



03040

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTOS DEL KINDLING EN LA AMIGDALA Y CORTEZA INSULAR
SOBRE EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A :
LIC. MARIA LUCI MONICA LOPEZ VELAZQUEZ

TUTORES: DR. RAUL GERARDO PAREDES GUERRERO
DR. JORGE LARRIVA SAHD

Campus Juriquilla, Querétaro Marzo de 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mi mamá

***“Las flores brotan cuando ella pasa,
y se abren cuando ella las mira;
y todos los pájaros cantan cuando ella se acerca”***

**JRR Tolkien
El Silmarillion**

**Para mis amigas y amigos,
que me apoyaron en los momentos difíciles,
mil gracias.**

“-¿Podrías decirme, por favor, qué camino he de tomar para salir de aquí?”

-Depende mucho del punto adonde quieras ir- contestó el Gato.

-Me da casi igual dónde-dijo Alicia.

-Entonces no importa qué camino sigas –dijo el Gato.

-...siempre que llegue a alguna parte –añadió Alicia a modo de explicación.

-Ah!, seguro que lo consigues – dijo el Gato-, si andas lo suficiente.”

Lewis Carroll.

Alicia en el país de las maravillas.

“Tan grande era su pena, mientras la Música se desplegaba, que su canto se convirtió en lamento mucho antes del fin, y los sonidos de duelo se confundieron con los Temas del Mundo antes que éste empezase....y quienes la escuchan aprenden a tener piedad, y firmeza en la esperanza...claman por ella, pues fortalece los espíritus y convierte el dolor en sabiduría.”

JRR Tolkien.

El Silmarillion

AI CCH SUR
A LA FACULTAD DE PSICOLOGÍA
A LA UNAM

Ubi dubium ibi libertas:
Donde hay duda hay libertad
Proverbio Latino

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Raúl Paredes Guerrero por su apoyo académico para la realización de mi Tesis en el laboratorio de Conducta Sexual y Plasticidad del Instituto de Neurobiología.

Al comité Tutoral, por sus comentarios hechos a la presente tesis, a lo largo de la Maestría: Dra. Thalía Harmony Baillet, Dra. Esther Talavera Cuevas y Dr. Jorge Larriva Sahd.

Al Jurado, por sus observaciones realizadas a la presente tesis: Dr. León Cintra McGlone, Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos y Dr. Gabriel Roldán-Roldán.

A las autoridades del Instituto de Neurobiología por las facilidades que se me otorgaron para la realización de la Maestría.

A Leonor Casanova por su gran apoyo administrativo.

A Lourdes Lara por toda su ayuda y comprensión.

Al personal del Bioterio del Instituto de Neurobiología por el cuidado y mantenimiento de los animales.

Al personal de la Biblioteca por todas las facilidades que me dieron para la recopilación de información.

A todos mis compañeros del Laboratorio: Patricia, porque durante toda la maestría me dio su amistad y fue un gran apoyo, muchas gracias por tus consejos y por todo (aunque no la debería poner aquí, porque en su Tesis ni se acordó de mi). Wendy, porque aunque parece retraída, es muy buena amiga.

Arturo, al inicio todo fue muy difícil, porque nos peleábamos a cada rato y todo porque los dos somos muy necios, pero cambiaron las cosas porque compartimos nuestras convicciones utópicas. José Carmen, porque me escuchó y brindó su amistad. Sol, aunque no es del lab. pero como si lo fuera, gracias por darme tu amistad y por reírte de la forma en como lo haces (es contagiosa tu sonrisa). Claudia, también no es del lab, pero como si lo fuera, gracias por apoyarme cuando lo necesité.

A Francisco, por su ayuda técnica y por ofrecerme su amistad (parece que siempre está enojado, pero es alguien noble).

A Doña Cipri, por su ayuda en el laboratorio y por preocuparse de que me alimente.

Al Dr. Alfonso Salgado, por su apoyo académico durante toda mi formación de la Licenciatura.

A mi amigas: Leticia, por acompañarme y apoyarme en los momentos más difíciles, mil gracias por no dejarme sola y caer (aunque le falta un tornillo, pero es una excelente amiga, bueno o malo siempre tiene algo que decirte, tiene demasiada verborrea). Mónica, aunque un poco despistada, pero es muy noble, siempre dispuesta a escucharte y darte un buen consejo, gracias por darme tu amistad (ella solo tiene flojo el tornillo, a veces hay que ajustarlo). Guadalupe, por compartir nuestras convicciones revolucionarias y por escucharme cuando algo me afligía (también le falta un tornillo, pero es bien chistosa, siempre me hace reír). Montserrat, por ser mi amiga incondicional, porque siempre estuvo cuando la necesite, porque es un ser humano excepcional, muy noble, gracias por todas las cosas maravillosas que me has dado. Olga, creo que te debía un agradecimiento, pero ahora lo hago, porque fuiste una de mis grandes amigas y profesoras en la Fac., un gran apoyo académico, emocional y obvio porque compartimos las mismas convicciones y las vivimos en esos años 1999-2000.

Lizzette, porque protestas cuando no estás de acuerdo, por ofrecer tu amistad y nobleza, eres una persona muy valiosa. Vicky, por su nobleza y preocuparse por mi, aunque parece hormiguita, siempre trabaje y trabaje. Nancy, a veces como que anda en su mundo, pero es una buena amiga y persona. Reflejas una gran fortaleza. Verónica, por su comprensión, paciencia y por compartir nuestras convicciones, aunque parece que siempre vive en su mundo, como que a veces se le olvida que hay entes que la rodean.

Al Sr. García Cors, porque sin él no hubiera podido continuar con la Maestría, gracias por el gran apoyo.

A la Sra. Rebeca y su familia por su apoyo en situaciones diversas.

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	4
CAPITULO 1: ANTECEDENTES	
1.1 ENCENDIMIENTO ELECTRICO (KINDLING).....	5
CARACTERÍSTICAS DEL KINDLING.....	5
FACTORES QUE INFLUYEN EN EL KINDLING.....	7
KINDLING Y PLASTICIDAD.....	7
MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL KINDLING.....	8
KINDLING EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	10
1.2 CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES (CAS).....	11
CARACTERÍSTICAS DEL CAS.....	11
NEUROANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL CAS.....	12
CAPITULO 2.	
2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.....	17
2.2 OBJETIVO.....	18
2.2 HIPOTESIS.....	18
CAPITULO 3. METODO	18
3.1 DISEÑO.....	19
3.2 PROCEDIMIENTO.....	19
CAPITULO 4. RESULTADOS	23
CAPITULO 5. DISCUSION	38
CAPITULO 6. CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

RESUMEN

El kindling es un modelo que consiste en estímulos eléctricos breves y de baja intensidad aplicados en ciertas regiones cerebrales que eventualmente desarrollan crisis generalizadas y producen cambios conductuales y neuronales a largo plazo. En trabajos anteriores mostramos que el kindling induce la copulación en ratas macho no copuladoras y facilita, al igual que en el macho la conducta coital en las hembras. También demostramos que el kindling modifica el aprendizaje, utilizando como modelo el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), en donde se observó, que el kindling en la amígdala (AMG) y en la corteza insular (CI) facilita dicho aprendizaje. El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios plásticos (el crecimiento dendrítico) inducidos por el kindling en la amígdala y corteza insular y sus efectos sobre el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). Se usaron ratas macho de la cepa wistar, y se formaron los siguientes grupos: Control, ratas no implantadas y ratas implantadas en la AMG, CI y área preóptica media (APM), pero sin kindling que fueron sometidas al CAS. Ratas implantadas a las que se les produjo kindling en: CI, AMG, APM y otro sitio (OS: ratas con electrodos que quedaron fuera de la zona de estimulación deseada). Después de establecer el kindling los animales fueron privados de agua por 24 horas. Posteriormente, se les dio de tomar agua en dos sesiones de 10 minutos por 6 días. En el 7° día el agua fue reemplazada por una solución de sacarina (0.1%), 30 minutos más tarde a los animales se les inyectó cloruro de litio (7.5 ml/kg i.p, 0.4M) para inducir el malestar gastrointestinal. Se encontró que las ratas con kindling en la CI consumían menos sacarina con respecto a las ratas control. También las ratas con kindling en la CI consumieron menos sacarina que las ratas del grupo OS. En las ratas con kindling en la AMG el consumo de sacarina fue menor que las ratas control. Las ratas con kindling en la AMG consumieron menos sacarina con respecto al grupo OS. El consumo de sacarina de las ratas con kindling en el APM no fue diferente al grupo de ratas control. Las ratas con kindling en el APM, consumieron menos sacarina que las del grupo OS. Las ratas del grupo OS consumieron significativamente más sacarina que las ratas

del grupo control. En relación a cambios plásticos inducidos por el kindling, sólo se pudieron obtener resultados preliminares ya que únicamente se cuantificaron las neuronas estrelladas de la CI para cada uno de los grupos experimentales (con excepción del grupo OS). De la cuantificación de estas neuronas en la CI no se observó ninguna diferencia ni en la longitud, ni en el número de ramas dendríticas. En conclusión, el kindling tuvo un efecto sobre el CAS y además en las estructuras implicadas en este aprendizaje, aunque faltaría resolver si el kindling fortalece el aprendizaje o bloquea la extinción del CAS, ya que no es claro si el kindling está favoreciendo el mantenimiento de lo previamente aprendido o si está evitando que el sujeto reaprenda que la sacarina no es la que le produce el malestar gastrointestinal. De los cambios plásticos provocados por el kindling en el presente trabajo no podemos concluir algo de manera contundente. Lo que sugerimos, es aumentar la muestra para cuantificar un mayor número de neuronas, otra posibilidad es realizar una inmunohistoquímica para GAP-43 y sinaptofisina que se expresan durante los fenómenos de plasticidad.

INTRODUCCION

La sobrevivencia de los organismos depende de la capacidad de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales, y las mismas presiones de selección han obligado a los animales a modificar su comportamiento como resultado de la experiencia. Estas modificaciones están acompañadas de una serie de procesos que contribuyen a la formación de redes neuronales. Esta capacidad de cambio permite al cerebro responder a las presiones medioambientales, aprender y recordar información adquirida previamente (Spears y cols., 1995).

Dos modelos que pueden contribuir al estudio de la plasticidad neuronal y de las modificaciones conductuales relacionadas a ésta, son el kindling y el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). El kindling consiste en la aplicación de estímulos eléctricos, breves y de baja intensidad, en ciertas regiones cerebrales que eventualmente desencadenan crisis convulsivas generalizadas. Este procedimiento ha sido comúnmente usado como modelo de epilepsia debido a que algunas de sus características conductuales y electroencefalográficas semejan a este trastorno neuronal. Sin embargo, se ha propuesto al kindling como modelo de plasticidad ya que se han observado modificaciones neuronales a largo plazo durante este fenómeno: crecimiento neuronal ("sprouting neuronal"), potenciación a largo plazo, formación de nuevas conexiones, etc.

El CAS es un modelo de aprendizaje y memoria ideal para estudiar la plasticidad porque se conocen las estructuras cerebrales que subyacen a él y porque es metodológicamente sencillo de establecer, debido a que con sólo una presentación o apareamiento de los estímulos se produce el condicionamiento. Así, en el CAS el animal adquiere una aversión a un estímulo novedoso (el cual por sí solo no genera aversión: estímulo neutro), cuando es seguido por un estímulo aversivo (estímulo incondicionado).

De esta forma ambos modelos pueden dar información sobre los cambios neuronales asociados a la conducta. El presente trabajo tiene como finalidad evaluar los cambios plásticos inducidos por el kindling y sus efectos (el crecimiento dendrítico) sobre el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).

CAPITULO 1. ENCENDIMIENTO ELECTRICO (KINDLING)

1.1 Características del Kindling

Un descubrimiento por serendipitia realizado por Graham Goddard durante los 60's llevó a lo que conocemos como el modelo de kindling. Goddard como estudiante de Posgrado observó que algunas ratas que recibían estimulación eléctrica diaria en la amígdala durante 10 días consecutivos o más, eventualmente mostraban crisis epilépticas. Aunque Goddard no fue el primero en observar este tipo de crisis, sí fue el primero en reconocer que este fenómeno, denominado más tarde kindling, representaba un tipo de epilepsia secundaria. Este trabajo pionero y los siguientes realizados por Racine (1972) dieron las bases para el estudio del kindling.

La estimulación tipo kindling consiste en estímulos eléctricos breves y de baja intensidad que son aplicados en regiones restringidas del cerebro una a dos veces diariamente, mediante electrodos bipolares que permiten registrar la actividad electroencefalográfica (EEG) de dichas regiones. Inicialmente la estimulación provoca postdescargas (PD) focales, que consisten en espigas rítmicas de alta amplitud que varían en frecuencia y duración. Sin cambiar los parámetros iniciales, la estimulación repetida produce un aumento en la intensidad y duración de la PD, así como de las crisis conductuales: la duración e intensidad de la PD aumenta y su localización se generaliza a partir del foco original a las áreas con que se establecen sinapsis, asimismo se presentan alteraciones en la conducta motora que eventualmente culminan en convulsiones generalizadas. Cuando la estimulación eléctrica no llega a producir PD, el kindling no se desarrolla, siendo la causa de la crisis, la generalización de la PD y no la estimulación per se (Racine, 1972).

La PD está acompañada de manifestaciones conductuales que se desarrollan durante el kindling de la rata. Racine en 1972 realizó una clasificación de dichas etapas conductuales que en la actualidad se sigue utilizando:

FASE	CONDUCTA
0	Prekindling: aparición de postdescargas.
1	Clonos facial o movimientos masticatorios, cierre del ojo ipsilateral, inmovilidad
2	Fase 1 + cabeceo (nodding) o movimientos oscilatorios de la cabeza
3	Fase 2 + clonos unilaterales de los miembros anteriores
4	Fase 3 + levantamiento, la rata se yergue y se sostiene con los miembros posteriores.
5	Fase 4 + caídas. Crisis generalizadas con pérdida del control y postura.

En el kindling la estimulación eléctrica de baja intensidad, repetida, en diferentes regiones cerebrales conduce al desarrollo progresivo de manifestaciones electroencefalográficas epileptiformes que culminan en crisis generalizadas. Este fenómeno ha sido utilizado como modelo de epilepsia. La epileptogénesis del kindling se caracteriza por una serie de cambios electrofisiológicos y conductuales. Primero hay una aparición y un incremento en la duración de la postdescarga electroencefalográfica y ocurren cambios transinápticos no sólo reflejados por la aparición de crisis parciales que requieren de la activación de estructuras cerebrales distintas, sino por la aparición de espigas interictales (lo cual indica aumento de la epileptogenicidad). Eventualmente, varias estructuras se involucran en las crisis generalizadas y si el kindling pasa este punto, la epileptogenicidad en estructuras distantes aumenta, de forma que ocurren crisis espontáneas. Es sólo hasta este estadio que el animal "kindleado" podría ser considerado como epiléptico por los estándares clínicos. Sin embargo, tradicionalmente varios investigadores consideran el desarrollo de la fase 5 como punto final del kindling (Moshé y cols., 1991). En general se acepta que una rata está totalmente "kindleada" cuando la estimulación del foco es capaz

de producir una crisis motora que se caracteriza por clonus bilateral del miembro anterior con levantamiento y caída (fase 5, ver más adelante). Muchos protocolos de investigación consideran necesario inducir entre tres y cinco (incluso más) fases 5 para decir que el kindling está completo; aunque el criterio más bien depende del objetivo del estudio.

