



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS A LARGO PLAZO DEL KINDLING
SOBRE EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)**

P R E S E N T A :

M. EN C. MARÍA LUCI MÓNICA LÓPEZ VELÁZQUEZ

TUTOR: DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRERO

COMITÉ TUTORAL: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

DR. JORGE LARRIVA SAHD

Campus Juriquilla, Querétaro, 2009.





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

Mil gracias por todo tu gran amor, gran apoyo...y

Por ser mí mejor amiga...

*“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

A AURORA MOLINA

Actriz y Directora

*“Yo no me encuentro a mí mismo cuando más me busco.
Me encuentro por sorpresa cuando menos lo espero”*

Michel Eyquem de Montaigne

PARA MIS AMIGAS Y AMIGOS,

“-¿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.

A LA UNAM
AL CCH SUR
A LA FACULTAD DE PSICOLOGÍA
AL INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Ubi dubium ibi libertas:

Donde hay duda hay libertad

Proverbio Latino

AGRADECIMIENTOS:

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

Al comité Tutorial, por sus comentarios hechos a la presente tesis, a lo largo del Doctorado: Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez y Dr. Jorge Larriva Sahd.

Al Jurado, por sus observaciones realizadas a la presente tesis: Dr. Federico Bermúdez Rattoni, Dra. María Isabel Miranda Saucedo, Dra. Luisa Rocha Arrieta, Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos y Dr. Gabriel Roldán-Roldán.

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

Al Dr. Manuel Salas y al Dr. Mauricio Díaz por su gran apoyo académico, a lo largo de mi Doctorado.

A Leonor Casanova por su apoyo académico-administrativo.

A Carmen Vázquez, Yolanda Orduña y Magdalena Reyes, por la gran ayuda que me dieron para la realización de mis trámites académicos durante todo mi Posgrado.

A Lourdes Lara por toda su ayuda en la Unidad de Videoconferencia.

Al todo el personal del Bioterio del Instituto de Neurobiología por el cuidado y mantenimiento de los animales. Especialmente, al MVZ. José Martín García Servín, por el apoyo en el Bioterio.

Al personal de la Biblioteca por todas las enormes facilidades que me dieron para la recopilación de la información: Ignacio Caballero, Carlos Caballero, Teresa Soledad Medina, Román Pacheco, Ma. Teresa Palafox, Teresita De Jesús Pérez, Crisanta Reséndiz, Ángel Salazar, Rafael Silva.

A Pilar Galarza Barrios por su gran apoyo durante su estancia en la Biblioteca del Instituto de Neurobiología.

Al personal de cómputo: ISC. Omar González, M en C. Alberto Lara y Ramón Martínez.

Al Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, por todas las oportunidades académicas que me brindó en mi formación durante todo el Doctorado.

A CONACYT y DGEP por su apoyo financiero durante todos mis estudios de posgrado.

A la Unidad de Fotografía: Laura Sánchez.

Al personal de Microscopía: Ma. de Lourdes Palma y Elsa Nydia Hernández.

A la Dra. Dorothy Pless por la revisión y correcciones gramaticales de mi artículo en inglés.

A Francisco Camacho, por su ayuda técnica.

A la Sra. Esther por su ayuda en el laboratorio.

Al Sr. García Cors, porque sin él no hubiera podido continuar mis estudios de posgrado, gracias por el gran apoyo.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio: Patricia, Wendy, Arturo, Rebeca, Leticia, Isadora, Edwards, Casandra, Carlos, Issel y Emilio.

A todos mis compañeros y amigos del CCH-SUR por compartir nuestros ideales de un mundo mejor.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Psicología.

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

A mis amigas: Verónica, Leticia, Guadalupe, Lizzette, Montserrat y Olga.

A mis roomates: Carolina y Nela.

A mis tías: Ofelia y Oliva.

A mi tío Enrique.

A mi tía Beatriz.

ÍNDICE

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 1. KINDLING (ENCENDIMIENTO ELÉCTRICO).....	15
1.1 Características generales	15
1.2 Plasticidad y kindling.....	18
1.2.1 Definición de plasticidad	18
1.2.2 Kindling como fenómeno de plasticidad	19
1.3 Modificaciones neuronales asociadas al kindling	20
1.3.1 “Gemación”	20
1.3.2 Modificaciones en las sinapsis	21
1.3.3 Neurogénesis	22
1.3.4 Control Glial	24
1.3.5 Factores neurotróficos y genes de expresión inmediata	25
1.3.6 Efectos neuroprotectores del kindling	27
1.4 GAP-43	29
1.4.1 Características generales de GAP-43	29
1.4.1 GAP-43 y su relación con el kindling	31
1.5 Sinaptofisina	32
1.5.1 Características generales de la sinaptofisina	32
1.5.2 Sinaptofisina y su relación con el kindling	33
1.6 Kindling y conducta	34
1.6.1 Interrupción del aprendizaje y memoria.....	34
1.6.2 Efectos no amnésicos del kindling.....	36
1.6.3 Otros efectos del kindling	38
CAPÍTULO 2. MODELO DE ESTATUS EPILEPTICUS INDUCIDO POR ÁCIDO KAÍNICO	41
2.1 Receptores de glutamato	41
2.2 Receptores de kainato	41
2.3 Características generales	42
2.4 Mecanismos y acciones de los receptores de kainato en la excitabilidad	43
CAPÍTULO 3. CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES.....	46
3.1 Características generales	46
3.2 Neuroanatomía y fisiología del CAS.....	48
3.2.1 Información gustativa.....	48
3.2.2 Información visceral.....	49
3.2.3 Estructuras de integración visceral y gustativa	51
3.2.3.1 Núcleo del tracto solitario	51
3.2.3.2 Núcleo parabraquial	52
3.2.3.3 Amígdala	54
3.2.3.3.1 Amígdala central	54
3.2.3.3.2 Amígdala basolateral	58
3.2.3.4 Corteza insular	64
3.3 Algunas anotaciones del CAS	70
3.4 Efectos de la estimulación eléctrica en el CAS	72
CAPÍTULO 4.	75
4.1 Planteamiento y justificación del problema.....	75
4.2 Objetivos generales.....	76

