrachial area by tetradoxin disrupts the acquisition of conditioned taste aversión induced by motion-sickness in rats, *Neuroscience Letters*, 265: 57-60.
49. Gorry , J.D. (1963). Studies oh the Comparative Anatomy of the Ganglion Basale of Meynert. *Acta Anatomica*, 55, 51-104.
50. Gutiérrez, H; Gutiérrez, R; Silva-Gandarias, R, Estrada, J; Miranda, M; Bermúdez- Rattoni, F. (1999) Differential effects of 192 IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversión memory formation, *Brain Research* 834: 136-141.
51. Hallanger, A., Levey, A., Lee, H., Rye, D. y Wainer, B., (1987), The origins of Cholinergic and Other Subcortical Afferents to the Thalamus in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology* 262: 105-124.
52. Haring, J. Y Wang, R. (1986). The identification of some sources of afferent input to the rat Nucleus Basalis Magnocelularis by retrograde transport of horseradish peroxidase, *Braion Research*, 366, 152-158.
53. Heckers, S. y Mesulam, M., (1994). Two Types of Cholinergic Projections to the Rat Amygdala. 60, 2, 383-397.
54. Hepler, D.J., Wenk, G.L., Cribbs, B.L., Olton, D.S., y Coyle, J.T., (1985). Memory impairments following basal forebrain lesions, *Brain Research*, 346: 8-14.
55. Hepler, D.J., Olton , D.S., .. Wenk, G.L., y Coyle, J.T , (1985b) lesions in nucleus basalis magnocelularis and medial septal area of rats produce qualitative similar memory impairments, *The Journal of neuroscience*, 5, 4: 866-873.
56. Ingles, J., Beninger, R., Jhamandas, K., Boegman, R., (1993), Scopolamineinjected into the rat amygdala impairs working memory in the double Y-maze. *Brain research Bulletin*
57. Kiefer S., (1985), Neural mediations of conditioned food aversions, *Annal of the New York Academy of Siencesa* 443, 100-9.

58. Kolb, B., Nonneman y Abplanalp, P., (1977), Studies on the neural mechanism of bait-shyness in rats, *Bulletin of Psychonomic Society*, 10, 389-392. En: Aggleton, J.P., Petrides, M. y Iversen, S. (1981), Differential effects of Amygdaloid Lesions on Conditioned Taste Aversion Learning by Rats, *Physiology and Behavior*, 27, 397-400.
59. Lamprecht, R.; Hazvi, S. y Dudai, Y.; (1997)., cAMP Response element-binding protein in the amígdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory, *The Journal of Neuroscience*, 17, 21: 8443-8450.
60. Lasiter, P., Glanzman, D. Y Mensah P., (1982), Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat, *Brain Research*, 234, 111-121.
61. Lasiter, P.S., Glanzman, D.L., (1985), Cortical substrates of taste aversión learning: involvement of dorsolateral amygdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversión learning, *Behavioral Neuroscience*, 99, 2: 256-276.
62. Lehmann, J., Nagy, J.I., Atmadja, S. & Fibiger, H.C. (1980). The Nucleus basalis magnocellularis: The Origin of a Cholinergic Projection to the Neocortex of the Rat. *Neuroscience*, 5, 1161-1174.
63. Lo Conte, G., Bartolini, L., Casamenti, F., Marconioni-Pepeu, I., Pepeu, G. (1982), Lesion of cholinergic forebrain nuclei: Changes in avoidance Behavior and scopolamine actions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 17: 933-937.
64. López-García, JC; Ruiz, JF; Escobar, LM; Rattoni FB, Tapia, R (1993), Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversión and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 45: 147-152.
65. Mallet, P., Beninger, R., Flesher, S.N., Jhamandas, K. y boegman, R. (1995). Nucleus basalis lesions: implication of basoamygdaloid cholinergic pathways in memory, *Brain research bulletin*, 36, 1: 51-56.
66. Mayo, W., Kharouby, M., leMoal, M., Simon, H., (1988). Memory disturbances following ibotenic acid injections in the nucleus basalis magnocellularis of the rat, *Brain Research*, 455: 213-222.
67. McGaugh, J.L.; Introioni-Collison, I.B.; Nagahara, A.H.; Cahill, L.; Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 14:441-463
68. McGaughy, J., Kaiser, T., Sarter, M., (1995), Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: Selectivity of the

- behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fibers density. *Behavioral Neuroscience* 110: 247-265.
69. McGurk, S.R., Hartgraves, S.L., Kelly, P.H., Gordon, M.N., y Butcher, L.L., (1987) Is ethylcholine mustard aziridium ion a specific cholinergic neurotoxin?, *Neuroscience*, 22: 215-224.
70. Miyamoto, M., Shintani, M., Nagaoka, A. y Nagawa, Y. (1985), Lesioning of the Basal Forebrain Leads to Memory Impairments in Passive and Active Avoidance Tasks, *Brain Research*, 328: 97-104.
71. Morris, R., Fray, S, Kasambira, T. y Petrides, M., (1999). Ibotenic acid lesions of the basolateral, but not central, amygdala interfere with conditioned taste aversion: evidence from a combined behavioral and anatomical trac-tracing investigation, *Behavioral Neuroscience*, 113, 2: 291-302.
72. Muir, J. L., (1997). Acetylcholine, Aging and Alzheimer's Disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56, 4, 687-696.
73. Murray, L. y Fibiger, H.C., (1985), Learning and memory deficits after lesions of the nucleus basalis magnocellularis. Reversal by physostigmine, *Neuroscience*, 14, 4: 1025-1032.
74. Nabeshima, T. (1993). Behavioral aspects of cholinergic transmission: role of basal cholinergic system in learning and memory, *Progress in Brain research*, 98, 405-411.
75. Nachman, M. y Ashe, J., (1974), Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversion, and sodium appetite in rats, *Journal of comparative physiology and psychology*, 83: 240-247.
76. Nagai, T., Kimura, H., Maeda, T., McGeer, P., Peng, F. y McGeer, E., (1982), Cholinergic Projections from Basal Forebrain of Rat to the Amígdala, *The Journal of Neuroscience*, 2, 4: 513-520.
77. Nilsson, O., Leanza G., Rosenblad, C., Lappi, D.A., Wiley, R. y Björklund (1992). Spatial learning impairments in rats with selective immunolesion of the forebrain cholinergic system. *Neuroreport* 3, 1005-1008.
78. Page, K. J., Everitt, B.J., Robins, T.W., Marston, H.M., y Wilkinson, L.S., (1991). Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA and ibotenic acid-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss. *Neuroscience* 43, 2/3, 457-472.
79. Paxinos G, Watson C (1986) In: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic.

80. Perry, E., Tomlinson, G., Blessed, R., Perry, A., Bergman, K.; Gibson, P.H., (1978), Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, 2: 1457-1549.
81. Richardson, S.J. (1973). The amygdala: historical and functional analysis. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 33:623-648 Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. Y Yamamoto, T., *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*, Oxford University Press, Oxford 1988.
82. Riekkinen, M, Riekkinen, P., Riekkinen, P., Jr. Comparasion of quisqualic and ibotenic acid nucleus basalis magnocellularis lesions on water-maze and passive avoidance performance. *Brain Research Bulletin*, 27: 119-123.
83. Roldan, G y Bures, J. (1994). Tetrodotoxin blockade overlapping with poison impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats, *Behavioral Brain Research*, 65:213-219.
84. Rye D.B., Wainer , B. H., Mesulam , M.M., Mufson, E.J. & Saper, C.B. (1984). Cortical Projections Arising from the Basal Forebrain: A Study of Cholinergic and Noncholinergic Components Employing Combined Retrograde Tracing and Immunohistochemical Localization of Choline Acetyltransferase. *Neuroscience*, 13, 627-643.
85. Shute , C.C.D. y Lewis , P.R., the ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. En: Wenk, G.L. (1997). *The Nucleus Basalis Magnocellularis Cholinergic System: One Hundred Years of Progress. Neurobiology of Learning and Memory* 67, 85-95.
86. Swanson, L.W. y Petrovich, G.D. (1998), What is the amygdala?, *Trends in Neurosciences [Trends Neurosci.]*, vol. 21, no. 8, pp. 323-330.
87. Sofroniew, W.V., Eckenstein, F., Thoenen, H. & Cuello, A.C. (1982). Topography of Choline Acetyltransferase-containing Neurons in the Forebrain of the Rat. *Neuroscience Letters*, 33, 7-12.
88. Torres, E., Perry, T., Blokland A. , Wiljinson L.S., Wiley, R., Lappi, D., Dunnett (1994), Behavioral, Histochemical and Biochemical Consequences of Selective Immunolesions in Discrete Regions of the Basal Forebrain Regions. *Neuroscience*, 63, 1, 96-122.
89. Waite, J., Chen, A., Wardlaw, M. y Thal, (1994), Behavioral and Biochemical consequences of the medial septum/diagonal band and nucleus basalis magnocellularis in the rat when ibotenic acid, quisqualic acid and AMPA are used, *Experimental Neurology*,

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

90. Wenk H., Bigl V. & Meyer, U. (1980). Cholinergic Projections from Magnocellular Nuclei of the Basal Forebrain to Cortical Areas in Rats. *Brain Research Review*, 2, 295-316.
91. Wenk GL, Stoehr JD, Quintana G, Mobley S, Wiley RG (1994) Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats. *J Neurosci* 14:5986-5995
92. Wenk, G.L. (1997). The Nucleus Basalis Magnocellularis Cholinergic System: One Hundred Years of Progress. *Neurobiology of Learning and Memory* 67, 85-95.
93. Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T. & DeLong, M. (1981). Alzheimer Disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of Neurology*, 10: 122-126
94. Wiley, R., (1992), Neural lesioning with ribosome-inactivating proteins: suicide transport and immunolesioning, *Trends in Neural Science*, 15, 8: 285-290.
95. Yamamoto, T. & Fujimoto, Y. (1991). Brain Mechanisms of taste aversion learning in rat, *Brain research Bulletin*, 27: 403-406.
96. Yamamoto T. (1993) Neu: I mechanism of taste aversion learning, *Neuroscience Research*, 16: 181-185-
97. Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yashosima, Y. & Sakai, N., (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rats. *Behavioral Brain Research*, 65:123-127.
98. Yamamoto, T., Fujimoto, Y., Shimura, T., y Sakai, N. (1995). Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neuroscience research*, 22:31-49.
99. Yasoshima, Y.; Yamamoto, T., (1997), Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area, *Neuroreport*, 8: 1363-1367.