Factores que Influyen en el Kindling

El kindling parece ser una propiedad casi universal del sistema nervioso (SN) y ocurre en una gran variedad de especies, difiriendo en la complejidad del desarrollo de dicho fenómeno; por ejemplo se ha establecido en ranas, lagartos, ratón, rata, conejo, gato, monos y babuinos. El kindling se desencadena más rápidamente en la rata, seguida por el gato y mono. En general, el kindling se desarrolla más rápidamente conforme la escala filogenética desciende. Dentro del SN, las estructuras filogenéticamente nuevas parecen menos susceptibles de desarrollar el kindling que las estructuras más viejas. También existen diferencias sexuales, por ejemplo, las hembras muestran una mayor variabilidad día a día, esto correlaciona con el ciclo del estro. Aunque la duración promedio de la PD y la intensidad conductual de las crisis del kindling no difiere significativamente entre hembras y machos. Efectos circadianos también se han observado. La estimulación diaria a las 10 PM durante la fase activa del ciclo resulta en una progresión más rápida del kindling que la estimulación hecha a las 10 AM, durante la fase inactiva (revisado en Joy, 1985).

Kindling y Plasticidad

La utilización del kindling como modelo de plasticidad (no sólo de epilepsia) fue resultado de los trabajos realizados por Goddard y cols. (1969), Goddard y Douglas (1975). Estos estudios demostraron que para inducir el kindling en ciertas estructuras cerebrales se requería de un número determinado de estímulos y que una vez establecido el kindling, el número de estímulos para inducir nuevamente el kindling, en esas mismas estructuras cerebrales, era menor, a pesar de haber suspendido la estimulación durante 3 meses. Esto llevó a Goddard a suponer que las neuronas que han estado sometidas a una estimulación eléctrica de alguna forma han sufrido una modificación permanente, sugiriendo que el kindling puede

ser un modelo de plasticidad y no sólo para estudiar los fenómenos de epilepsia. Él vislumbró que el modelo podía servir para estudiar los mecanismos que subyacen al aprendizaje y memoria (Goddard y Douglas, 1975). El kindling establece un engrama en el cerebro, el estado "kindleado" es la manifestación de ese engrama (Morrel, F., 1991).

Otros estudios han descrito que el kindling está asociado con cambios plásticos en el sistema nervioso; por ejemplo, se han observado incrementos de larga duración en la fuerza sináptica (se refiere a que los efectos producidos por la activación de una sinapsis facilita los de la activación en otra) de la región estimulada (Sutula y Steward, 1986), un crecimiento de las fibras musgosas, así como un crecimiento y reorganización sináptica en el hipocampo (Sutula y col., 1988 y Li y cols. 2002).

Mecanismos Involucrados en el Kindling

A continuación se describen brevemente algunos mecanismos asociados al kindling como modelo de plasticidad cerebral.

Potenciación a Largo Plazo (PLP).

Se ha relacionado al kindling con la potenciación a largo plazo. Esta se refiere al aumento de la respuesta sináptica o "fortalecimiento sináptico" tras una estimulación tetanizante en una región específica del cerebro.

La relación entre la PLP y el kindling está aún bajo investigación, pero lo que se ha observado es que el kindling está acompañado de una potenciación duradera en la eficacia sináptica de forma semejante a la PLP, además de las similitudes en las modificaciones sinápticas (McEarchen y Shaw, 1996), esto llevó a suponer que la PLP puede actuar como el mecanismo celular del kindling (Adamec, 1999). Por ejemplo, Sutula y Steward (1986 y 1987) demostraron que la inducción de la PLP en la vía perforante disminuye el número de estimulaciones subsecuentes para establecer el kindling en ese circuito.

Cambios Estructurales

El kindling se asocia con un aumento duradero en la sensibilidad sináptica en el circuito estimulado, por lo que se ha sugerido que hay una modificación estructural que subyace en la sinapsis. Se ha propuesto que la mayor

susceptibilidad neuronal que produce el kindling resulta de las modificaciones estructurales, como “sprouting” (crecimiento de ramificaciones dendríticas o axonales) y la formación de nuevas conexiones sinápticas que aumentarían la excitación recurrente (Wolbye y cols., 1996; Li y cols., 2002). A su vez, se ha demostrado un crecimiento de las fibras musgosas del giro dentado después de producir kindling (Sutula y cols., 1988; Rashid y cols., 1995; Élmer y cols., 1996;).

Por otro lado, Teskey y cols. (2001) encontraron un incremento significativo en la densidad de las espinas apicales, al inducir kindling en la corteza frontal primaria (capa III) de la rata. Langmeier y Mares (1984) observaron que después de producir kindling en la corteza sensoriomotora de la rata, hubo un incremento en el tamaño de la terminal axónica y en las espinas dendríticas. Incluso después de producir kindling se ha reportado un aumento en la neurogénesis de las células granulosas del hipocampo (Parent y cols., 1998; Scott y cols., 1998).

Mecanismos Celulares y Moleculares

La proteína cinasa C (PKC) la cual parece estar involucrada en la plasticidad neuronal (Linden y Routtenberg, 1989), puede ser uno de los mecanismos moleculares que subyacen al estado de hiperexcitabilidad producido por el kindling; por ejemplo, algunos estudios han encontrado un aumento en la actividad de la PKC en ratas con kindling en la amígdala e hipocampo (Chen y cols., 1992; Beldhuis y cols., 1993 y Akiyama, 1998).

Dentro de los mecanismos moleculares, se han descrito algunos neurotransmisores. La disminución de la noradrenalina produce una facilitación en el kindling. Por otro lado, se ha propuesto que el GABA inhibe las convulsiones, mientras la acetilcolina al parecer facilita el desarrollo del kindling y la serotonina aumenta el umbral para inducirlo, después de administrar inhibidores de la recaptura de este neurotransmisor (revisado en Joy, 1985). También se ha visto que el óxido nítrico junto con el glutamato participan en el desarrollo del kindling (El-Abhar y El-Gawad, 2003).

Kindling en el Aprendizaje y la Memoria

Uno de los postulados más aceptados del aprendizaje y la memoria enuncia que el incremento en la fuerza de las conexiones sinápticas subyacen a la adquisición y almacenamiento de la información (Robinson y cols., 1993; Bailey, 1999). Sin embargo, los estudios realizados para evaluar los efectos de los cambios plásticos producidos por el kindling sobre el aprendizaje y la memoria, son escasos. Los resultados que se han observado dejan claro que el kindling puede inducir cambios conductuales, pero los efectos directos sobre el aprendizaje son contradictorios.

Por un lado, Rosen y cols. (1996) observaron que las ratas con kindling en la amígdala mostraban una respuesta emocional o temor exagerado. Otro estudio (Gagan y cols., 2002) demostró que el kindling amigdalino facilitaba el aprendizaje aversivo a los sabores (consumían menos del estímulo condicionado). Aguirre (1999) observó que las ratas con kindling en la corteza insular presentan una mayor aversión al estímulo condicionado (EC) en las primeras sesiones del CAS (Adquisición), mientras que las ratas con kindling en la Amígdala lo hicieron en las siguientes sesiones, retrasando el periodo de extinción del condicionamiento (consolidación y retención del aprendizaje).

Por otra parte, Mikulka y Freeman (1984), encontraron que el kindling amigdalino interrumpía el condicionamiento aversivo a los sabores. También se han visto en los estados preconvulsivos del kindling, alteraciones en la memoria espacial (Feasey y cols., 1993), otros estudios han descrito alteraciones en la memoria de referencia y espacial en ratas con kindling amigdalino (Anisman y McIntyre, 2002).

Los estudios apuntan a la presencia de eventos plásticos en el sistema nervioso y cambios conductuales, después de inducir el kindling.

1.2 CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES (CAS)

En los animales, la búsqueda y obtención del alimento es de las conductas más importantes para adquirir energía. La sobrevivencia de los seres vivos depende de la selección de nutrientes y evitación de sustancias tóxicas. La habilidad para reconocer a través de los olores y sabores ha influido en la evolución de los seres vivos (Bermúdez-Rattoni y cols., 1989). En este sentido la evolución ha seleccionado a los individuos capaces de desarrollar la habilidad de modificar su comportamiento como resultado de su experiencia, es decir del aprendizaje. La asociación lograda entre los estímulos relacionados con los alimentos (mediados por aferencias gustativas, olfativas, visuales y somatosensoriales) y la retroalimentación visceral que sigue de su ingestión determina en gran parte la conducta consumatoria futura de los animales y constituye un proceso notable de aprendizaje.

Características del CAS

En 1955, John García y colaboradores demuestran que se puede producir un condicionamiento aversivo hacia la sacarina cuando este sabor es seguido por una exposición de rayos gamma. En donde sugieren que la sacarina puede ser un adecuado estímulo condicionado (EC), mientras que los rayos gamma estarían operando como estímulo incondicionado (EI). Esta es la primera vez en la que se describe el CAS.

El CAS es un paradigma que consiste en la presentación de un sabor novedoso seguido por un malestar gástrico que produce en el animal una aversión subsecuente del sabor. Este condicionamiento se establece con un sólo ensayo de asociación sabor-irritación gástrica y el intervalo entre la presentación del EC-EI puede ser hasta de 1-6 horas (García y cols., 1985; Ryley y Tuck, 1985) estableciéndose fuertes asociaciones. En condiciones de laboratorio basta asociar un sabor novedoso (EC) con cualquier sustancia que produzca irritación gástrica (EI). Generalmente se utilizan como EC soluciones de sacarosa o sacarina y como EI cloruro de litio (LiCl), inyectado intraperitonealmente, que produce síntomas de envenenamiento (peristalsis, flacidez, diarrea entre otros). La consecuencia de

esta asociación se manifiesta durante la segunda presentación del EC; si el consumo del EC disminuye, el CAS se ha adquirido. Así, el paradigma del CAS es un modelo experimental de aprendizaje muy efectivo constituido por las siguientes fases.

- a) Adquisición o Aprendizaje: el organismo es expuesto a los estímulos que se asocian o que son contingentes.
- b) Consolidación: se activan mecanismos que permiten una cierta permanencia de la experiencia concreta recién percibida.
- c) Retención: proceso activo o pasivo, por medio del cual el organismo es capaz de expresar en el tiempo los efectos del aprendizaje durante varias ocasiones.
- d) Evocación (Retrieval): es la expresión de conductas determinadas por la experiencia previa.
- e) Extinción: cuando el EC, es presentado repetidamente sin la exposición contingente de EI, la conducta aversiva al EC desaparecerá gradualmente.

Neuroanatomía y Fisiología del CAS

Los estudios realizados en mamíferos indican que los sistemas gustativos y visceral convergen en diversas áreas del sistema nervioso central: los estímulos gustativos activan los receptores linguales que se encuentran conectados a los pares craneales facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X), estos se conectan a su vez, con el núcleo del tracto solitario anterior (NTS). El NTS caudal recibe aferencias viscerales de las ramas hepáticas del nervio vago (sensibles a la irritación gástrica), aferencias del área postrema (sensibles a toxinas en la circulación periférica) y del sistema vestibular (sensible a náusea inducida por el movimiento). Las divisiones viscerales y gustativas del NTS, envían eferencias a regiones separadas del NPB anterior, mientras que la zona intersticial en la parte dorsomedial posterior del NPB recibe tanto la información vagal como gustativa del NTS. El NPB recibe proyecciones del área postrema (AP), la cual es activada por estímulos eméticos, incluyendo LiCl. A partir del NPB las fibras siguen 2 vías principales: el primer grupo proyecta principalmente a la amígdala central, al

complejo amigdalino basolateral (proyecta en menor proporción), el hipotálamo lateral y la sustancia innominada. El segundo proyecta a neuronas del núcleo ventral posteromedial del tálamo. Las fibras de los núcleos talámicos que se extienden desde el núcleo ventral posteromedial, el relevo trigémino somatosensorial y entre el núcleo parafascicular y el lemnisco medial proyectan al núcleo amigdalino central y a la corteza insular (CI) (revisión en Bermudes-Rattoni y cols., 1995 y Paxinos, 1995). De lo anterior, el NPB parece el principal candidato para que se lleven a cabo los procesos de integración inicial de las señales gustativas y viscerales, la amígdala y corteza insular serían los otros candidatos que como veremos más adelante, son los sitios implicados en la adquisición y retención del CAS (Sakai, 1999). Ver figura 1.1. A continuación se describirá con más detalle el control que ejerce la amígdala y corteza insular sobre el CAS

Amígdala (AMG)

El término amígdala se origina del griego que significa almendra; ésta es una masa ovoide de materia gris que se encuentra en la porción medial del lóbulo temporal de los primates, colindando con la parte terminal rostral del hipocampo y el límite anterior del cuerno temporal del ventrículo lateral. En la rata, esta masa apenas tiene la forma de una almendra, pero los principales núcleos son fácilmente identificados con aquellos encontrados en los primates. La amígdala es un complejo multinuclear, dividido por el grupo nuclear basolateral, el grupo nuclear corticomedial y el grupo nuclear central. La amígdala recibe información de la corteza orbitofrontal, la corteza piriforme, el hipotálamo, el tálamo, de todas las modalidades sensoriales y varias regiones del sistema límbico (revisión en Pitkänen, 2000).

En los últimos 10 años ha habido un gran interés en el estudio de esta estructura, debido su papel en la determinación del significado emocional de las señales sensoriales y en la memoria de eventos emocionales. Estas funciones son esenciales para la sobrevivencia de los mamíferos. Al respecto, uno de los aspectos mejor estudiados del aprendizaje aversivo a los sabores (CAS), es que

se han encontrado evidencias de que la amígdala está involucrada en este tipo de aprendizaje.

Se ha reportado que lesiones en la amígdala no permiten el establecimiento de aversiones condicionadas al sabor, inducidas por algunos agentes que representan EI, tales como la anfetamina o cloruro de litio (LiCl) (Grupp y col., 1976) y los rayos X (Elkins, 1980). En otros estudios se ha estimulado eléctricamente el complejo amigdalino durante la adquisición y la extinción del condicionamiento toxicofóbico, observándose que la estimulación antes de la aplicación del EC, resultó en una aversión al sabor más fuerte en las ratas estimuladas con respecto a las no estimuladas, (Philipps y Le Piane., 1980).

El CAS disminuye, cuando las ratas son inyectadas con tetrodotoxina (TTX) en la amígdala basolateral y central, 30 minutos ó 1.5 horas (pero no 6 hrs) después de la aplicación del agente que induce el malestar. En el mismo estudio, las microinyecciones antes de la presentación del sabor, no afectan el aprendizaje, en cambio las microinyecciones de TTX dentro de la AMG y corteza gustativa antes de la evocación disminuyen la expresión del CAS y la inyección de TTX tanto a la AMG como a la corteza gustativa o corteza insular (CI) dañan totalmente la expresión del CAS. Estos resultados sugieren que la AMG está implicada en la evocación del CAS y que las conexiones de la AMG con la CI son importantes para la evocación (Gallo y cols., 1992; Roldán y Bures, 1994).

La proteína cinasa C (PKC), parece estar involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria. Se ha observado que ratas inyectadas con inhibidores de la PKC durante el intervalo EC-EI, en la amígdala y en la corteza insular, más no en el área talámica, no adquieren el condicionamiento aversivo al sabor. En este mismo estudio se encontró que las inyecciones de los inhibidores de la PKC en la amígdala 30 minutos después del apareamiento del EC-EI, producían deficiencias en la formación del CAS, sin embargo estas no se observaron en la corteza gustativa. Los autores propusieron que es en la amígdala donde ocurre el aprendizaje de asociación entre el EI y el EC para dar origen a una memoria a largo plazo (retención y recuperación) del condicionamiento aversivo a los sabores (Yasoshima y Yamamoto, 1997 y Sakai, 1999).

A partir de estos datos se puede concluir que la amígdala está involucrada en el proceso asociativo de procesos viscerales y tareas de aprendizaje que se establecen en el condicionamiento aversivo.