4.3 Hipótesis generales	76
CAPÍTULO 5. MÉTODO GENERAL.....	78
5.1 Sujetos	78
5.2 Diseño	78
5.3 PROCEDIMIENTO:	78
5.3.1 Cirugía	78
5.3.2 Kindling	79
5.3.2 CAS.....	80
5.3.3 Análisis estadístico.....	80
CAPÍTULO 6. EXPERIMENTOS 1 y 2 (ANÁLISIS DEL KINDLING)	81
6.1 MÉTODO.....	81
6.2 RESULTADOS	81
6.3 DISCUSIÓN.....	87
CAPÍTULO 7. EXPERIMENTO 1 (CAS Y KINDLING)	88
7.1 INTRODUCCIÓN.....	88
7.2 OBJETIVOS	89
7.3 HIPÓTESIS	89
7.4 MÉTODO.....	90
7.5 RESULTADOS PARTE A (PRIMER OBJETIVO)	92
7.6 DISCUSIÓN.....	95
7.7 RESULTADOS-PARTE B (SEGUNDO OBJETIVO).....	100
7.8 DISCUSIÓN.....	103
CAPÍTULO 8. EXPERIMENTO 2 (GAP-43 Y SINAPTOFISINA).....	107
8.1 INTRODUCCIÓN.....	107
8.2 OBJETIVO.....	107
8.3 HIPÓTESIS	107
8.4 MÉTODO.....	108
8.5 RESULTADOS-PARTE A.....	111
8.6 DISCUSIÓN.....	115
8.7 RESULTADOS-PARTE B.....	120
8.8 DISCUSIÓN.....	130
CAPÍTULO 9. EXPERIMENTO 3	135
9.1 INTRODUCCIÓN	135
9.2 OBJETIVO	135
9.3 HIPÓTESIS	136
9.4 MÉTODO	136
9.5 RESULTADOS.....	138
9.6 DISCUSIÓN	142
CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES GENERALES.....	146
REFERENCIAS.....	150
ANEXO.....	178

RESUMEN

El kindling es un modelo de plasticidad neuronal que consiste en la administración repetida de estímulos eléctricos subconvulsivos breves y de baja intensidad, aplicados en regiones específicas del cerebro, que eventualmente culminan en convulsiones o crisis generalizadas. Previos estudios han encontrado que el kindling puede favorecer el aprendizaje y la memoria, sin embargo, existe cierta controversia al respecto, ya que paradójicamente se ha encontrado que el kindling produce déficits en el aprendizaje y memoria. Este tipo de controversia ha originado ciertas sugerencias aún no comprobadas, las cuales proponen que el déficit cognitivo depende más bien del intervalo entre la última crisis fase 5 del kindling y la tarea conductual a evaluar.

Por lo tanto, el primer objetivo del presente trabajo, fue evaluar si el kindling favorece o interrumpe el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), 28 días después de la última fase 5 del kindling. El CAS es un paradigma de aprendizaje y memoria, que consiste en asociar un estímulo condicionado o sabor novedoso con un estímulo incondicionado o sustancia que induce un malestar gastrointestinal, en donde esta asociación conduce a una aversión al sabor.

Por otro lado, una característica notable del fenómeno del kindling, es que está asociado a diversos cambios neuronales a corto y/o a largo plazo. Entre los cambios neuronales asociados al kindling, se han reportado modificaciones en la expresión de las proteínas GAP-43 y sinaptofisina (Syp), las cuales se expresan en condiciones de plasticidad neuronal. Ambas proteínas, están relacionadas a diversas funciones tales como, el remodelamiento sináptico y la regulación de la liberación del neurotransmisor. Además, estas proteínas se encuentran

involucradas en el aprendizaje y memoria, por lo que el kindling y el aprendizaje y memoria pueden compartir los mismos mecanismos neuroplásticos.

Estas modificaciones en el kindling, ocurren en ausencia de daño neuronal y/o necrosis, lo cual es diferente al modelo que induce estatus epilepticus por ácido kaínico, ya que una característica notable de este último modelo es la presencia de daño neuronal y/o necrosis.

Un segundo objetivo fue estudiar si hay una relación entre los cambios en el CAS provocados por el kindling y los cambios en el nivel de expresión de las proteínas GAP-43 y Syp. Por último, un tercer objetivo consistió, en evaluar si el modelo del ácido kaínico, el cual induce daño neuronal y/o necrosis cerebral, interfiere el CAS.

Para el primer objetivo, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, a las cuales primero se les estableció kindling completo (3 crisis fases 5). Posteriormente, 28 días después de la última crisis fase 5, las ratas fueron entrenadas en el CAS y luego se les evaluó la intensidad de la aversión al sabor.

Para el segundo objetivo, otro grupo de animales se les desarrollo kindling completo e igualmente 28 días después de la última crisis fase 5, las ratas fueron entrenadas en el CAS y luego se les evaluó la intensidad de la aversión al sabor. Posteriormente, los cerebros de los animales fueron procesados para la inmunohistoquímica contra GAP-43 y Syp.

Para el tercer objetivo, ratas macho de la cepa Wistar fueron inyectadas con ácido kaínico para inducirles estatus epilepticus. Dos semanas después del tratamiento de ácido kaínico fueron entrenadas en el CAS luego se les evaluó la intensidad de la aversión al sabor.

Los resultados mostraron que los sujetos con kindling de la corteza insular (CI) y de la amígdala central (AMGc) tienen una mayor aversión al sabor con respecto al grupo sham y a los sujetos con kindling del APM. Las estructuras relacionadas con el aprendizaje aversivo al sabor, AMGc y CI, de los animales con kindling y entrenados en el CAS, mostraron una menor inmunoreactividad a GAP-43 y Syp con respecto a los sujetos sham, mientras que los sujetos con kindling en área preóptica medial (APM) y entrenados en el CAS, mostraron una mayor inmunoreactividad a GAP-43 y sin cambios en el nivel de expresión de Syp. Con respecto a los sujetos tratados con ácido kaínico, tanto en el primer como en el segundo CAS presentaban deficiencias en el aprendizaje aversivo. Sobre todo en el segundo CAS, se vio una completa interrupción del CAS.

Nuestros datos del presente trabajo, nos sugieren que el kindling en CI y AMGc probablemente esté facilitando el aprendizaje aversivo. Estos datos plantean la posibilidad de que la disminución en los niveles de expresión de GAP-43 y Syp, que fue observada en los sujetos con kindling de la AMGc y CI, está posiblemente relacionada con procesos de reorganización neuronal. En el caso de los sujetos tratados con ácido kaínico, sus deficiencias en el CAS estuvieron posiblemente relacionadas al daño neuronal provocado por el ácido kaínico. Estos modelos tienen efectos conductuales diferentes, ya que los procesos neuronales asociados en cada uno de ellos son distintos.

INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades fundamentales del sistema nervioso central es la capacidad para cambiar, ajustarse o adaptarse durante el desarrollo y la vida adulta. Esto le permite al cerebro responder a los cambios internos y externos del organismo (Kolb 1995b). Esta capacidad puede ser reflejada por modificaciones en la eficacia sináptica así como por cambios morfológicos tales como, la formación de nuevas conexiones, crecimiento de axones y dendritas, etc. (Citri & Malenka 2008; Kolb 1995a; Ming & Song 2005; Purves et al. 2001).

El kindling está asociado a una enorme variedad de cambios neuronales tanto estructurales como funcionales, por lo que se ha propuesto como un modelo de plasticidad.

Algunos cambios neuronales observados en el kindling también se han visto que ocurren en procesos como el aprendizaje y la memoria. Por ejemplo, en ambos fenómenos se han encontrado modificaciones en los niveles de expresión de la GAP-43 y Syn. Esto hace que el kindling sea útil para evaluar diferentes eventos neuroplásticos, así como para estudiar su relación con procesos de aprendizaje y memoria.

En el presente trabajo, evaluamos los efectos del kindling sobre una tarea de aprendizaje y memoria. También evaluamos si algunos cambios neuronales asociados al kindling (modificaciones en los niveles expresión de las proteínas GAP-43 y Syp) están relacionados con sus efectos sobre el aprendizaje y la memoria. Para ello, se utilizó una tarea llamada condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), la cual ofrece ventajas sobre otras tareas de aprendizaje y memoria, entre las que podemos mencionar: 1) el sabor (el estímulo condicionado: EC) es fácilmente asociado con el malestar gastrointestinal (el estímulo

incondicionado EI), después de un sólo apareamiento entre el EC y el EI; 2) una fuerte aversión al sabor puede ser provocado, incluso si el retardo entre EC y el EI es muy grande (citado en Schafe et al. 1995b); 3) se conocen, las vías neuronales y estructuras implicadas en su formación.

En los siguientes capítulos, se describieron 1) algunos antecedentes generales del kindling y su relación con los procesos de plasticidad neuronal; 2) aspectos generales del CAS y su relación con el kindling; 3) algunas características del modelo de estatus epilepticus inducido por ácido kaínico (este modelo únicamente lo usamos para evaluar sus efectos sobre el CAS y compararlo con respecto a los del kindling); 4) y finalmente mostramos los resultados y discusión del presente trabajo.

CAPÍTULO 1. KINDLING (ENCENDIMIENTO ELÉCTRICO)

El potencial de la estimulación eléctrica para inducir crisis fue estudiada por el grupo de Delgado (Alonso-DeFlorida & Delgado 1958; Delgado & Sevillano 1961). No obstante, la importancia de esta observación fue reconocida por Graham Goddard (1969; 1967).

“Los cambios progresivos que resulten de la estimulación eléctrica serán referidos como ‘efecto kindling’” (actualmente sólo es denominado kindling). Este enunciado escrito por Goddard (1969) reflejaba su percepción del fenómeno, como una analogía de “encendido de un fuego” (lighting a fire). El trabajo descrito por Goddard y posteriormente los trabajos de Racine (Racine 1972a; Racine 1972b), formaron las bases para el estudio del kindling¹.

1.1 Características generales

El kindling consiste en estímulos eléctricos subconvulsivos breves y de baja intensidad que son aplicados una o dos veces al día, en regiones específicas del cerebro. Inicialmente la estimulación provoca posdescargas (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

¹ Modelos de epilepsia límbica. Por definición, las crisis de las epilepsias límbicas (epilepsias del lóbulo temporal) deben originarse en el hipocampo o en áreas vecinas del lóbulo temporal (Coulter et al. 2002). Los modelos para estudiar la epilepsia del lóbulo temporal tienen varias características del espectro clínico de las epilepsias límbicas (Coulter et al. 2002). A continuación, se describirán brevemente algunos modelos de las epilepsias límbicas. Modelos de estatus epilepticus. El estatus epilepticus puede ser inducido por al menos dos mecanismos: 1) la administración de una sustancia química convulsionante, como la pilocarpina o el ácido kaínico; 2) la estimulación eléctrica. En estos modelos, el estatus epilepticus puede durar más de una hora. Después del estatus, los sujetos pueden parecer normales por un periodo de varias semanas o meses, al final de este tiempo aparecen las crisis espontáneas, las cuales perdurarán a lo largo de toda la vida del sujeto (para más detalle ver Coulter et al. 2002). Modelos de estimulación eléctrica. El kindling es provocado por estimulaciones eléctricas subconvulsivas y es progresivo, comenzando el primer día con una breve posdescarga que evoluciona, a través del tiempo, con crisis electroencefalográficas de alta frecuencia que duran varios segundos (revisado en Coulter et al. 2002).

en la intensidad y duración de la PD, así como de las crisis conductuales. Es decir, la duración e intensidad de la PD aumenta y su localización se propaga a partir del foco original a otras áreas cerebrales, presentándose alteraciones en la conducta motora que eventualmente culminan en convulsiones generalizadas. Racine (1972b), realizó una clasificación de dichas manifestaciones conductuales, la cual se sigue utilizando. **Fase 1:** Movimientos faciales o masticatorios, cierre del ojo ipsilateral, inmovilidad. **Fase 2:** Fase 1 más cabeceo (nodding) o movimientos oscilatorios de la cabeza. **Fase 3:** Fase 2 más clonus unilaterales de los miembros anteriores seguido por clonus contralateral. **Fase 4:** Fase 3 más levantamiento, clonus bilateral de los miembros anteriores, la rata se yergue y se sostiene con los miembros posteriores. **Fase 5:** Fase 4, levantamiento con pérdida del control y de la postura (en esta fase no hay crisis espontáneas).

Además, las fases 1 y 2 son clasificadas como **fases tempranas** del kindling, la fase 3 se considera como una **fase intermedia**, las fases 4 y 5 como **fases tardías** (revisado en Coulter et al. 2002).

Tradicionalmente varios investigadores consideran el desarrollo de la fase 5 como punto final del kindling (revisado en Kelly 1998; revisado en Moshé et al. 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 de los miembros anteriores con levantamiento y caída. Muchos protocolos de investigación consideran necesario inducir entre tres y cinco fases 5 para decir que **el kindling está completo** (Kelly 1998).

Si a un animal al cual se le desarrolló kindling completo, se le estimula diariamente por varios meses, éste puede presentar crisis espontáneas. Antes de que se desarrollen las crisis espontáneas se presentan diferentes fases (después

de la crisis fase 5) que van progresando hasta desencadenarse las crisis espontáneas. Estas fases, posteriores a la crisis fase 5 fueron descritas por Pinel y Rovner (1978): **fase 6** (repetidas caídas con levantamientos), **fase 7** el sujeto corre rápidamente en círculos y brinca violentamente, **fase 8**, el animal corre en círculos rápidamente, en el cual hay periodos de tonus al comienzo y final de la crisis. Al kindling en donde ocurren eventos más allá de la fase 5 se le conoce como **kindling extendido** (revisado en Coulter et al. 2002).

El kindling parece ser una propiedad casi universal del sistema nervioso (SN) y ocurre en una gran variedad de especies (ranas, lagartos, ratón, rata, conejo, gato y monos). En general, el kindling se desarrolla más rápidamente conforme la escala filogenética desciende (ver tabla 1), por ejemplo, se desencadena más rápidamente en la rata, seguida por el gato y el mono (revisión en Joy 1985). Dentro del sistema nervioso, las estructuras filogenéticamente nuevas parecen menos susceptibles de desarrollar kindling que las estructuras más viejas (revisión en Joy 1985). Para el desarrollo del kindling, también se han observado fenómenos circadianos, por ejemplo, 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 (Freeman 1980).

Tabla 1

<i>Tiempo aproximado necesario para desarrollar crisis kindling (Fase 5)</i>	
Especies	Días
<i>Estimulación amígdala</i>	
rata	8-12
gato	20-30
babuino	60-70
mono	150-200
<i>Estimulación neocortical anterior</i>	
rata	35-40
gato	60-70
babuino	~ 300

Adaptado de Joy (1985).