Corteza Insular (CI)

La corteza insular de la rata ocupa la esquina dorsal del surco rinal y se extiende dorsalmente hacia los límites de las áreas somatosensoriales primarias y secundarias. La CI, también es llamada corteza visceral, porque recibe información tanto del gusto como visceral. La CI recibe conexiones aferentes del núcleo ventral posteromedial del tálamo y está recíprocamente interconectada con la amígdala. Se ha sugerido que la corteza insular es un sitio de convergencia de entradas límbicas y sensoriales que no ocurren dentro de otra área sensorial de la corteza. Las conexiones a la corteza insular que pueden ser importantes para los procesos mnémicos son aquellas del sistema límbico, la amígdala, el núcleo dorsomedial del tálamo y la corteza prefrontal (Krushel y Vander Kooy, 1998).

Varios experimentos han sugerido que las lesiones de la corteza insular realizadas ya sea antes o después de la adquisición, causan pérdidas severas en el aprendizaje del CAS, atenuando tanto la adquisición como la retención (Yamamoto y cols., 1994). Los animales lesionados en la corteza insular son incapaces de realizar una asociación hedónica del sabor que ha sido seguida por malestar, pero mantienen su capacidad para evitar sabores naturales desagradables (Kiefer y Orr, 1992). Se ha demostrado (Rosenblau y cols., 1993) que tanto los estímulos gustativos como los viscerales producen pequeños aumentos en la síntesis de proteínas en las células de la corteza insular. Esta síntesis aumenta considerablemente cuando se presenta el estímulo gustativo previamente apareado con la irritación gástrica.

Estos resultados atribuyen a la corteza insular un papel de tipo asociativo e integrativo de los estímulos involucrados en el condicionamiento aversivo a los sabores.

Yamamoto y cols. (1995a), propusieron que la corteza insular, además de estar involucrada en la adquisición y consolidación del CAS, era el sitio en donde

se almacenaba a largo plazo la asociación entre el EI y el EC. Otros experimentos (Yasoshima y Yamamoto, 1997), indican que la corteza insular está principalmente implicada en la adquisición y consolidación del aprendizaje de tareas motivadas aversivamente. La amígdala y la corteza insular juegan un papel muy importante en el aprendizaje y memoria.

Por otro lado, otros estudios han encontrado que la corteza insular esta implicada en la memoria a largo plazo (retención). Ratas previamente entrenadas en el CAS y en una tarea de evitación inhibitoria (para permitir la consolidación, fueron lesionadas cuatro y dos días después de el entrenamiento; se encontró una semana después de la lesión que los sujetos no recordaban ambas tareas. Indicando con ello, que la CI insular está implicada en la memoria a largo plazo (Ormsby y cols., 1991). Berman y Dudai (2001), han descrito que la CI participa tanto, en la adquisición y consolidación del CAS. Ellos observaron que al bloquear los receptores B-adrenérgicos y muscarínicos en la síntesis de proteínas y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en la CI, se veía afectada tanto la adquisición como la consolidación.

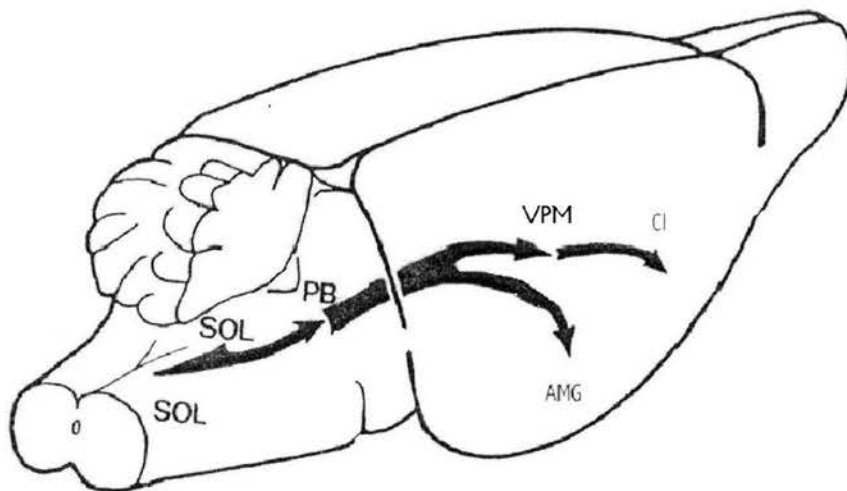


Figura. 1.1. Vías de proyección implicadas en el aprendizaje aversivo. AMG, Amígdala; CI, Corteza insular; SOL, Núcleo del tracto solitario y PB, Núcleo parabraqueal; VPM, Núcleo talámico ventromedial posterior. Modificado por López-Velázquez, 2004. Tomado de García y cols., 1985.

CAPITULO 2

2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

El kindling se ha estudiado como modelo de epilepsia (Hanesson y Corcoran, 2000). Sin embargo, es evidente que también es un modelo de plasticidad ya que produce modificaciones en los circuitos neuronales: sprouting, nuevas conexiones sinápticas y potenciación a largo plazo (Morrel, 1991; Geinisman y cols., 1991).

Los trabajos sobre el efecto del kindling en el aprendizaje se han enfocado en los efectos amnésicos inducidos por la estimulación (Hanesson y Corcoran, 2000). Sin embargo, pocos son los estudios, que han utilizado al kindling como un modelo que contribuye en el aprendizaje y la memoria. Algunos trabajos han mostrado los efectos del kindling como estímulo incondicionado sobre una tarea de aprendizaje aversivo a los sabores (Gagan y cols., 2002). En donde la inducción del kindling en la AMG, después de la presentación de una solución con sabor (estímulo condicionado, EC) provoca una disminución en el consumo de la misma. Este estudio parece contradecir, aquellos experimentos en los cuales se utiliza al kindling como agente amnésico para estudiar las alteraciones en la memoria observadas durante la epilepsia.

Por otro lado, Aguirre (1999), observó que ratas en las que el kindling se había establecido en la corteza insular y amígdala, mostraban efectos facilitatorios en el CAS. Se demostró que mientras el kindling en la amígdala facilitaba la consolidación y retención, en la CI facilitaba la adquisición del aprendizaje en el condicionamiento aversivo a los sabores. Si el kindling facilita el aprendizaje podemos sugerir que hubo una modificación en la estructura neuronal.

Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluará si los cambios en el CAS inducidos por el kindling coexisten con algunos procesos plásticos, tales como el crecimiento dendrítico o axonal en la CI y AMG. También se evaluará en el APM como un control, ya que es una estructura que no esta relacionada con el CAS, sino que participa principalmente en la conducta sexual (Paredes y Baum, 1997).

OBJETIVO

Se evaluará el crecimiento neuronal o "sprouting" neuronal (dendrítico y/o axonal) producido por el kindling en la AMG y CI, y si estos cambios afectan el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).

HIPOTESIS

H1: Las ratas con kindling en la AMG y CI presentan efectos facilitatorios en el condicionamiento aversivo a los sabores, en cambio las ratas con kindling en el área preóptica media, no presentan ningún efecto en el aprendizaje aversivo a los sabores.

H2: El efecto facilitatorio en ratas con kindling en la corteza insular y amígdala, está asociado con "sprouting" neuronal o crecimiento de las ramas dendríticas o axonales, en cambio las ratas sham no presentan ningún efecto en el crecimiento de las ramas dendríticas o axonales ("sprouting neuronal").

CAPITULO 3. METODO

SUJETOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 gramos, mantenidos en un ciclo luz-oscuridad invertido (12:12hrs) con comida y agua ad libitum (excepto durante el CAS).

MATERIAL Y EQUIPO.

- Un estimulador Grass (S48).
- Una unidad de aislamiento Grass (A-26).
- Polígrafo Grass (P-28).
- Electrodo bipolares de acero inoxidable.
- Caja de acrílico con un orificio en la parte superior, a través del cual se conectó a la rata con el estimulador y el polígrafo.

DISEÑO

Se integraron los siguientes grupos:

Ratas Intactas (grupos no implantados que fueron sometidos al CAS):

1. Control: Inyectado con NaCl después de la adquisición:.
2. CAS: Inyectado con LiCl después de la adquisición :

Ratas Implantadas

1. En la amígdala, la corteza insular y área preóptica medial pero sin Kindling o estimulación eléctrica: Sham
2. En corteza insular y con Kindling: CI-K
3. En la amígdala y con Kindling: AMG-K
4. En el área preóptica media y con Kindling: APM-K

PROCEDIMIENTO:

Implantación:

Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (95mg/Kg) y Xilazine (12mg/Kg), y colocadas en el estereotáxico para la implantación del electrodo. La implantación se realizó en una de las siguientes estructuras: la amígdala (AMG), la corteza insular (CI) y el área preóptica media (APM). Para la implantación de los electrodos en estos sitios se tomaron las siguientes coordenadas de acuerdo a Paxinos y Watson (1987): amígdala, 4.25 mm lateral a la línea media, 2.5 mm posterior a bregma y 8 mm de profundidad a partir de la duramadre; corteza insular 5.5 mm lateral a la línea media, 1.2 mm anterior a bregma y 5.5 mm de profundidad a partir de la duramadre y área preóptica medial 0.5 mm lateral a la línea media, 0.5mm posterior a bregma y 8 mm de profundidad a partir de la duramadre.

Una vez que se llevó a cabo la implantación, se fijó el electrodo utilizando 4 tornillos colocados en el cráneo (uno funciona como tierra), los cuales fueron cubiertos con acrílico dental.

Kindling.

Una semana después de la implantación, las ratas fueron estimuladas eléctricamente a través del electrodo para detectar el umbral de la postdescarga (PD) de cada sujeto. Los animales se estimularon con pulsos bifásicos, rectangulares de 1 ms de duración, a 60 Hz y con una duración del tren de pulsos de 1 seg. Los estímulos iniciales fueron de 100 μ A y la intensidad se aumentó en 50 μ A hasta la aparición de la PD (espigas rítmicas de alta amplitud que varían en frecuencia y duración). Los estímulos sucesivos fueron aplicados con los parámetros de voltaje o amperaje que se establecieron en la primera postdescarga.

Durante el desarrollo del kindling se registraron las manifestaciones conductuales de los animales posteriores al estímulo y se clasificaron de acuerdo a las 5 fases descritas por Racine (1972): fase 1= clonos facial; fase 2 = fase 1 mas cabeceo (nodding); fase 3= fase 2 más clonos de miembros anteriores, fase 4= fase 3 más levantamiento de los miembros anteriores y fase 5= fase 4 más caídas, con pérdida del control y la postura. Cuando los sujetos presentaban tres fases 5 consecutivas, se procedió a la realización del CAS.

CAS

Todas las ratas fueron privadas de agua durante 24 horas y entrenadas a tomar agua en dos sesiones de 10 minutos (mañana y tarde) durante 6 días con el fin de obtener la línea base de consumo. El volumen de consumo fue medido y registrado diariamente con 0.5 ml de precisión. En el séptimo día, en la sesión matutina el agua fue sustituida por una solución de sacarina al 0.1%, 30 minutos después los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de cloruro de litio (7.5ml/kg i.p., 0.2M). Durante los días octavo, noveno y décimo se registró nuevamente la línea base de consumo de agua. En el día onceavo y hasta el vigésimocuarto día, sólo en la sesión matutina el agua se sustituyó por la solución con sacarina (en la sesión vespertina se les daba el agua) con el fin de evaluar la retención y el proceso de extinción del CAS, el registro de consumo de sacarina y agua se realizó diariamente (mañana y tarde, respectivamente).

Histología

Las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas vía intracardiaca con solución salina al 1.2% y paraformaldehído al 4% (pH 7.3). Los cerebros se extrajeron y almacenaron en la misma solución fijadora.

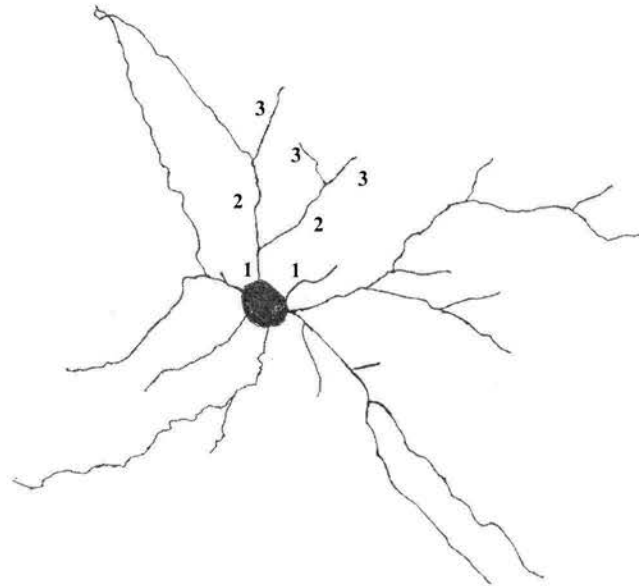
Los bloques de cerebro incluyeron una extensión de la amígdala hasta la corteza insular (aproximadamente 5 mm posterior a bregma y 4 mm anterior a bregma). Estos, fueron inmersos en una solución Golgi-Cox y colocados en un lugar oscuro por 6 semanas. Transcurrido este periodo, los bloques de tejido se lavaron rápidamente con agua destilada, se deshidrataron e incluyeron en nitrocelulosa y se polimerizaron por exposición de vapores de cloroformo. Posteriormente, se realizaron cortes de 140 μ m y se colocaron en alcohol al 70%, se revelaron con solución "T-Max" (Kodak). Finalmente se montaron en portaobjetos y se cubrieron con resina sintética.

Morfometría.

Se localizaron las dendritas de las neuronas de la CI de ambos hemisferios en el sitio de implantación y contralateral y se dibujaron a un aumento de 40 X usando una cámara lúcida.

Los árboles dendríticos se examinaron y fue medido: el número total de los segmentos de las ramas y la longitud total de cada rama.

El análisis del orden de las ramas se realizó a partir de donde emergen del cuerpo celular (basilar) o de la dendrita apical primaria (apical). De la primera bifurcación se consideraron de primer orden o primarias, después de la primera bifurcación, las ramas fueron de segundo orden o secundarias y así sucesivamente. La cuantificación de cada rama, usando este método permitió conocer el número de ramas dendríticas y su longitud. (ver dibujo siguiente).



3.1 Neurona de la Corteza Insular. Se ejemplifica el orden de las dendritas. 1. Dendritas primarias. 2. Dendritas secundarias o segundo orden, 3. Dendritas terciarias o tercer orden.

Análisis

Todos los datos conductuales fueron analizados usando ANOVA.

Las arborizaciones dendríticas se examinaron promediando todas las células por animal y se usó un ANOVA para determinar las diferencias entre los grupos. Para el significado estadístico de los datos morfológicos y conductuales se utilizarán comparaciones Post-Hoc Newnan-Keuls.

CAPITULO 4. RESULTADOS

HISTOLOGÍA

Se utilizaron 67 sujetos, 20 de los cuales fueron ratas intactas (no implantadas y sin kindling) usados para el CAS. De estas 20 ratas, 10 fueron inyectadas con NaCl (control) y 10 ratas con LiCl durante el condicionamiento aversivo.

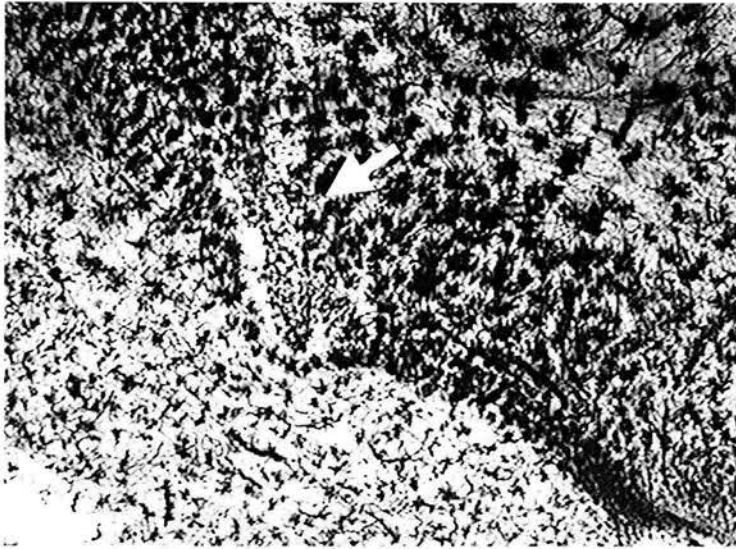
Las 47 ratas restantes se distribuyeron aleatoriamente para ser implantadas en los siguientes grupos: a) 10 ratas Sham (3 ratas implantada en la amígdala, 3 en corteza insular, 4 en área preóptica). b) 11 ratas implantadas en la amígdala, c) 13 en la corteza insular, d) 13 en el área preóptica.