1.2 Plasticidad y kindling

1.2.1 Definición de plasticidad

Una de las propiedades fundamentales del sistema nervioso central es su plasticidad, esto es, la capacidad para cambiar, ajustarse o adaptarse durante el desarrollo y la vida adulta (Kolb 1995b; Purves et al. 2001). Esto le permite al cerebro responder a los cambios internos y externos del organismo (Kolb 1995b). Esta capacidad para reorganizar o modificar los circuitos neuronales sobre la base de la experiencia, puede ser reflejada por modificaciones en la eficacia sináptica así como por cambios morfológicos tales como, la formación de nuevas conexiones, crecimiento de axones y dendritas, etc. (Citri & Malenka 2008; Kolb 1995a; Ming & Song 2005; Purves et al. 2001)

La plasticidad neuronal es una propiedad general y fundamental del sistema nervioso, la cual está asociada a diversos eventos, como son el aprendizaje, la memoria, la estimulación eléctrica, el ejercicio físico, las hormonas sexuales, el

estrés, los ambientes enriquecidos, las experiencias sensoriales (olfatorias, visuales, etc.) y el daño cerebral. Las modificaciones estructurales y funcionales de los circuitos neuronales, pueden ser el substrato de cada uno de estos eventos (Kolb & Whishaw 1998).

1.2.2 Kindling como fenómeno de plasticidad

A partir de sus primeros estudios Goddard et al. (1969), Goddard y Douglas (1975), propusieron que el kindling es un modelo ideal para estudiar la plasticidad neuronal. Una de las principales razones que dio origen a su propuesta, fue que el kindling provoca cambios permanentes en la función cerebral (Majkowski 1986; McIntyre et al. 2002; Morrel 1991; Weiss et al. 2000). Goddard et al. (1969), demostraron que cada estructura cerebral requiere un número determinado de estímulos para inducir kindling, y cuando este ya quedó establecido y posteriormente se suspende la estimulación eléctrica por tres meses, es menor el número de estímulos para provocar nuevamente el kindling en esas mismas estructuras cerebrales. Esto llevó a Goddard et al. (1969) a suponer que las neuronas que han estado sometidas a una estimulación eléctrica de alguna forma han sufrido un cambio permanente.

El kindling no es solamente un modelo, sino un fenómeno de plasticidad, la cual es una propiedad fundamental de los circuitos neuronales (2004). El kindling provoca una enorme variedad de cambios neuronales a largo plazo y ocurren en ausencia de daño neuronal (Hawrylak et al. 1993; Smith et al. 2005; Tooyama et al. 2002; Tuunanen & Pitkanen 2000).

La ventaja del kindling para estudiar la plasticidad es su persistencia. La elucidación de los mecanismos que contribuyen a la permanencia del kindling o que subyacen a este fenómeno, pueden revelar algunos mecanismos de la

plasticidad neuronal que operan en situaciones normales como la formación de la memoria hasta evolucionar a condiciones patológicas como la epilepsia (Goddard et al. 1969; Goddard & Douglas 1975; Weiss et al. 2000).

Las modificaciones neuronales han sido principalmente evaluadas en el hipocampo, en menor grado en la amígdala, la corteza piriforme, perirrinal, insular y prefrontal., como se verá más adelante.

A continuación describiré algunos fenómenos de plasticidad que subyacen al kindling y enfatizaré sobre todo, aquellos asociados a la plasticidad neuronal estructural o morfológica.

1.3 Modificaciones neuronales asociadas al kindling

1.3.1 “Gemación”

En ratas que habían presentado tres fases 5 del kindling de la vía perforante, Sutula et al. (1988), mediante la técnica de Timm², evaluaron en el hipocampo de estos animales, la gemación de las fibras de las terminales nerviosas. Sutula et al. (1988), encontraron que el kindling induce “gemación” (brotan nuevas terminaciones nerviosas) de las fibras musgosas. Los gránulos de Timm fueron observados hasta 5 meses después de la última crisis fases 5, lo cual sugiere que los efectos del kindling son a largo plazo. En las etapas tempranas del kindling (entre el quinto y sexto día de estimulación), también hubo “gemación” de las fibras musgosas. Cavazos et al. (1991) confirmaron estos resultados, y demostraron que incluso 8 meses después del kindling completo, los gránulos de Timm fueron observados en las fibras musgosas de la región supragranular del giro dentado del hipocampo. Lo cual indicaba un incremento en la gemación de las terminales de las

² Es una técnica histoquímica, que selectivamente marca las terminales sinápticas por su alto contenido de zinc.

fibras musgosas. En el caso de la amígdala, la cantidad de gránulos de Timm fueron aumentando a medida que las crisis se repetían. Estos resultados indicaban que la “gemación” de las terminales nerviosas corría en paralelo junto con el curso del desarrollo del kindling. Además, se sugirió (Cavazos et al. 1991) que estos cambios morfológicos reflejaban la creación de nuevos circuitos recurrentes excitatorios, lo cual podría estar relacionado con la excitabilidad neuronal exacerbada.

1.3.2 Modificaciones en las sinapsis

Diversos estudios, que a continuación se describen, han encontrado diferentes modificaciones en la organización de las sinapsis.

Posteriormente, Cavazos et al. (2003), estudiaron las características ultraestructurales de las fibras musgosas “brotadas” en animales con kindling en la vía perforante. Los resultados mostraron lo siguiente: 1) Los perfiles sinápticos fueron principalmente axoespinosos que axodendríticos, y varias de las sinapsis axoespinosas fueron perforadas; 2) las terminales de las fibras musgosas “brotadas” formaron sinapsis asimétricas excitatorias con las espinas dendríticas de la región supragranular y con el soma de las células de la capa granulosa; 3) en varios casos, los blancos postsinápticos de las sinapsis “brotadas” fueron identificadas como células granulosas, y sólo en un caso, una terminal sináptica “brotada” formó una sinapsis con una interneurona inhibitoria. Los resultados demostraron que las sinapsis asimétricas son el tipo más común que se forma en las terminales de las fibras musgosas, sugiriendo que los circuitos que se originan son principalmente excitatorios.

Geinisman et al. (1998; 1991), utilizando los métodos estereológicos, evaluaron si había cambios en la estructura sináptica del hipocampo de ratas que

habían desarrollado cinco crisis fases 5 del kindling de la vía perforante medial. Los resultados mostraron en el hipocampo, un aumento en la proporción de las sinapsis axoespinosas perforadas, también se observó un aumento en el número de espinas dendríticas de doble cabeza y en las sinapsis perforadas asociadas a ellas. Hawrylak et al. (1993), encontraron un incremento en el número de sinapsis (densidad por área) en el stratum radiatum de CA1, en ratas que habían desarrollado kindling de la vía de las colaterales de Schaffer, y que fueron sacrificados 24 a 48 horas después de alcanzar cinco crisis fases 5. Se ha encontrado (2001; 1999), en la corteza frontal de ratas que han desarrollado kindling del cuerpo calloso, una disminución: en la longitud dendrítica basilar y apical, en la densidad de las espinas y en las ramas dendríticas. Sin embargo, la morfología dendrítica se normalizaba o volvía a su estado basal después de tres semanas de la última sesión kindling. Los autores sugirieron que el kindling puede disminuir transitoriamente el número de contactos sinápticos, pero los contactos que aún permanecen, posiblemente sean más eficaces (Teskey et al. 2001).

1.3.3 Neurogénesis

La neurogénesis (un proceso de generación de neuronas, las cuales provienen de células progenitoras), otro fenómeno de plasticidad, también se ha encontrado asociada al kindling. Los primeros trabajos en describir dicha relación en animales con kindling, fueron de Scott et al. (1998), Parent et al. (1998) y Bengzon et al. (1997). Scott et al. (1998), inyectando bromodeoxiuridina (BrdU)³ a animales que habían desarrollado kindling de la amígdala, encontraron que cuando

³ El BRDU, es incorporado dentro del DNA de las células en división, durante la mitosis, y por lo tanto proporciona un buen marcador para las nuevas células que nacen o para las células en proliferación.

las crisis focales estaban presentes, no se presentaban cambios en la frecuencia de neurogénesis. En contraste, durante las fases tardías (fases 4 y 5) del kindling, cuando las crisis se generalizaron, la proliferación celular en el hipocampo, aumentó aproximadamente entre 75%-140%. En este mismo estudio, utilizando un doble marcaje con un marcador específico de neuronas (TOAD-64) se demostró la presencia de numerosas nuevas neuronas granulares en los animales que habían desarrollado fase 4 o 5 del kindling.

Parent et al. (1998), utilizando los mismos marcadores TOAD-64 y BrdU, demostraron que la proliferación celular aumentó en el giro dentado de ratas que habían experimentado 9 ó más crisis fase 4 ó 5. El doble marcaje reveló, que varias de las nuevas células estaban diferenciadas dentro de células granulares dentadas. Recientemente, Smith et al. (2005), encontraron en ratones con kindling de la amígdala, un aumento en la proliferación celular del hipocampo y que además estos cambios no estaban asociados a daño neuronal. Otro estudio (Scott & Burnham 2006), examinó los efectos del kindling sobre la sobrevivencia de las neuronas jóvenes. Para evaluar esto, las ratas que habían desarrollado kindling de la vía perforante, fueron sacrificadas un mes después de la inducción del kindling para la realización de una inmunohistoquímica de doble marcaje, BrdU y NeuN (un marcador exclusivo de neuronas). Los resultados mostraron un incremento de neuronas (128%) con doble marcaje en la capa de las células granulares, sin embargo el número de células con doble marcaje no estuvo correlacionado con la severidad de la crisis. Scott y Burnham (2006), hicieron una propuesta interesante: “el kindling aumenta la sobrevivencia de las nuevas neuronas en el giro dentado de la rata, lo cual puede reflejar las acciones de un mecanismo dependiente de actividad, fenómeno que normalmente está implicado en el aprendizaje y la

memoria". Otros estudios (Bengzon et al. 1997) han encontrado que una estimulación eléctrica subconvulsiva (la cual con el tiempo, después de varias estimulaciones eléctricas es capaz de desencadenar kindling), es suficiente para inducir neurogénesis en el hipocampo.

1.3.4 Control Glial

Los astrocitos forman una relación muy estrecha con las sinapsis del sistema nervioso central del adulto, en donde ayudan a regular las concentraciones de los iones y neurotransmisores. Sin embargo, recientes estudios (para una revisión ver Ullian et al. 2004), entre otras funciones, han encontrado que los astrocitos ejercen un poderoso control sobre el número de sinapsis del sistema nervioso central (regulan la sinaptogénesis). Además son esenciales para la función postsináptica y necesarios para la estabilidad y mantenimiento sináptico. También, los astrocitos están implicados en los cambios sinápticos funcionales y estructurales dependientes de actividad (Ullian et al. 2004). Es decir, no son únicamente células de soporte, sino son células que activamente controlan la plasticidad funcional y estructural durante el desarrollo y la vida adulta (Ullian et al. 2004).

Uno de los cambios que caracterizan al kindling es la proliferación de astrocitos (Adams et al. 1998; Hawrylak et al. 1993; Tooyama et al. 2002). Hawrylak et al. (1993), demostraron que el kindling de la vía colateral de Schaffer, en las fases tempranas del kindling, provocaba una hipertrofia de los astrocitos en el stratum radiatum de CA1. Por otro lado, la densidad de las sinapsis degeneradas o dañadas, las cuales podrían inducir gliosis, no fueron significativamente diferentes entre los animales control y kindling, lo cual indicaba que el kindling no estaba relacionado a un proceso de degeneración neuronal. Otros autores (Khurgel & Ivy 1996) han encontrado que las crisis inducidas por el kindling, provocan un

incremento en la proliferación y una prominente hipertrofia de astrocitos en el hipocampo, la amígdala y la corteza piriforme, la cual está acompañada por una reorganización del citoesqueleto astrocítico. Vessal et al. (2004) encontraron que tanto, los animales que habían desarrollado la fase 1 del kindling, como los que habían desarrollado kindling completo (Fase 5) de la amígdala, mostraron una gran cantidad de astrocitos en división en la corteza piriforme. También, observaron que el cambio en la morfología de los astrocitos, depende al parecer de la intensidad de la crisis y ocurre desde las fases tempranas del kindling persistiendo por semanas, después de la última crisis. Tooyama et al. (2002), reportaron que los animales con kindling de la vía perforante mostraban astrocitos reactivos en el hipocampo sin presencia de microglia reactiva, indicando que la activación glial no estaba relacionada con procesos degenerativos.

1.3.5 Factores neurotróficos y genes de expresión inmediata

Los factores neurotróficos, tales como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), tienen efectos sobre el crecimiento de las neuritas, la sobrevivencia neuronal, la diferenciación, la síntesis de neurotransmisor, la plasticidad sináptica y la excitabilidad. Diversos estudios (Elmer et al. 1996; Foster et al. 2004; Scharfman 2002), han demostrado que el kindling induce un aumento en la expresión de los factores neurotróficos. Foster et al. (2004), encontraron, dos horas después de la crisis parcial o temprana (fase 2 del kindling), un incremento en la expresión de BDNF en la amígdala ipsilateral (sitio de estimulación), específicamente en el núcleo basolateral y el núcleo cortical posterior; asimismo en la CI, piriforme, orbital e infralímbica. Después de la primera crisis fase 5, se encontró un aumento en la expresión de BDNF no sólo del lado ipsilateral, sino en el lado contralateral de la amígdala (basolateral y cortical

posterior), la CI, piriforme, perirrinal y entorrinal. Los patrones de expresión de BDNF fueron similares, 1, 2 y 6 horas después de la última crisis fase 5. Elmer et al. (1996), demostraron que los animales con kindling rápido⁴, presentaban un incremento en la expresión del ARNm de BDNF y del factor de crecimiento nervioso (NGF), y en los niveles del ARNm de TrkB y TrkC (receptores para BDNF) en las células granulares del giro dentado. Además, se observaron niveles elevados del ARNm de BDNF en la amígdala basolateral, corteza piriforme, CA1 y CA3 del hipocampo, con un incremento máximo a las 2 horas después de la última crisis. Van der Zee et al. (1995) demostraron que la administración intraventricular de anticuerpos contra NGF, retarda el desarrollo de la crisis y bloquea el “sprouting” o “gemación” de las fibras musgosas de la rata adulta.