Todos los cerebros de cada grupo (incluyendo el de las ratas intactas) fueron impregnados con la técnica Golgi-Cox (para visualizar tanto el soma como las prolongaciones dendríticas de las neuronas). Una vez impregnados, cortados y montados, se realizó la histología de los grupos implantados para localizar el sitio del electrodo, quedando los siguientes grupos:

a) 10 ratas Sham (3 ratas implantada en la amígdala, 3 en corteza insular, 4 en área preóptica). b) 5 ratas implantadas en la amígdala, c) 8 en la corteza insular, d) 9 en el área preóptica. Ver figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4. En el análisis histológico también se encontró que en 15 ratas el electrodo quedó implantado fuera de la zona deseada de estimulación, formándose otro grupo al cual se le denominó Otro Sitio (OS). A todos los grupos se les indujo kindling, excepto al grupo Sham e intactas.

Cuando se realizó el análisis estadístico durante el CAS en el grupo de ratas Sham e Intactas se observó que entre estos grupos no hubo diferencias significativas ($F_{(1,23)} = 1.36$, $p = 0.125$), por lo que ambos se agruparon en uno solo, quedando como el grupo Control.

A



B



C

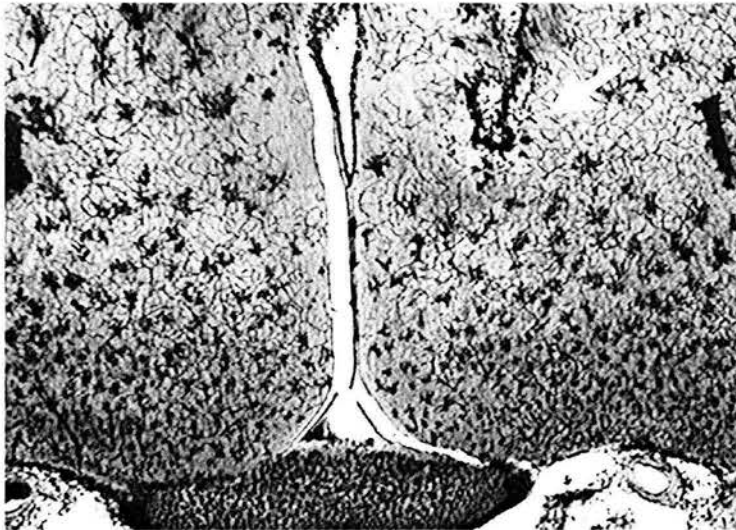
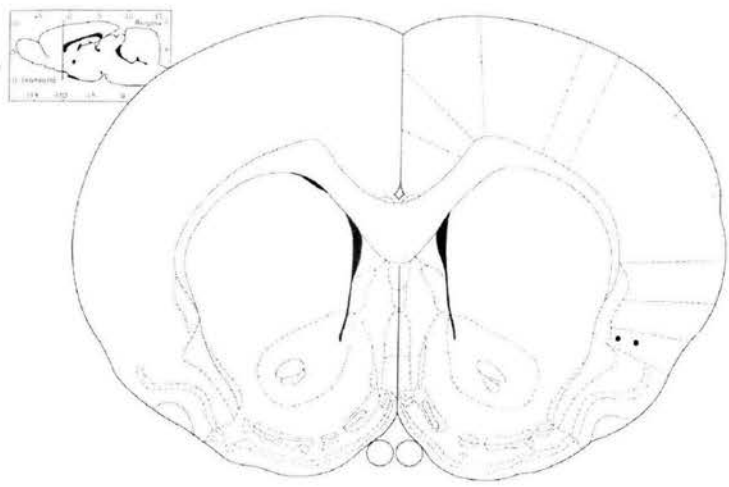
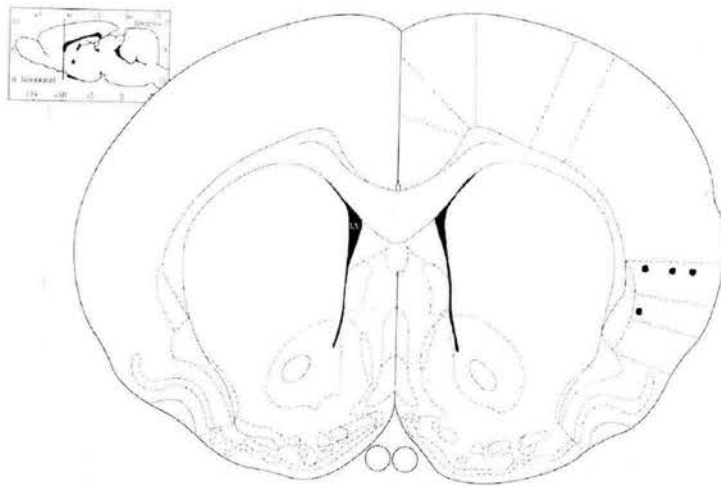


Figura 4.1. Cortes de tejido impregnados mediante la técnica Golgi-Cox en A) amígdala central, B) corteza insular y C) área preóptica media. La flecha indica el sitio del electrodo. Se usó un aumento de 4X.



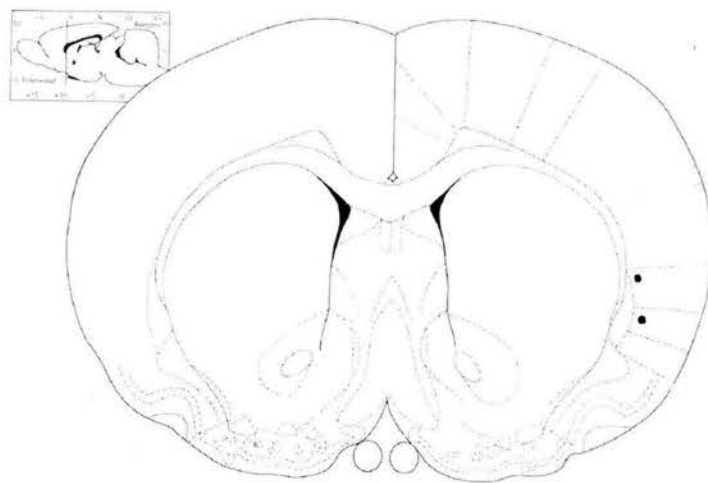
Interaural 10.20 mm

Bregma 1.20mm



Interaural 10.00 mm

Bregma 1.00 mm



Interaural 9.70 mm

Bregma 0.70 mm

Figura 4.2. Representación esquemática de la localización de los electrodos en los sujetos implantados en la corteza insular.

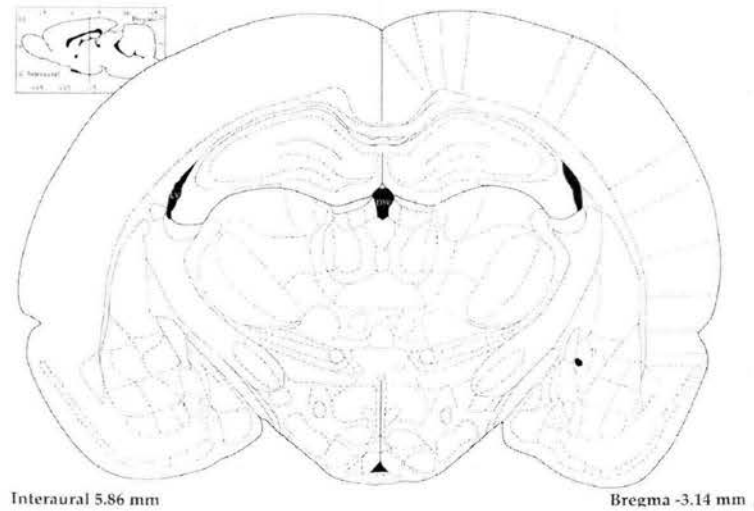
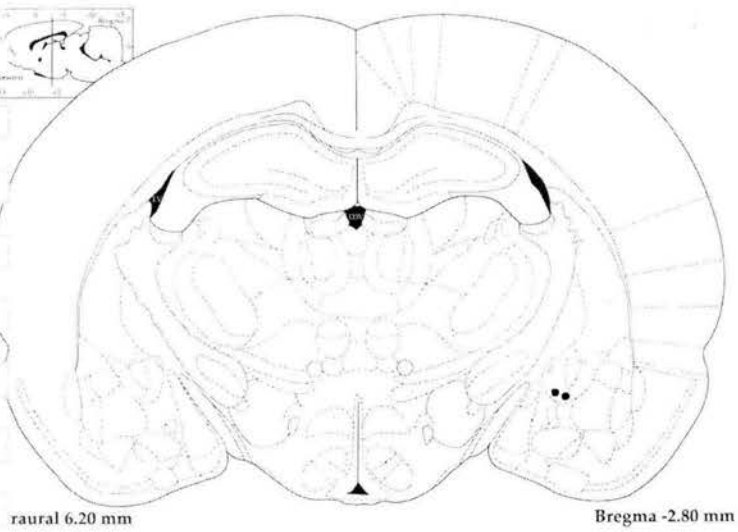
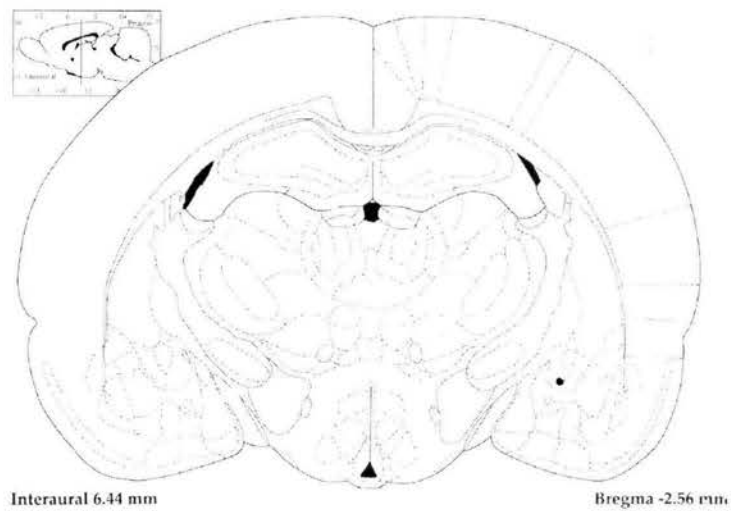
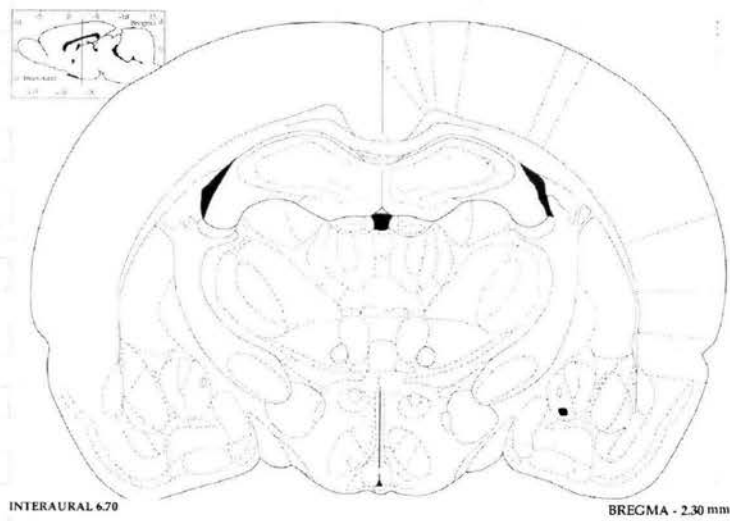
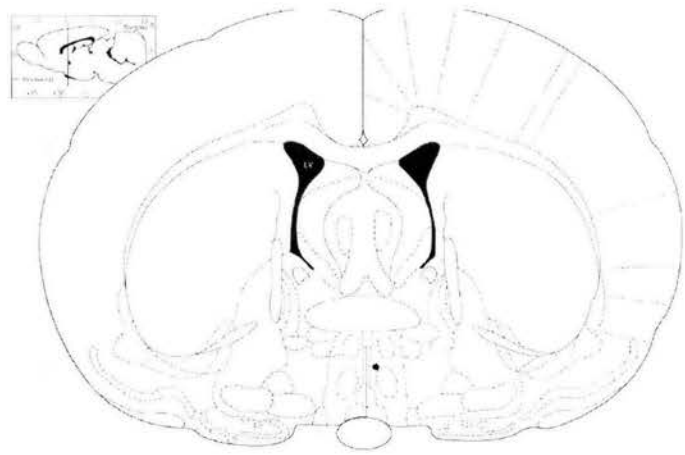
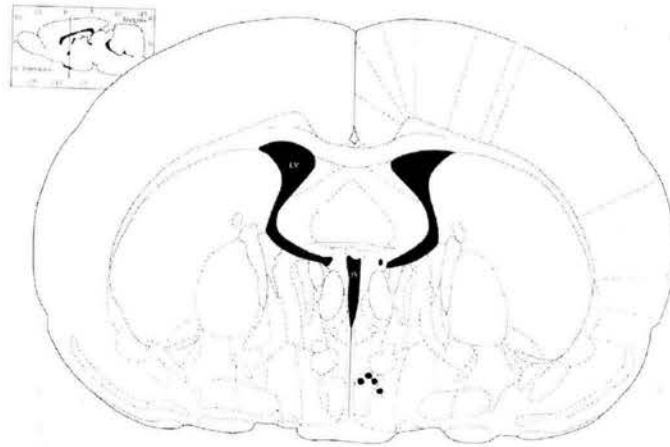


Figura 4.3. Representación esquemática de la localización de los electrodos en los sujetos implantados en la amígdala central.



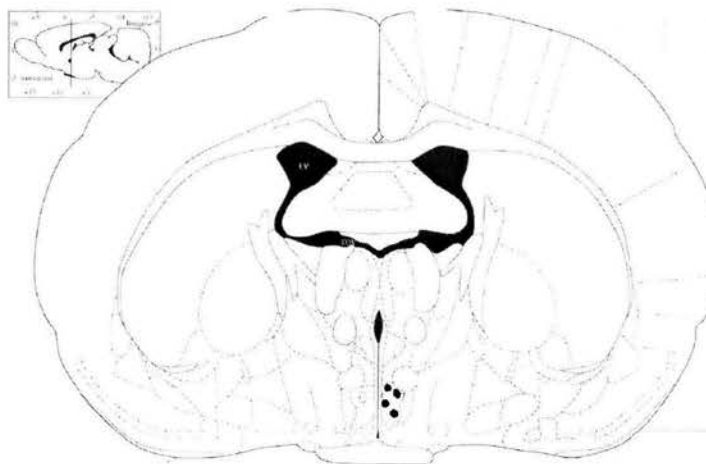
Interaural 8.60 mm

Bregma -0.40 mm



Interaural 8.20 mm

Bregma -0.80 mm



Interaural 8.08 mm

Bregma -0.92 mm

Figura 4.4. Representación esquemática de la localización de los electrodos en los sujetos implantados en el área preóptica media.