Sitcoske O’Shea et al. (2000), demostraron que cuando el sitio de estimulación fue la AMGc lateral o la basolateral, los patrones de expresión de c-Fos, NGF1-A y BDNF, en áreas corticales y subcorticales límbicas fueron muy similares en ratas que presentaron la primera crisis clónica del miembro anterior (fase temprana del kindling). Además, encontraron un patrón de expresión de C-fos en un conjunto de estructuras del hemisferio ipsilateral (sitio de estimulación), las cuales fueron las siguientes: el claustrum, la CI y la perirrinal.

Akiyama et al. (2008), evaluaron la expresión de otro gen de expresión temprana, Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) y dos factores de

⁴. En muchos estudios el kindling se induce con una o dos estimulaciones diarias hasta alcanzar las crisis generalizadas fase 5. Por ejemplo, en el hipocampo se requieren alrededor de 3 semanas para alcanzar las crisis generalizadas. En contraste, cuando se administran repetidamente estímulos eléctricos cada 5 minutos, las crisis generalizadas ocurren en pocas horas, a esto se le llama kindling rápido (Elmer et al. 1996).

transcripción: factor de crecimiento nervioso inducible B (NGFI-B) y nur relacionado 1 (Nurr), en ratas que presentaban sólo una postdescarga de la amígdala y en ratas que desarrollaron kindling completo de la amígdala. Los animales con una sola postdescarga, presentaron un aumento en los niveles de expresión del RNAm de Arc y Nurr en la corteza piriforme y en el núcleo medial amigdaloides ipsilateral, mientras que los animales con kindling completo, aumentaron los niveles de expresión del RNAm de Arc y Nurr bilateralmente en las regiones de la corteza piriforme y giro dentado, media o una hora después de la última crisis generalizada, pero regresaron a niveles basales 6 horas después de la última crisis.

1.3.6 Efectos neuroprotectores del kindling

El BDNF puede tener efectos excitatorios o inhibitorios, dependiendo si actúa sobre el neuropéptido Y (NPY) o sobre su receptor tirosina cilasa transmembranal Tipo B (TrkB). El NPY está co-localizado en las interneuronas gabaérgicas, su expresión está regulada por BDNF y este tiene acciones sobre la neurotransmisión de glutamato vía receptores Y_2 , los cuales se localizan en terminales de neuronas glutamatérgicas y de esta forma inhibe la liberación de glutamato (revisado en Morimoto et al. 2004). El sistema BDNF y su receptor TrkB, son los principales reguladores de la transmisión sináptica excitatoria, un rol que ajusta bien con la expresión de BDNF y TrkB en las sinapsis glutamatérgicas (Soule et al. 2006).

El kindling del hipocampo induce un rápido incremento en la expresión del ARNm para el NPY (Bendotti et al. 1993). Reibel et al. (2000) demostraron que el BDNF aplicado en el hipocampo durante la primera semana de la estimulación hipocámpal, retardó la progresión del kindling. Contrariamente, la infusión de oligodeoxinucleótidos antisentido para BDNF, redujo la expresión de BDNF en el

hipocampo y favoreció el desarrollo de la crisis (por ejemplo, la duración de la postdescarga fue mayor). La infusión crónica de BDNF incrementó la expresión del NPY en el hipocampo. Finalmente la infusión crónica del NPY retardó la progresión del kindling hipocampal, mientras que los anticuerpos anti-NPY favorecieron el desarrollo de la crisis. Sus resultados sugieren que el incremento en la expresión de BDNF puede constituir un mecanismo neuroprotector para contrarrestar la exacerbada excitabilidad (Reibel et al. 2003).

Algunos autores (Kelly & McIntyre 1994; Penner et al. 2001), han descrito otro tipo de efecto neuroprotector que resulta interesante resaltar. A sujetos que previamente habían desarrollado kindling se les provocó estatus epilepticus inducido por ácido kaínico, esto resultó en una reducción del daño neuronal inducido por ácido kaínico. Estos datos abren la posibilidad de que el kindling protege del daño neuronal. Probablemente, no será raro observar este fenómeno de neuroprotección, porque como se describió anteriormente durante el kindling se expresan factores neurotróficos, los cuales pueden proteger del daño inducido por fármacos como el ácido kaínico (1994; Penner et al. 2001).

La plasticidad inducida por las crisis o por el kindling, muestra propiedades bidireccionales (Sutula 2004): 1) cambios neuronales que contribuyen a la exacerbada excitabilidad neuronal; 2) cambios neuronales que pueden proteger de la excitabilidad o del daño neuronal.

Diversas proteínas están asociadas al kindling (Scharfman 2002), como la GAP-43 (Elmer et al. 1996) y la Syp (Li et al. 2002). Ambas proteínas, están asociadas a diversas funciones como, el remodelamiento sináptico y la regulación de la liberación del neurotransmisor (Benowitz & Routtenberg 1997; El Far & Betz 2002; Valtorta et al. 2004). Estas proteínas al encontrarse involucradas tanto en el

kindling como en los procesos de aprendizaje (Holahan et al. 2007; Routtenberg et al. 2000), plantean la posibilidad de que ambos fenómenos pueden compartir los mismos mecanismos. Por lo tanto, a continuación describiré, el papel funcional tanto de la GAP-43 y la Syp, así como los trabajos que demuestran la relación entre estas proteínas y el kindling.

1.4 GAP-43

1.4.1 Características generales de GAP-43

La GAP-43 o proteína asociada a crecimiento (growth-associated protein-43), es una proteína ácida de membrana de 43 kilodaltons⁵ (kD). Es el principal sustrato de la proteína cinasa C y sufre un cambio persistente en la fosforilación durante la potenciación a largo plazo. En los cerebros de ratas en desarrollo, el principal componente de las membranas del cono axónico en crecimiento, es la GAP-43.

En el adulto, la GAP-43 es abundante en las membranas sinápticas de los axones de las terminales maduras y juega un papel clave guiando el crecimiento de axones, modulando la formación de nuevas conexiones y la liberación del neurotransmisor (para más detalle ver Benowitz & Routtenberg 1997; Skene 1989; Skene et al. 1986).

La GAP-43 primero se asocia con el compartimiento trans-Golgi de la neurona y luego es transportada rápidamente hacia el axón a través de vesículas membranales. Inicialmente, este transporte ocurre dentro de cada proceso de la célula, pero con el establecimiento de la polaridad celular, la proteína llega a ser

⁵ Nos podemos referir a la masa de una proteína, la cual se simboliza en unidades de daltons: un dalton equivale a una unidad de masa atómica. Una proteína con un peso molecular de 50000 g mol⁻¹ tiene una masa molecular de 50000 daltons o 50 kD (Berg et al. 2008)

transportada selectivamente hacia el axón (para más detalle Benowitz & Routtenberg 1997).