CAS

Los dos grupos intactos fueron sometidos a la prueba de condicionamiento aversivo a los sabores, a uno se le inyectó cloruro de sodio (control) y al otro se le inyectó cloruro de litio (experimental). Usando un ANDEVA, hubo diferencias significativas entre el grupo control y experimental, en el consumo de la sacarina durante el CAS ($F_{(1,23)} = 34.04836$, $p < 0.0001$), se encontró que las ratas tratadas con cloruro de litio consumieron menos sacarina que el grupo control del día 11 al día 21 ($p < 0.01$), así como el día 23 ($p < 0.05$) (ver figura 4.5). Este patrón de aprendizaje aversivo concuerda con lo descrito por García y cols. (1955,1985).

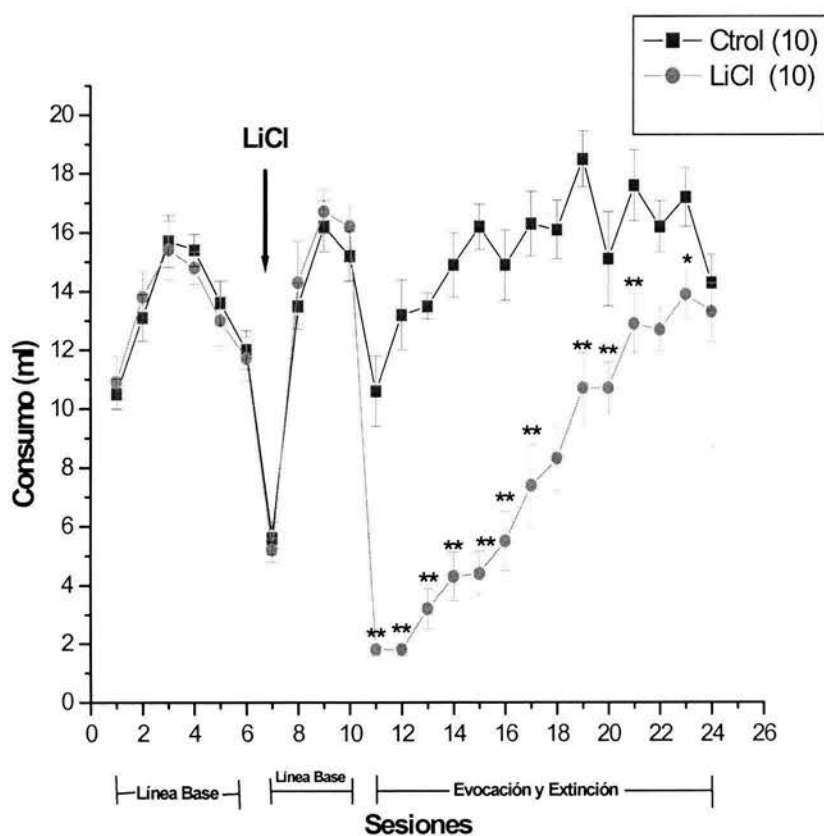


Figura 4.5. Curva del proceso de adquisición y extinción del aprendizaje aversivo a los sabores. En el día siete se para el Estímulo Neutro (Sacarina) y Estímulo Incondicionado, los días 8, 9 y 10 son línea base. A partir del día 11 se registra el consumo de sacarina. * Diferente del grupo control $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar

KINDLING

Utilizando un ANDEVA, no se encontraron diferencias significativas ($F_{(3,16)}=0.447$, $P=0.723$) en el número de estímulos para producir la postdescarga (PD) en cada una de las estructuras estimuladas: AMG, CI, APM y OS (Corteza Parietal, hipocampo, estría terminal). Tampoco se encontraron diferencias significativas ($F_{(3,16)}=0.618$, $p=0.613$) en el número de estímulos para inducir la fase 5 entre cada una de las estructuras estimuladas. En la tabla 4.1 se muestran el número de estímulos para inducir la postdescarga y la fase 5. En la figura 4.6 se muestra el número de postdescargas que aparecieron durante todo el desarrollo del kindling.

Tabla 4.1.

Se muestran el número de estímulos para inducir la postdescarga y la fase 5. Los datos se expresan como media \pm Error estándar.

Sitio estimulado	Número de Estímulos para inducir la Postdescarga (PD)	Número de Estímulos para inducir la Fase 5.
Amígdala (n=5)	9 \pm 4.38	15.33 \pm 1.86
Corteza Insular (n=8)	4.67 \pm 1.8	23 \pm 9.77
Área Preóptica Media (n=9)	4.86 \pm 0.88	29.43 \pm 6.84
Otro Sitio (n=15)	5 \pm 1.08	17.25 \pm 4.82

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el número de estímulos para inducir la PD y la Fase 5.

Usando un ANDEVA, no se encontraron diferencias significativas ($F_{(3,22)}=2.581$, $p=0.079$) en el número de postdescargas presentadas entre cada una de las estructuras estimuladas (Fig. 4.6).

La duración de la postdescarga fue diferente (ANDEVA; $F_{(3,23)}=9.63$, $p<0.0003$) para cada una de las estructuras estimuladas (Fig. 4.7). Se puede observar que la duración de la PD en la CI fue menor mientras que la duración de la PD es mayor cuando se estimula la AMG y el APM (Fig. 4.7). También se puede

notar un incremento en la duración de la primera PD a la última PD que presentó cada estructura, $F_{(8,24)} = 10.023$, $p < 0.001$.

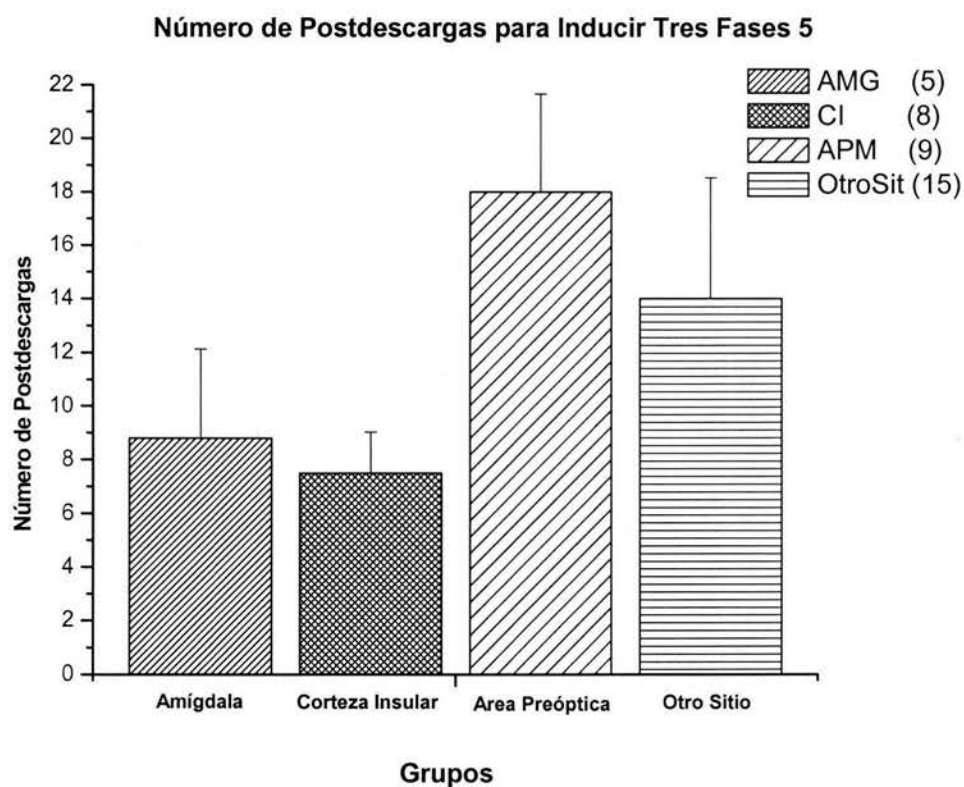


Figura 4.6. Número de postdescargas para inducir la fase 5 en los diferentes grupos. Amígdala; Corteza insular; Área Preóptica Media, Otro Sitio. No se encontraron diferencias significativas, $p > 0.05$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar

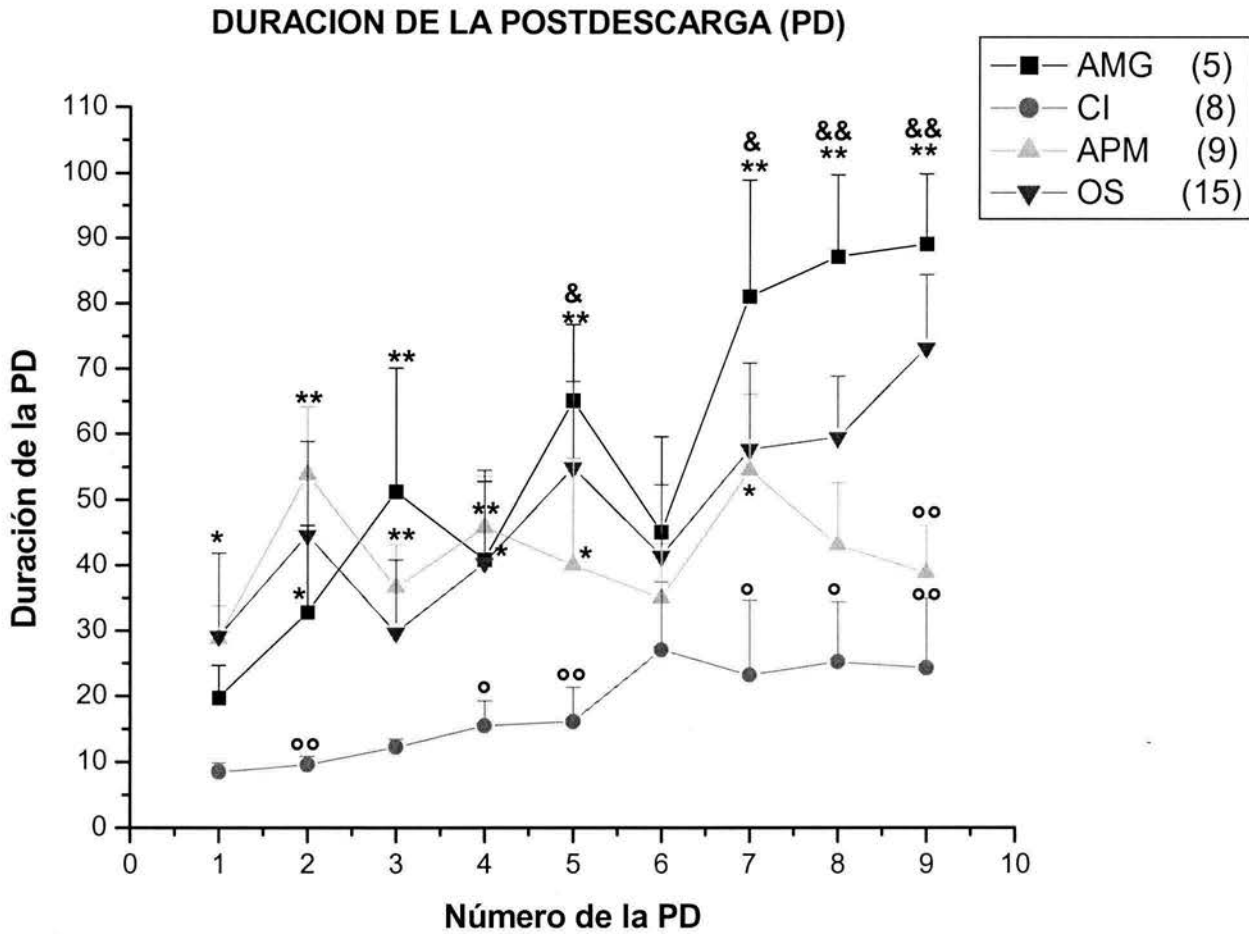


Figura 4.7. Duración de las postdescargas para cada una de las estructuras estudiadas. Obsérvese como se va incrementando la duración de la PD conforme se desarrolla el kindling.. Abreviaturas: AMG, amígdala; CI, corteza insular; APM, área preóptica media y OS, Otro Sitio. Diferente de CI: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de OS: ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$. AMG Diferente de APM: & $p < 0.05$, && $p < 0.01$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar

KINDLING Y CAS

Usando un ANDEVA, se encontró un efecto del kindling sobre el CAS en los grupos AMG, CI y APM mostrando un consumo menor de sacarina, que las ratas con kindling en OS y control (ctrl), ($F =_{(4,23)} = 2.042$, $p < 0.0001$). Observándose que las ratas con kindling en la CI consumían menos sacarina que las ratas control ($p < 0.05$), sobre todo el consumo de sacarina fue menor a partir del día 17 hasta el día 24 (excepto el día 18). También las ratas con kindling en la CI consumieron menos sacarina del día 15 al día 24 que las ratas del grupo OS ($p < 0.05$). En las ratas con kindling en la AMG el consumo de sacarina fue menor ($p < 0.05$) del día 19 al día 24 (excepto el día 20) que las ratas control. Las ratas con kindling en la AMG presentaron una aversión significativamente mayor ($p < 0.05$), consumiendo menos sacarina a partir del día 15 al 24 con respecto al grupo OS. El consumo de sacarina de las ratas con kindling en el APM no fue diferente al grupo de ratas control ($p > 0.05$). Es decir, la aversión fue similar en ambos grupos. Las ratas con kindling en el APM, consumieron menos sacarina (del día 15 al 24, excepto el día 24), que las del grupo OS ($p < 0.05$). Un dato interesante fue que las ratas del grupo OS consumieron significativamente más sacarina ($p < 0.05$) del día 15 al 19 que las ratas del grupo control. Ver Figura 4.8.

CAS EN RATAS CON KINDLING Y SIN KINDLING

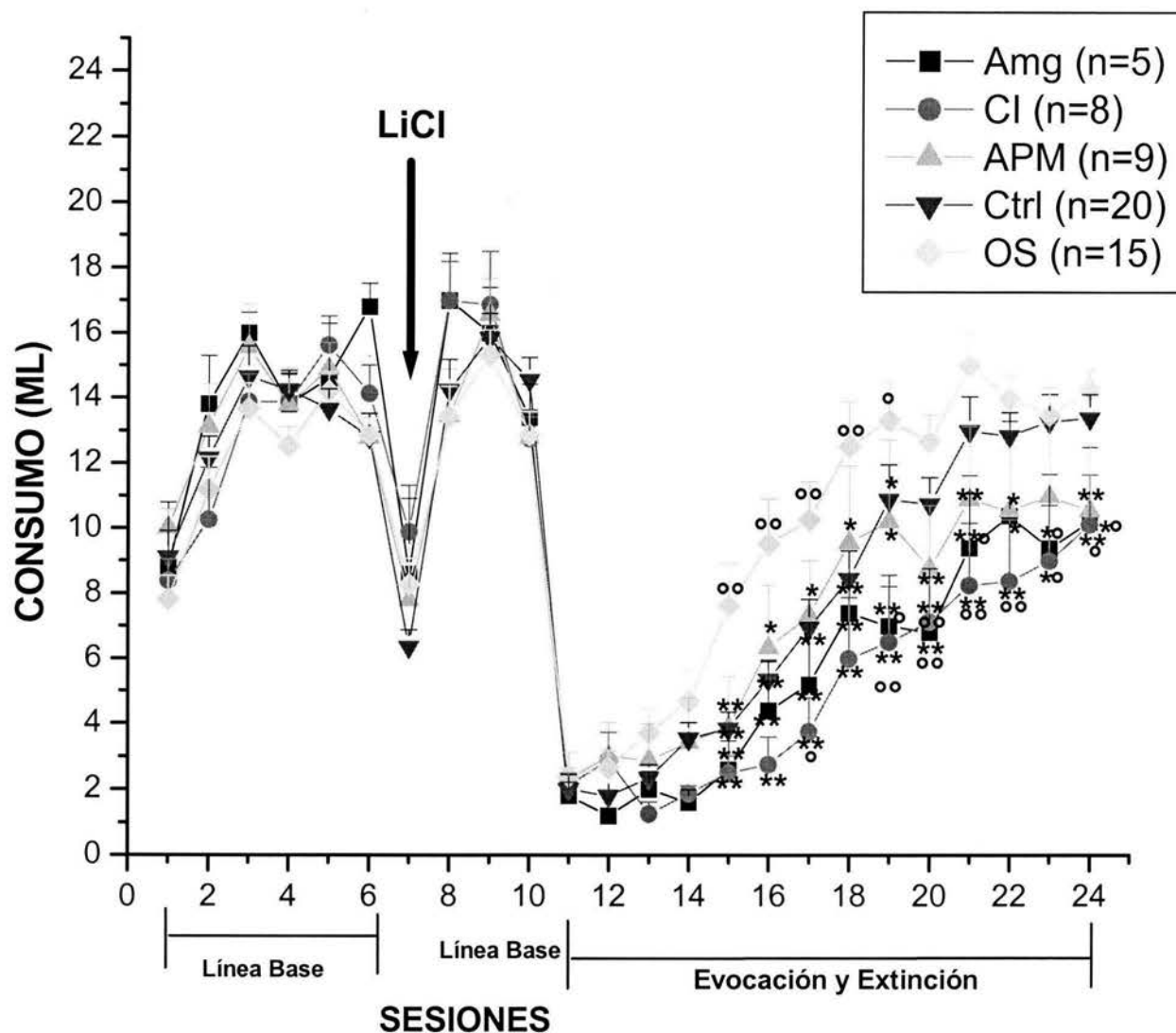


Figura 4.8. Adquisición y extinción del aprendizaje aversivo a los sabores de las ratas implantadas. En el día siete se pareó el Estímulo Neutro (Sacarina) y el Estímulo Incondicionado (LiCl). Los días 8, 9 y 10 son la línea base, a partir del 11 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos: implantados; AMG, amígdala; CI, corteza insular; APM, área preóptica media, OS, otro sitio (ratas en donde el electrodo quedó implantado en otro sitio diferente de AMG; CI o APM) y Ctrl, control. Diferente de OS: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de las Control: ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar

KINDLING Y CRECIMIENTO DENDRÍTICO

De los cortes de tejido impregnados con la técnica Golgi-Cox, se dibujaron las neuronas mejor impregnadas y más ramificadas. Las neuronas que se seleccionaron para la cuantificación, fueron las células estrelladas (ver fig 4.9).