Las variaciones regionales en los niveles de GAP-43 son particularmente notorias en la neocorteza, tanto en humanos, como en primates no humanos, (revisado en Benowitz & Routtenberg 1997). En el cerebro de la rata, el ARNm y la proteína GAP-43, es abundante en regiones límbicas y asociativas. Sin embargo, está presente sólo en bajos niveles en las áreas somatosensorial ascendente y en áreas involucradas en el control motor (Benowitz et al. 1988).

Esta proteína, ha sido ampliamente estudiada por su relación en el remodelamiento de redes neuronales, lo cual ha originado el estudio sobre su participación en procesos cognoscitivos, como el aprendizaje y la memoria (Holahan et al. 2007; Routtenberg et al. 2000). Por ejemplo, Holahan et al. (2007) encontraron en ratones transgénicos que sobreexpresan moderadamente GAP-43, mejoran su memoria en una prueba de laberinto acuático. Sin embargo, ratones transgénicos que sobreexpresan excesivamente GAP-43, puede producir una excesiva gemación neuronal o “neuroplasticidad sobrecargada”, lo cual conduce a eventos degenerativos e hipertróficos neuronales que culminan en una disfunción de la memoria (2007)

Se ha propuesto que la GAP-43 juega un papel esencial en la potenciación a largo plazo (LTP: Long-term potentiation⁶), la cual es considerada un fenómeno de plasticidad sináptica. Routtenberg et al. (2000), sugirieron que la proteína cinasa C (PKC, protein kinasa C) al activarse por señales retrógradas postsinápticas (por ejemplo, óxido nítrico) dependientes de NMDA, conduce a la fosforilación de la

⁶ LTP es un aumento en la eficacia sináptica inducida por estímulos de alta frecuencias.

GAP-43, ésta fosforilación al parecer podría afectar la liberación del neurotransmisor y al crecimiento de la terminal nerviosa y por lo tanto, es posible que los cambios de fosforilación que ocurren durante la LTP, puedan ayudar a las modificaciones de corta duración en la transmisión del neurotransmisor y a los cambios de larga duración en la estructura sináptica (para más detalle ver Benowitz & Routtenberg 1997). La fosforilación es normalmente transitoria en respuesta a señales que depolarizan la membrana, pero en el caso del LTP, una señal generada en la célula postsináptica cruza la sinapsis quizá para sinergizar con otros efectores (por ejemplo, diacilglicerol, Ca^{2+}), lo cual conduciría a una fosforilación más persistente. La fosforilación sobre ser41 provocaría que la CaM (calmodulina) se disocie de la proteína, permitiendo quizá que GAP-43 influya en la organización del citoesqueleto (para más detalle ver Benowitz & Routtenberg 1997).

1.4.1 GAP-43 y su relación con el kindling

Sólo pocos estudios han evaluado la relación entre el kindling y la GAP-43. Bendotti et al. (1993) fueron los primeros en describir, que el kindling del hipocampo inducía un incremento en la expresión del ARNm de GAP-43. Ellos encontraron en ratas sacrificadas dos días después de la fase 2 del kindling, un aumento en los niveles del ARNm de GAP-43 en las neuronas piramidales de CA3 y en las neuronas polimórficas hilares del giro dentado, Estos cambios no se observaron cuando los sujetos presentaron la fase 5 del kindling. Los autores propusieron que la remodelación sináptica requiere una nueva síntesis de GAP-43, lo cual puede ocurrir tempranamente durante el curso del kindling y que sería estabilizada en la fase 5. Debido a que las neuronas piramidales de CA3 dan origen a proyecciones que van hacia las regiones de CA1 y al subiculum vía el

sistema colateral de Schaffer, el cual usa glutamato como neurotransmisor, es posible sugerir que el incremento en la expresión de GAP-43 en las neuronas piramidales de CA3 sea una forma de facilitar la liberación glutamatérgica durante el desarrollo del kindling (Bendotti et al. 1993). Posteriormente, Dalby et al. (1995) evaluaron la expresión inmunocitoquímica de GAP-43 en animales con kindling de la vía perforante. Subsecuente al kindling, la inmunoreactividad de GAP-43 aumentó en la capa molecular interna y externa de la fascia dentata, y en el stratum molecular lacunosum de CA1. Por otro lado, Elmér et al. (1996), encontraron un marcado incremento en la expresión del ARNm de GAP-43 en sujetos con kindling rápido en el hipocampo ventral. La expresión máxima del ARNm de GAP-43 en la amígdala basolateral y en la corteza piriforme, se observó de 12 a 24 horas después del kindling.

1.5 Sinaptofisina

1.5.1 Características generales de la sinaptofisina

La sinaptofisina (Syn) es una proteína integral de membrana de 38kD y es un componente de las membranas de las vesículas presinápticas de las neuronas del cerebro, médula espinal y retina, así como de las uniones neuromusculares. También se encuentra en la médula adrenal (Jahn et al. 1985; Wiedenmann & Franke 1985).

Se han propuesto, al menos 5 distintas funciones de la Syp, (revisado en El Far & Betz 2002; Valtorta et al. 2004): 1) puede ser parte de un componente del poro de fusión (la fusión de la vesícula ocurre vía la formación de un poro de fusión), el cual se define como una estructura que une dos membranas opuestas. 2) posiblemente sea esencial en la regulación de la liberación del neurotransmisor (por ejemplo, microinyecciones de anticuerpos de Syp dentro de las neuronas

motoras bloquean la neurotransmisión neuromuscular). 3) se ha planteado la posibilidad de que juegue un papel clave en la biogénesis de la vesícula sináptica. De esta manera, la estructura politópica de la Syp y la capacidad que tiene para formar oligómeros puede promover la curvatura de la membrana y de esta forma facilitar los brotes de las vesículas desde la membrana donante durante la biogénesis. El efecto de la Syp durante la biogénesis de las vesículas, puede ejercerse tanto a nivel de la red trans-Golgi, donde se originan los precursores de las vesículas sinápticas, como a nivel de la terminal nerviosa, donde se generan las vesículas. 4) probablemente participe en el reciclaje de las vesículas sinápticas. 5) la Syp posiblemente regule la formación de la sinapsis.

Con respecto a su participación en procesos cognitivos, se le ha relacionado con el aprendizaje y la memoria (Mokin et al. 2007; Nithianantharajah & Murphy 2008). Recientemente Nithianantharajah y Murphy (2008), encontraron un incremento en los niveles de expresión de la Syp en el núcleo basolateral de la amígdala en animales que habían sido entrenados en una tarea de aprendizaje, llamada “fear conditioning” o condicionamiento del miedo. En cambio, los sujetos que no habían aprendido (grupo control), no presentaron un aumento en los niveles de Syp.

1.5.2 Sinaptofisina y su relación con el kindling

Pocos estudios han evaluado la relación entre la Syp y el kindling.

Hinz et al. (2001), mostraron que dos días después de la última crisis fase 5 del kindling, la cantidad relativa del complejo Syp-sinaptobrevina obtenida por inmunoprecipitación de las membranas hipocámpales, aumentó dos veces con respecto a los controles. Este complejo modula las interacciones de las proteínas vesiculares (Hinz et al. 2001), entonces el incremento en la interacción de este

complejo, debido a la actividad sináptica sostenida del kindling, podría modular la eficacia sináptica a nivel del sitio presináptico, y esto posiblemente mantenga las descargas de alta frecuencia e implique cambios en la regulación de las proteínas sinápticas.