En cada uno de los grupos AMG, CI, APM, Control, sólo se cuantificó en la corteza insular el número de ramas dendríticas de acuerdo a su orden (1^{er}, 2^o orden, etc). Únicamente, se pudieron cuantificar entre 6 y 8 neuronas por cada grupo experimental, debido a que no hubo una buena impregnación.

Utilizando un ANOVA, no se encontraron diferencias significativas (entre cada uno de los grupos: AMG, CI, APM, Control), en el número de ramas dendríticas de primer ($F_{(3,33)}= 0.88$, $p=0.46$), segundo ($F_{(3,32)}= 1.39$, $p=0.27$), tercer ($F_{(3,33)}= 1.45$, $p=0.25$) y cuarto orden ($F_{(3,27)}=0.54$, $p= 0.66$). El número de ramas fue similar en todos los grupos (fig. 4.11). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el número total de ramas dendríticas entre cada grupo ($F_{(3,137)}=0.69$, $p= 0.56$) (fig. 4.12). Con respecto a la longitud total del árbol dendrítico, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,33)}=1.19$, $p= 0.33$) (fig.4.13).

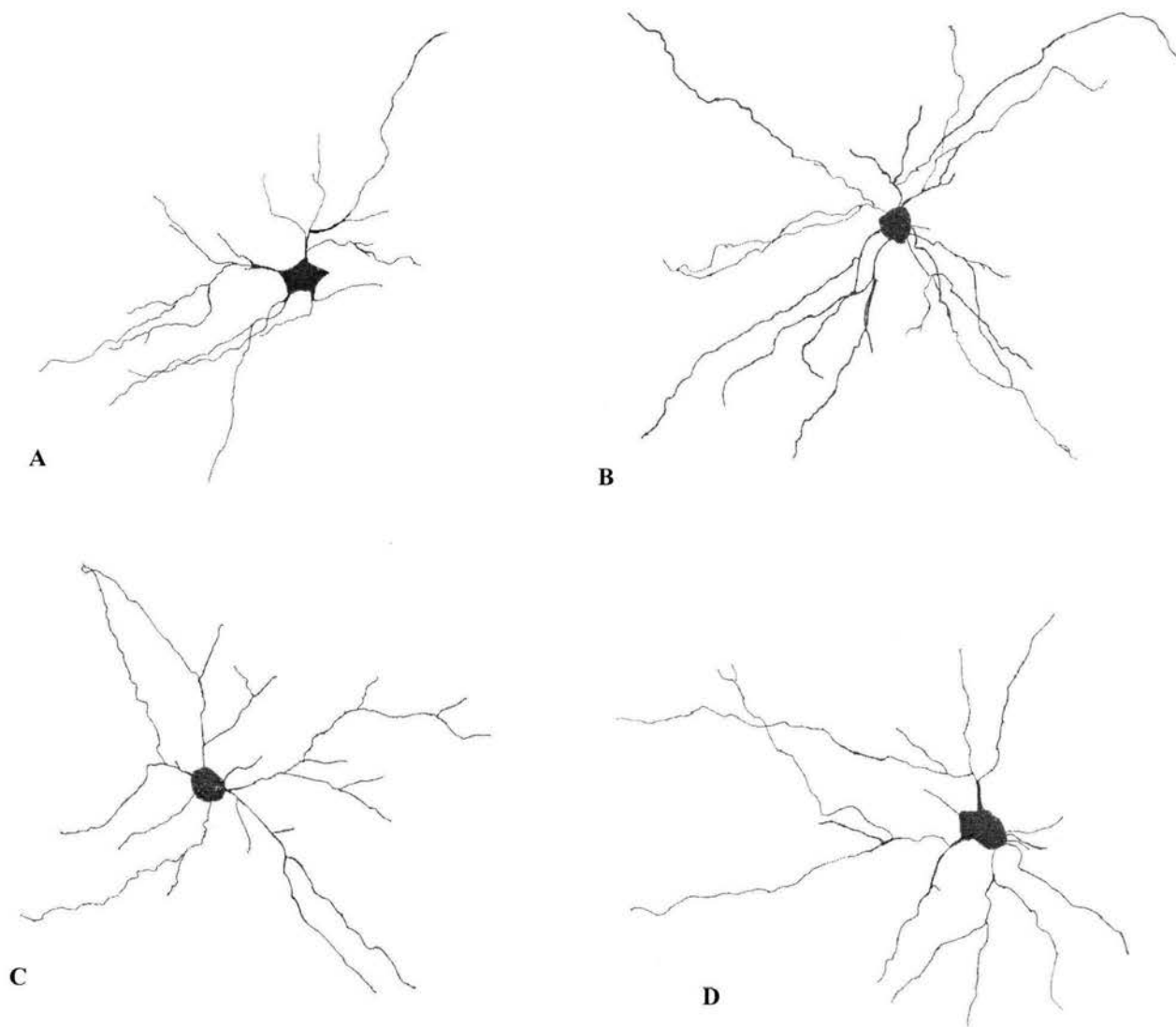


Figura 4.9. Dibujo en cámara lúcida de neuronas estrelladas de la corteza insular. A) Neurona del grupo con kindling en la AMG. B) Neurona del grupo con kindling en la CI. C) Neurona del grupo con kindling en el APM. D) Neurona del grupo Control.

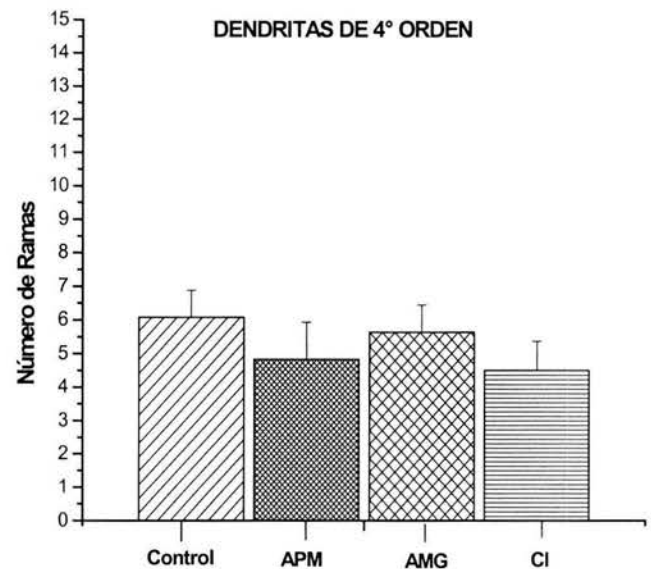
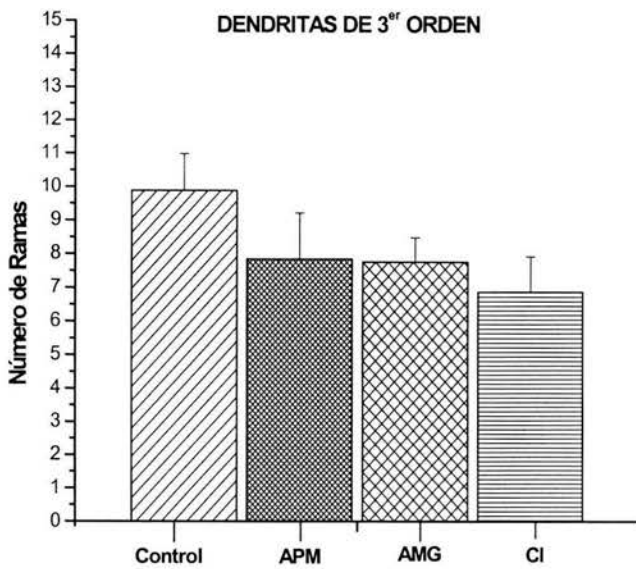
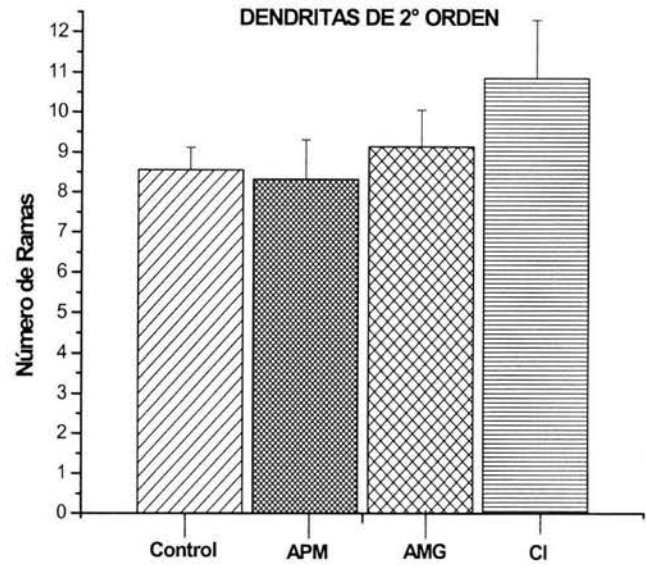
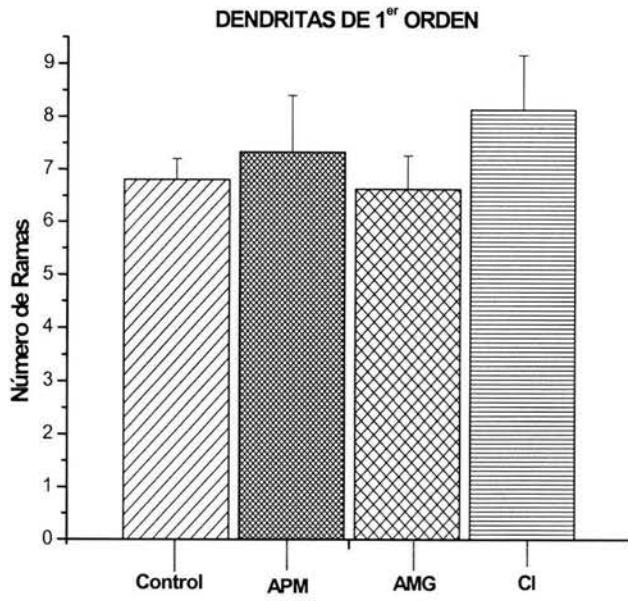


Figura 4.11. Se muestra el número de ramas dendríticas de primer, segundo, tercer y cuarto orden de las neuronas de la CI para cada uno de los grupos. En ninguna de las ramas se encontraron diferencias entre los grupos, $p > 0.05$. Control ($n=16$), APM ($n=6$), AMG ($n=8$) y CI ($n=7$). La “n” se refiere al número de neuronas. Los datos se expresan como media \pm Error estándar.

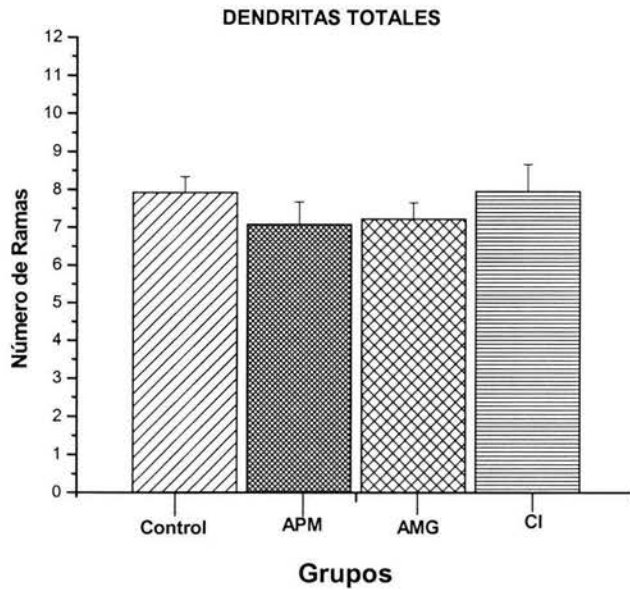


Figura 12. Se muestra el número total de ramas dendríticas de las neuronas de la CI para cada uno de los grupos. En ninguna de las ramas se encontraron diferencias entre los grupos, $p > 0.05$. Control ($n=16$), APM ($n=6$), AMG ($n=8$) y CI ($n=7$). La "n" se refiere al número de neuronas. Los datos se expresan como media \pm Error estándar.

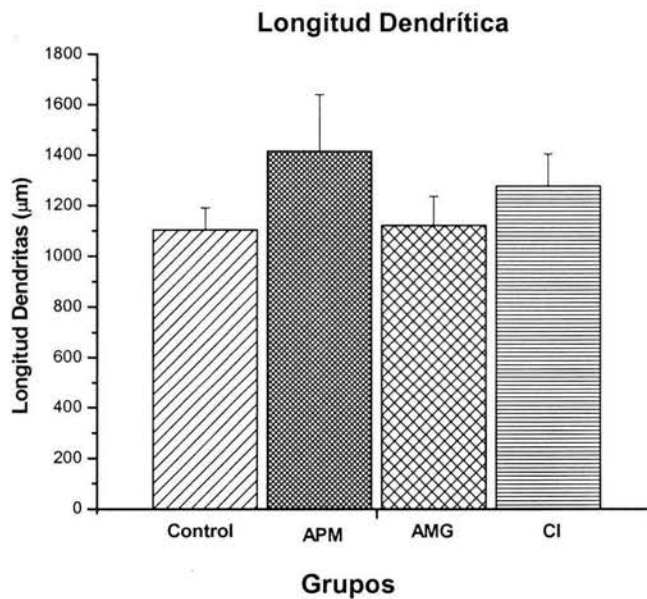


Figura 13. Se muestra la longitud total del árbol dendrítico de las neuronas de la CI para cada uno de los grupos. La longitud dendrítica no varió significativamente entre los grupos, $p > 0.05$. Control ($n=16$), APM ($n=6$), AMG ($n=8$) y CI ($n=7$). La "n" se refiere al número de neuronas. Los datos se expresan como media \pm Error estándar.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

CAS en Ratas Intactas

El patrón de la curva de aprendizaje-extinción en las ratas intactas que fueron sometidas al CAS coincide con lo descrito por varios grupos (García y cols., 1955, 1985; Escobar y Bermúdez –Rattoni 2000; Yamamoto y Fujimoto 1991).

Kindling

En el presente estudio las características electrográficas para cada una de las estructuras estimuladas fueron muy semejantes a las descritas en otros estudios. Por ejemplo, se ha reportado que para la AMG se requieren entre 15 y 18 estímulos para producir la fase 5, la duración máxima de la PD varía entre 70 y 90 segundos y el número total de postdescargas para llegar a la fase 5 está entre 10 y 15 (Goddard y cols., 1969; Joy, 1985; Paredes y cols., 1992; Michael y cols., 1998; Auvergne y cols., 2002). Para el APM, se ha reportado (Goddard y cols., 1969; Paredes y cols., 1992 y Portillo y cols., 2003) que se necesitan entre 24 y 32 estímulos para inducir la fase 5, la duración está alrededor de los 75 segundos, aunque en nuestro estudio observamos una duración máxima de la PD de aproximadamente 55 segundos. El número total de postdescargas para llegar a la fase 5 se ha descrito alrededor de 20, el cual en promedio concuerda con nuestros datos.

Los estudios sobre el kindling en la CI y en consecuencia la descripción de las características electrográficas son escasas. En general de los estudios realizados (Mohapel y cols., 2001, Kodama y cols., 2001) se observa que se requieren entre 9 y 12 estímulos para inducir la fase 5, una duración máxima de la PD de 16 segundos, mientras que el número total de postdescargas fue de 15. En el presente estudio nosotros requerimos de alrededor de 23 estímulos para producir la fase 5 y el número de postdescargas fue de 9. Con respecto a la duración de la PD encontramos que fue de 20 segundos, esto más o menos concuerda con lo descrito por Mohapel y cols., (2001) quienes reportan una duración aproximada de 16 segundos. La CI es una estructura que fácilmente

puede ser "kindleada", sugiriendo tal vez alguna facilitación polisináptica, sin embargo se pudo observar que la duración de la PD en la CI es menor al de la AMG y APM. No hay estudios que indiquen porque la CI exhibe una menor duración de la PD. Puede proponerse que la CI recibe una entrada inhibitoria de neuronas gabaérgicas o una menor entrada de terminales nerviosas que liberen glutamato (Glu). Otra posibilidad es que haya un aumento o disminución en el número de receptores de Glu involucrados en las neuronas "kindleadas". Esta idea proviene de los estudios en donde se ha demostrado que el Glu y GABA están participando en el desarrollo del kindling (revisión en Shoji y cols., 1998).

Kindling y CAS

En general, se ha abordado al kindling como un modelo de epilepsia, por lo que la mayoría de los estudios se han orientado a estudiar las disfunciones o alteraciones del aprendizaje que produce el kindling (para una revisión ver Hannesson y Corcoran, 2000). Sin embargo, el propio Goddard (1969, 1975) describe que aunque el kindling puede ser usado para estudiar la epilepsia, este es un modelo adecuado para estudiar el "engrama" de la memoria a largo plazo o de la plasticidad. Es decir, el kindling establece un engrama en el cerebro, el estado "kindleado" es la manifestación de ese engrama (Morrel, 1991).

Se han descrito como posibles sustratos del desarrollo del kindling la potenciación a largo plazo, la neurogénesis (Scott y cols., 1998, 2000), aumento de la densidad de las espinas dendríticas (Teskey y cols., 2001), "sprouting" de las fibras musgosas del hipocampo y sinaptogénesis (Elmer y cols., 1996; Li y cols., 2002). Por lo tanto, es plausible pensar que si el kindling genera esta serie de cambios plásticos, en lugar de deteriorar la conducta o el aprendizaje y la memoria, puede favorecerla. Los trabajos sobre los efectos plásticos del kindling en la conducta son muy escasos. Aunque existe alguna evidencia al respecto. Portillo y cols. (2003) encontraron que cuando se les inducía el kindling a ratas macho no copuladoras estas empiezan a desarrollar conducta sexual, sugiriendo que el kindling puede provocar cambios permanentes en la conducta.

En el presente estudio demostramos que las ratas con kindling en la AMG y CI consumieron menos sacarina con respecto a las ratas control. El efecto más

sobresaliente se observó en las ratas con kindling en la CI ya que su consumo de sacarina fue mucho menor que las ratas control.

Estos datos concuerdan con los estudios realizados sobre las estructuras que participan en el CAS. Diversos trabajos han demostrado la importancia de la CI en la adquisición y almacenamiento a largo plazo de tareas motivadas aversivamente, como es el caso del CAS (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998, Gutiérrez y cols., 2003). Por ejemplo, se conoce que el bloqueo de los receptores NMDA y muscarínicos en la CI interrumpen el CAS (Naor y Dudai, 1996, Berman y cols., 2000). Otros autores como Berman y Dudai (2001), han descrito que la CI es importante tanto para la formación de la memoria a largo plazo del CAS como para su extinción. Sin embargo, en la CI, la codificación de la memoria a largo plazo del CAS depende de la activación de receptores B-adrenérgicos y muscarínicos, síntesis de proteínas y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); mientras que la extinción depende sólo de la activación de receptores B-adrenérgicos y síntesis de proteínas.

En nuestro estudio observamos que la AMG central (el área de estudio del presente trabajo), al ser estimulada eléctricamente o "kindleada" ejerció casi el mismo efecto sobre el aprendizaje aversivo que la estimulación de la CI. Este resultado es importante mencionarlo ya que se le ha dado un papel primordial a la AMG basolateral (Sakai y Yamamoto, 1999), más que a la AMG central para la formación del CAS. Los trabajos sobre la función de la AMG central durante el CAS son poco claros. Evidencias electrofisiológicas (Yasoshima y cols., 1995) indican que la AMG basolateral muestra un patrón de actividad facilitatorio con estímulos gustativos como la sacarina o sacarosa, mientras que la AMG central exhibe un patrón de actividad inhibitorio con estímulos aversivos tales como la quinina después del CAS. Los autores proponen que la AMG basolateral participaría en la formación del CAS mientras que la AMG central estaría implicada en el reconocimiento del significado del estímulo condicionado.

Sin embargo, estudios como los de Lamprecht y cols. (1997) muestran lo esencial que es la AMG central para la formación del CAS. Observaron que la

inhibición de la síntesis de proteínas y el bloqueo de proteínas de unión a elementos de respuesta al AMPc (proteína de unión a CRE o CREB: cAMP response element-binding protein) en la AMG central interrumpen el CAS. Bahar y cols. (2003) encontraron que el bloqueo de la síntesis de proteínas mediante la anisomicina o el bloqueo (utilizando propanolol) de los receptores B-adrenérgicos en la AMG central interrumpen la adquisición pero no la extinción del CAS. En el caso de la AMG basolateral utilizando los mismos bloqueadores, se encontró que se interrumpe la extinción pero no la adquisición. Los autores concluyen que la AMG central es fundamental para la adquisición y la basolateral para la extinción del CAS.

Se ha propuesto que la AMG basolateral con interacción de otras estructuras corticales, juega un papel importante en modular los procesos de consolidación de la memoria (McGaugh, 2000). Aunque también se ha descrito que es el sitio de almacenamiento para eventos aversivos (Ledoux, 2000). Escobar y cols., (2002) demostraron que la estimulación de alta frecuencia en la AMG basolateral induce una potenciación a largo plazo, facilitando el CAS; pero cuando se bloquean los receptores NMDA en la CI se abolía el CAS. Los autores proponen que la conexión funcional entre la AMG basolateral y la CI tiene una acción moduladora sobre la formación del CAS. En otro estudio (Miranda y cols., 2002) se observó que cuando el cloruro de litio (estímulo incondicionado: **EI**) es inyectado, los niveles de glutamato aumentan en la AMG. En ese mismo trabajo al microinyectar glutamato en la AMG antes de la presentación del EI se lograba inducir el CAS. Por lo tanto se plantea que la AMG basolateral es el sitio de almacenamiento para los eventos aversivos.

Podemos proponer, que la CI es una estructura que modula tanto la formación del CAS como la extinción mediante la interacción con la AMG central (adquisición) y la AMG basolateral (extinción). Sin embargo, faltaría saber qué circuito modula la consolidación. Esta podría ser la propia CI quien podría estar llevando ese proceso. En nuestro estudio observamos que es en la CI donde el aprendizaje aversivo es más notorio. Sin embargo, no podemos saber si es porque estimulamos a una estructura que también está relacionada con la

formación del CAS a largo plazo o porque es una estructura que está participando en la extinción y en este último caso lo que estaría haciendo el kindling es alterar el mecanismo para reaprender y por eso vemos una prolongación en la curva de la extinción.

La extinción no refleja un olvido de lo previamente aprendido, sino más bien se trata de un reaprendizaje (Rescorla, 1996). Dado lo anterior, un problema que se plantea (como ya mencionó para el caso de la CI) es si en realidad el kindling está fortaleciendo el aprendizaje aversivo a los sabores manteniendo por más tiempo lo aprendido, o si más bien el kindling está bloqueando la extinción o la habilidad de reaprender otra nueva información. Para resolver esto, se sugiere en futuros experimentos que después de haber terminado el CAS en las ratas con kindling se vuelvan a someter a estos mismos sujetos a otro CAS y de esta forma podríamos resolver el problema planteado anteriormente: ¿el kindling fortalece el aprendizaje o inhibe el reaprendizaje?.

En otro sentido, es importante mencionar que las ratas del grupo otro sitio mostraron por el contrario una facilitación pero en la extinción, es decir hubo un acortamiento en la curva de la extinción. Es difícil saber exactamente lo que sucedió, porque estos sujetos fueron estimulados en diferentes regiones cerebrales (ej. Estría terminal, hipocampo, parietal, frontal, etc.). Tal vez la sobreestimulación de estructuras aparentemente no relacionadas con el CAS pueden modificar el aprendizaje aversivo, en donde estas estructuras podrían estar afectando el mantenimiento de lo ya aprendido o bien participar en la extinción. De nuestros resultados en el grupo otro sitio, no se puede realizar una distinción porque lo que estamos observando es un efecto del kindling sobre diversas estructuras.

Kindling y Crecimiento Dendrítico

La plasticidad cerebral resulta de cambios en las sinapsis. La formación de nuevas conexiones puede implicar un aumento en las dendritas, espinas dendríticas, axones, glía, vasos sanguíneos, etc. Una de las cosas que se puede inferir es que la plasticidad puede ser evaluada por el estudio de varios aspectos:

medida directa de las sinapsis, medición de arborizaciones dendríticas, axones, espinas dendríticas, glía, capilares, etc. (Kolb, 1995).

En este estudio evaluamos sólo las arborizaciones dendríticas. Para ello empleamos la técnica de Golgi-Cox. Se empleó esta técnica porque permite visualizar morfológicamente si hay o no un cambio en el crecimiento dendrítico y/o axonal (aunque la mejor medición se obtiene con las arborizaciones dendríticas). También porque esta técnica es ideal para evaluar los cambios plásticos que ocurren durante el aprendizaje, ya que en diversos estudios se ha encontrado un incremento en el tamaño de las prolongaciones dendríticas cuando los animales son sometidos a una tarea de aprendizaje o a ambientes enriquecidos, (Greenough y cols., 1985; Wallace y cols., 1992; Kolb y cols., 1995). Sólo se pudieron obtener resultados preliminares ya que únicamente se cuantificaron las neuronas estrelladas de la CI para cada uno de los grupos experimentales (con excepción del grupo otro sitio). De la cuantificación de estas neuronas en la CI no se observó ninguna diferencia ni en la longitud, ni en el número de ramas dendríticas.

Aunque la técnica de Golgi-Cox es apropiada para evaluar los cambios plásticos, está es muy larga y poco consistente ya que en algunas ocasiones las neuronas no se impregnan adecuadamente ("Capricho"). No existe una explicación de estas inconsistencias propias de la técnica (Morest, 1981). Los principales problemas a los que nos enfrentamos fueron los siguientes: 1) el tiempo ya que por esta razón no se pudo cuantificar a todas las estructuras; 2) el "capricho" ya que hubo un lote importante de cortes de tejido que no se lograron impregnar bien. De ahí que sólo pudimos cuantificar a las neuronas estrelladas y sólo a las dendritas.

Podemos mencionar al menos tres explicaciones de la falta de cambios estructurales: 1) Probablemente no encontramos diferencias porque este tipo de neuronas no fueron afectadas por el kindling, sino que fueron otras neuronas las que sufrieron los cambios, por ejemplo: las piramidales. 2) Otra posibilidad es que el número de neuronas cuantificadas es escasa, por lo que se requeriría aumentar la "n". 3) El kindling no afecta el crecimiento dendrítico. Los cambios plásticos que

se han descrito cuando se induce kindling, son principalmente los siguientes: “sprouting” de las fibras musgosas (Elmer y cols, 1996), neurogénesis (Scott y cols., 1998), sinaptogénesis (Li y cols, 2002), aumento en la densidad de las espinas dendríticas (Teskey y cols., 2001) modificaciones de las conexiones sinápticas (Okada y cols., 1993), etc. Ahora bien, de los pocos estudios en donde se han evaluado el crecimiento dendrítico mediante la técnica de Golgi-Cox y microscopía electrónica (Racine y cols., 1975; Goddard y Douglas., 1975 y Teskey y cols., 2001) no se encontraron evidencias sobre cambios en el crecimiento dendrítico. Por lo tanto, también existe la posibilidad de que los efectos producidos por el kindling no se vean reflejados en el crecimiento dendrítico.

De los cambios plásticos provocados por el kindling en el presente trabajo no podemos concluir algo de manera contundente. Lo que sugerimos, es aumentar la muestra para cuantificar un mayor número de neuronas, otra posibilidad es realizar una inmunohistoquímica para GAP-43 y sinaptofisina. Se ha demostrado que estas proteínas se expresan durante la plasticidad. La GAP-43 es una proteína asociada al crecimiento neuronal y está relacionada con procesos de desarrollo y crecimiento. En general se sugiere que la GAP participa en la diferenciación celular durante el desarrollo y en la plasticidad durante la adultez (Benowitz y Routtenberg, 1997). Al parecer la GAP-43 juega un papel importante durante la remodelación sináptica, lo cual es la base de la plasticidad sináptica (Mori y Morii, 2002). Por otro lado la sinaptofisina es una proteína integral de 38-KDa y es un componente de las vesículas sinápticas. Al parecer participa en la formación de nuevas vesículas, en los procesos de exocitosis, como marcador neuronal para las membranas presinápticas, así como marcador funcional para las sinapsis (Bergmann y cols., 1993; Papa y Segal., 1996).

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

El kindling produjo cambios en el condicionamiento aversivo a los sabores, observándose una prolongación en la curva de la extinción, sobre todo en las estructuras implicadas en el CAS: AMG y CI. Sin embargo, no sabemos si el kindling está manteniendo lo previamente aprendido o está bloqueando la extinción. A pesar de que no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos experimentales con respecto al crecimiento dendrítico, es posible que existan. Faltaría aumentar la muestra, evaluar los cambios tanto en la AMG como en la CI, cuantificar otro tipo de neuronas o utilizar una técnica que permita evaluar fenómenos de plasticidad como la Inmunohistoquímica para GAP-43 y sinaptofisina.

REFERENCIAS

- Adamec, R.E. (1999). Evidence that limbic neural plasticity in the right hemisphere mediates partial kindling induced lasting increases in anxiety-like behavior: effects of low frequency stimulation (quenching?) on long term potentiation of amygdala efferents and behavior following kindling. *Brain Research*, 839:133-152.
- Aguirre, E. (1999). Efectos del encendido eléctrico(kindling) en la amígdala y la corteza insular sobre el condicionamiento aversivo a los sabores. Tesis de Licenciatura. Universidad Anahuac
- Akiyama, K . (1998). Activities of protein kinase C in the kindling model epilepsy. En M.E. Corcoran y S.L. Moshé. *Kindling 5*. Plenum Press, New York. pp. 255-265.
- Anisman. H. y McIntyre, D.C. (2002). Conceptual, spatial, and cue learning in the Morris water maze in fast or slow kindling rats: attention deficit comorbidity. *Journal of Neuroscience*, 22:7809-7817.
- Auvergne, R., Lere, C., El Bahh, B., Arthaud, S., Lespinet, V., Rougier, A. y Le Gal La Salle, G. (2002). Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Research*, 954:277-285.
- Bahar, A., Samuel, A., Hazvi, S., Dudai, Y. (2003). The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *European Journal of Neuroscience*, 17:1527-1530.
- Bailey, C.H. (1999). Structural changes and the storage of long-term memory in *Aplysia*. *Canadian Journal Physiology Pharmacology*. 77:738-747.
- Beldhuis, H.J., DeRuitter, A.J., Waes, F.W., Susuki, T. y Bohus, B.(1993) Long and term increase in protein kinase-C and muscarinic in the cerebral

cortex of amygdala-kindled rats -a quantitative immunocytochemical study. *Neuroscience*, 55 : 965-973.

- Bergmann, M., Schuster, T., Grabs, D., Marquese-Pouey, B., Betz, H., Traurig, H., Mayerhofer, A. y Gratzl, M. (1993). Synaptophysin and synaptoporin expression in the developing rat olfactory system. *Developmental Brain Research*. 74:235-244.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Neduva, V. y 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*, 20:7017-7023.
- Berman, D.E. y Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291:2417-9.
- Bermúdez-Rattoni, F., Sánchez, M.A. y Prado, R.A (1989). Learning of external and visceral cue consequences may be subserved by different neuroanatomical substrates. En T. Archer and L. Gören (Eds). *Aversion, Avoidance and Anxiety*. Hillsdale, New Jersey. Cap. 4.
- Bermúdez-Rattoni, F. y McGaugh, J.L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*, 549:165-70.
- Bermúdez-Rattoni, F., Christopher E.O., Escobar, M.L. y Hernández-Echegaray, E. (1995).The role of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behavior. En James L. McGaugh, Bermúdez-Rattoni y Roberto Prado Alcalá. *Plasticity in the central nervous system. Learning and memory*. Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, Mahwah, New Jersey. Cap. 5.
- Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA:lesion studies. In Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F y Yamamoto, T. (Eds),

Conditiones Taste Aversion. Memory of a special kind. Oxford Science Publications, New York, pp. 28-44.

- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998). Conditioned taste aversion memory of a special kind. London: Oxford University Press.
- Chen, S.J., Desai, M.A., Klann, E., Winder, D.G., Sweatt, J.D. y Conn, P.J. (1992). Amygdala kindling alters protein kinase C activity in dentate gyrus. *Journal of Neurochemistry*, 59:1761-17699.
- El-Abhar, H.S. y El-Gawad, H.M. (2003). Modulation of cortical nitric oxide synthase, glutamate, and redox state by nifedipine and taurine in PTZ-kindled mice. *Epilepsia*, 44:276-281.
- Elkins, R.L. (1980). Attenuation of X-ray-induced taste aversions by olfactory-bulb or amygdaloid lesions. *Physiology and Behavior*. 24: 515-521.
- Elmer, E., Kokaia, M., Kokaia, Z., Ferencz, I. y Lindvall, O. (1996). Delayed kindling development after rapidly recurring seizures: relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Research*, 712:19-34.
- Escobar, M.L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852:208-12.
- Escobar, M.L., Alcocer, I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioral Brain Research*, 129:101-106.
- Feasey-Truger, K.J., Kargl, L. y Bruggencate, G. T. (1993). Differential effects kindling on working and reference spatial memory in the rat. *Neuroscience Letters*, 151: 25-28.

- Gagan, S.W., Steven, J., Barnes, J. y Pinel, J.P.J. (2002). Conditioned of a flavor aversion in rats amygdala kindling. *Behavioral Neuroscience*. 2: 347-350.
- Gallo, M., Roldan, G. y Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*, 52: 91-7.
- García, J., Kimeldorf, D.J. y Koelling, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharine resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122: 155-155.
- García, J., Lasiter., P.S, Bermúdez-Rattoni, F. y Deems, D.A (1985). A general theory of aversion learning. *Annals New York Academy of Science*, 443: 8-21
- Geinisman, Y., Toledo-Morrel, L y Morrel, F. (1991). Structural Synaptic substrates of kindling and long term potentiation. En *Kindling and synaptic plasticity*. Frank Morrel (Ed.). Birkhäuser, Boston. pp.124-159.
- Goddard, G.BV., McIntyre, D.C. y Leech, C.K. (1969). A permanent change in brain fuction resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology*. 25: 295-365.
- Goddard, G.BV. and Douglas, R.M. (1975). Does the engram of kindling model the engram of normal long term memory. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 2: 385-394.
- Greenough, W.T., Larson, J.R. y Withers, G.S. (1985). Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motor-sensory forelimb cortex. *Behavioral Neural Biology*, 44:301-314.
- Grill, H.J. y Norgren, R. (1978). The taste reactivity test: mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*, 143: 263-279.

- Grupp, L.A., Linseman, A. y Cappel, H. (1976). Effects of amygdala lesions on taste aversions produced by amphetamine and LiCl. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 4: 451-544.
- Gutiérrez, R., Téllez, L.A. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, 17: 1556-1562.
- Hannesson, D.K. y Corcoran, M.E. (2000). The mnemonic effects of kindling. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 24: 725-751.
- Joy, R.M. (1985). The effects of neurotoxins on kindling and kindled seizures. *Fundamental and applied toxicology*. 5: 41-65
- Kesner, R.P., Berman, F., Burton, B. y Hankins, W.G. (1975) Effects of electrical stimulation of amygdala upon neophobia and taste aversion, *Behavioral Biology*, 13:349-58
- Kiefer, S.W. y Orr, M. R. (1992). Taste avoidance, but not aversion, learning in rats lacking gustatory cortex. *Behavioral Neuroscience*, 106: 140-146.
- Kodama, M., Yamada, N., Sato, K., Sato, T., Morimoto, K. y Kuroda, S. (2001). The insular but not the perirhinal cortex is involved in the expression of fully-kindled amygdaloid seizures in rats. *Epilepsy Research*. 46:169-178.
- Kolb, B. (1995b). Plasticity in the Normal Brain. En B. Kolb (Ed). *Brain Plasticity and Behavior*. Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, New Jersey. Cap. 2.
- Krushel, L.A. and Van der Kooy, D. (1988). Visceral cortex. integration of Senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. *Comparative Neurology*, 270: 39-54.
- Lamprecht, R., Hazvi, S. y Dudai, Y. (1997). cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *Journal of Neuroscience*, 17:8443-8450.

- Langmeier, M. y Mares, J. (1984). Changes in some ultrastructural parameters of cortical synapses in the initial phases kindling. *Physiologia Bohemoslovaca*, 33: 367-375
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23:155-184
- Li, S., Reinprecht, I., Fahnstock, M. y Racine, R.J. (2002). Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex, and entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience*, 115:1221-1229.
- Linden, D.J. y Routtenberg, A. (1989). The role of protein kinase C in long-term potentiation: a testable model. *Brain Research Reviews*, 14:279-296.
- McEarchen., J.C. y Shaw, C. (1996). An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity pathology continuum model. *Brain Research Reviews*, 22: 51-92.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory-a century of consolidation. *Science*, 287:248-51.
- McNamara, R.K., Kirkby, R. D., de Pape G.E. y Corcoran, M. E. (1992] seizures, but not kindling, reversibly impair place learning in 1 maze. *Behavioral Brain Research*, 50: 167-175.
- Michael, M., Holsinger, D., Ikeda-Douglas, C., Cammisuli, S., Ferbinteanu, J., DeSouza, C., DeSouza, S., Fecteau, J., Racine, R.J. y Milgram, N.W. (1998). Development of spontaneous seizures over extended electrical kindling. I. Electrographic, behavioral, and transfer kindling correlates. *Brain Research*, 793:197-211.
- Mikulka, P.J. y Freeman, F.G. (1984). The effect of amygdala-kindled seizures on acquisition of taste and odor aversions. *Physiology and Behavior*, 32: 967-972.
- Miranda, M.I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste

memory formation. Proceedings the National Academic of Science USA, 20:99:11417-11422.

- Mohapel, P., Zhang, X., Gillespie, G.W., Chlan-Fourney, J., Hannesson, D.K., Corley, S.M., Li, X.M. y Corcoran, M.E. (2001). Kindling of claustrum and insular cortex: comparison to perirhinal cortex in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 13:1501-1519.
- Mori, N. y Morii, H. (2002). SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging. *Journal of Neuroscience Research*, 70:264-273.
- Morrel, F. (1991) Introduction: "The legacy of Graham Goddard". En Frank Morrel (Eds) *Kindling and Synaptic Plasticity*. Birkhäuser, Boston. pp. viii-xvi
- Morest, D.K. (1981). The Golgi methods. En Ch. Heym y W-G Forssmann (Eds.). *Techniques Neuroanatomical Research*. Heidelberg, Springer. pp.124-138.
- Moshé, S.L., Sperber, E.F y Albala, B.J. (1991) Kindling as a Model of Epilepsy in Developing Animals. En Frank Morrel (Eds.). *Kindling and Synaptic Plasticity*. Birkhäuser, Boston. pp. 177-194
- Naor, C. y Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioral Brain Research*, 79:61-7.
- Okada, R., Nishizuka, M., Iizuka, R. y Arai, Y. (1993). Persistence of reorganized synaptic connectivity in the amygdala of kindled rats. *Brain Research Bulletin*. 31:631-5.
- Papa, M. y Segal, M. (1996). Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 71:1005-1011.
- Paredes, R.G., Manero, M.C., Haller, A.E., Alvarado, R. y Agmo, A. (1992). Sexual behavior enhances postictal behavioral depression in kindled rats: opioid involvement. *Behavioral Brain Research*, 52:175-82.

- Parent, J.M., Janumpalli, S., McNamara, J. O. y Lowenstein, D.H. (1998). Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neuroscience Letters*, 247:9-12.
- Paxinos, G. y Watson, C.H. (1987). *The brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.
- Paxinos, G. (1995). *Gustatory System..* En George Paxinos. *The rat nervous system*. Academic Press, San Diego. Cap 29.
- Pitkänen, A. (2000). *Connectivity of the rat amygdaloid complex*. En John P. Aggleton. *The Amygdala*. University Press, Oxford. pp. 31-115.
- Phillips, A.G. y Le Piane, F.G. (1980). Disruption of conditioned taste aversion in the rat by stimulation of amygdala: a conditioning effect, not amnesia. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 94: 664-674.
- Portillo, W., Basañez, E. y Paredes, R.G. (2003). Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Research.*, 96:10-14.
- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II motor seizure. *Electroencephalography and Neurophysiology* 32:281-294.
- Racine, R., Tuff, L. y Zaide, J. (1975). Kindling, unit discharge patterns and neural plasticity. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2:395-405.
- Racine, R.J., Adams, B., Osehobo, P., Milgram, N.W. y Fahnestock, M. (1998). Neuronal growth and neuronal loss in kindling epileptogenesis. En M.E. Corcoran y S.L Moshé (Eds.). *Kindling 5*. Plenum Press, New York. pp. 193-209.
- Rashid, K., Van Der Zee, C. E.E.M., Ross, G.M., Chapman, C.A., Stanitz, J; Riopelle, R.J., Racine, R.J. y Fahnestock, M. (1995). A nerve factor peptide

retards seizure development and inhibits neuronal sprouting in a rat model of epilepsy. *Proceedings the National Academic of Science USA*,. 92: 9495-9499.

- Rescorla, R.A. (1996). Preservation of Pavlovian association through extinction. *Journal Experimental Psychology*., 49B, 245-258.
- Riley, A.L. y Tuck, D.L. (1985). Conditioned food aversions: a bibliography. *Annual New York Academic Science*, 443:381-437
- Roldán, G. y Bures, J. (1994). Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research*. 153: 1-26.
- Robinson, G.B., McNeill, A.H. y Reed, G.D. (1993). Comparison of the short- lasting effects of perforant path kindling on radial maze learning. *Behavioral Neuroscience*, 107: 988-995.
- Rosen, J.B., Hamerman, E., Sitcoske, M., Glowa, J.R. y Schulkin, J. (1996). Hyperexcitability: exaggerated fear-potentiated startle produced by partial kindling. *Behavioral Neuroscience*, 110:43-50.
- Rosenblum, K., Meiri M. y Dudai, Y. (1993). Taste memory: the synthesis in gustatory neocortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59: 49-56.
- Sakai, N. y Yamamoto, T. (1999). Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion. *Neuroscience Research*. 135:53-61.
- Scott, B.W., Wang, S., Burnham, W.M., De Boni, U. y Wojtowicz, J.M. (1998). Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neuroscience Letters*, 248:73-76.
- Scott, B.W., Wojtowicz, J.M. y Burnham, W.M. (2000). Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Experimental Neurology*, 165:231-236.

- Shoji, Y., Tanaka, E., Yamamoto, S., Maeda, H. y Higashi, H. (1998). Mechanisms underlying the enhancement of excitatory synaptic transmission in basolateral amygdala neurons of the kindling rat. *Journal of Neurophysiology*, 80:638-646.
- Spears, N.E., Spears, L.P. y Woodruff, M. L. (1995). *Neurobehavioral plasticity: Learning, Development and Response to Brain. Insults*. Hillsdale, New York. Cap 1 y 2.
- Sutula, T. y Steward, O. (1986). Quantitative analysis of synaptic potentiation during kindling of the perforant path. *Journal of Neurophysiology*, 56: 732-746.
- Sutula, T. y Steward, O. (1987). Facilitation of kindling by prior induction of long-term potentiation in the perforant path. *Brain Research*, 420: 109-117
- Sutula, T., He, X.X., Cavazos, J. y Scott, G. (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus by induced abnormal functional activity. *Science*. 239: 1147-1150.
- Teskey, C.G., Hutchinson, J.E. y Kolb, B. (2000). Cortical layer III pyramidal dendritic morphology normalizes within 3 weeks after kindling and dissociated from kindling-induced potentiation. *Brain Research*, 911: 125-133.
- Wallace, C.S., Kilman, V.L., Withers, G.S. y Greenough, W.T. (1992). Increases in dendritic length in occipital cortex after 4 days of differential housing in weanling rats. *Behavioral Neural Biology*, 58:64-68.
- Woldbye, D.P., Bolwing, T.G., Kragh, J. y Jorgensen, O.S. (1996). Synaptic degeneration and remodelling after fast kindling of the olfactory bulb. *Neurochemical Research*, 21: 585-593).
- Yamamoto, T. y Fujimoto, Y. (1991). Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Research Bulletin*, 27: 403-6.

- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y. y Sakai, N. (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. Behavioral Brain Research, 6:2424-2428.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N. y Sakai, N. (1995a). Single UI amygdala after conditioned taste aversion on sonscius rats. Neuroreport, 6: 2424-2428.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N. y Sakai, N. (1995b). C-fos il study of brainstem mechanims of conditioned taste aversion. Abstracts o the fourth IBRO Congress at Kyoto, p. 393.
- Yasoshima, Y., Shimura, T. y Yamamoto, T. (1995). Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats. Neuroreport, 6:2424-2428.
- Yasoshima, Y. y Yamamoto, T. (1997). Rat gustatory memory requires protein kinase C in the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats. Neuroreport, 8:1363-1367.