Li et al. (2002), reportaron un incremento significativo en la expresión de la Syp en el stratum radiatum de CA1 y en el stratum lucidum/radiatum de CA3, el hilo, la capa molecular interna del giro dentado y la capa II/III de la corteza piriforme, pero no se encontraron cambios significativos en la capa II/III de la corteza entorrinal; esto fue observado 28 días después de la última estimulación kindling. Los cambios se observaron no sólo en el hipocampo sino en otras regiones cerebrales.

En las secciones anteriores se describieron algunos cambios neuronales asociados al kindling. Sin embargo, los efectos del kindling también repercuten sobre la conducta, por lo tanto, en el siguiente capítulo describiré algunos de estos, sobre todo me centraré en los efectos sobre el aprendizaje y la memoria.

1.6 Kindling y conducta

1.6.1 Interrupción del aprendizaje y memoria

Varios estudios han descrito que el kindling provoca un deterioro en el aprendizaje y la memoria (para mayor detalle ver Hannesson & Corcoran 2000). Así, el kindling de la amígdala interfiere en la memoria de referencia, memoria de trabajo y en la atención, durante una tarea de laberinto acuático (Anisman & McIntyre 2002). Gilbert et al. (2000) investigaron los efectos de las crisis hipocámpales sobre la ejecución espacial en un laberinto de Morris en las ratas. Entre 25 y 45 minutos antes de la prueba en el laberinto acuático, se provocaron crisis por estimulaciones de CA1 del hipocampo dorsal. Ellos encontraron que las

crisis de CA1 interrumpen significativamente la ejecución espacial en el laberinto acuático, tanto en la adquisición como en la retención. En otro estudio (Hannesson et al. 2001a), las ratas que desarrollaron kindling del hipocampo dorsal (tres fases 5) fueron entrenadas y evaluadas, 7 días después de la última fase 5, en una tarea de laberinto elevado, en un campo abierto circular, en un campo abierto de exploración de objetos y en una tarea de laberinto acuático, con la finalidad de evaluar conductas relacionadas con la actividad, ansiedad, memoria de reconocimiento de objetos y cognición espacial. El kindling interrumpió la memoria espacial y provocó un aumento en las conductas relacionadas a la actividad. Las otras tareas no fueron afectadas. Los datos parecen indicar que el kindling del hipocampo dorsal, interrumpe sólo las funciones mediadas por esta estructura. En otro estudio, Hannesson et al. (2001b), estimularon a ratas en el hipocampo dorsal hasta producirles kindling completo o fase 5. Posteriormente, las ratas fueron entrenadas y evaluadas, de 7 a 28 días después de la última estimulación kindling, en una tarea para medir discriminación de objetos y en el laberinto acuático de Morris para medir su retención espacial. Ellos encontraron que el kindling sólo interrumpía la adquisición para localizar la plataforma oculta del laberinto acuático de Morris; el déficit pareció ocurrir sólo en el aprendizaje espacial y en la memoria a corto plazo de dicha tarea. No se encontraron deficiencias en una tarea de discriminación de objetos. Los datos sugieren, que el kindling del hipocampo dorsal está asociado con un déficit específico en la memoria a corto plazo y en el aprendizaje espacial.

También, se han evaluado los efectos del kindling en otras estructuras del lóbulo temporal. Por ejemplo, Hannesson et al. (2005) estimularon eléctricamente a ratas en la corteza perirrinal hasta que alcanzaron la fase 5 del kindling. Siete días

después de la última crisis fase 5 y en los días subsecuentes, las ratas fueron probadas en un laberinto elevado, en un campo abierto circular, en una tarea de exploración de objetos en campo abierto y en un laberinto acuático. El kindling incrementó la ansiedad en el laberinto de campo abierto y en el laberinto elevado e interrumpió el reconocimiento espontáneo de objetos. Los sujetos no mostraron deficiencias en la memoria espacial. Estos datos demuestran la importancia de la especificidad de la estimulación sobre los efectos conductuales, en donde, la corteza perirrinal es fundamental en la memoria de objetos, tal como otros estudios lo han confirmado (Bussey et al. 2006).

Sin embargo, los efectos del kindling sobre el aprendizaje y memoria pueden depender del intervalo entre la última crisis o estimulación eléctrica del kindling y la tarea conductual (Hannesson & Corcoran 2000). Además, algunos estudios como se verá más adelante, no han reportado que el kindling provoque deficiencias en la memoria.

1.6.2 Efectos no amnésicos del kindling

Cain et al. (1993), reportaron que las ratas que presentaron kindling completo y las ratas que presentaron una postdescarga, mostraban severas deficiencias en la ejecución de un aprendizaje de lugar (primer día de entrenamiento en un laberinto acuático). Sin embargo, en el segundo día de entrenamiento en el laberinto acuático, sin dar otra estimulación eléctrica, los grupos adquirieron la información del primer día de entrenamiento y no fueron diferentes de los sujetos control en el segundo día de entrenamiento. Los resultados indicaban que el déficit en el primer día de entrenamiento fue temporal y probablemente resultó de una perturbación temporal debida a la crisis. Los autores, también propusieron que las crisis hipocampales, pero no el kindling, interrumpe el

aprendizaje de lugar de esta tarea. Feasey-Truger et al. (1993), encontraron, que las estimulaciones eléctricas para inducir kindling del hipocampo, interrumpían la memoria de referencia pero no la de trabajo. La interrupción en la ejecución del laberinto fue evidente en las fases pre-convulsivas del kindling, por lo que el bloqueo en la memoria de referencia pareció deberse a la inducción de la postdescarga. Después de suspender las estimulaciones eléctricas, se observó una gradual recuperación de la memoria. Casi en el mismo sentido, Robinson et al. (1993), encontraron que el kindling completo (fase 5) de la vía perforante, no provocaba interrupciones en la adquisición de una tarea de laberinto radial. En cambio, las crisis o estimulaciones provocadas 30 o 45 minutos antes de cada ensayo interrumpían la memoria.

Por otro lado, ratas con kindling extendido (varias estimulaciones eléctricas después de la fase 5 hasta provocar crisis espontáneas) de la amígdala o de la vía perforante (recibieron 300 estimulaciones), y evaluadas en una tarea de laberinto acuático siete días después del kindling, no mostraron deficiencias en la adquisición para localizar una plataforma oculta, en la latencia para alcanzar la plataforma visible, ni en la velocidad de nado (Cammissuli et al. 1997). Recientemente, animales con kindling parcial de la región de CA1 del hipocampo, fueron evaluados en una tarea de laberinto acuático. Las ratas con kindling mostraron deficiencias en la retención de la memoria espacial durante 4 semanas pero no la séptima u octava semana después del kindling (Leung & Shen 2006). Estos datos, plantean la posibilidad de que los efectos amnésicos del kindling posiblemente dependan del intervalo entre la última crisis y la tarea a evaluar.

El kindling como modelo amnésico ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, paradójicamente, otros autores (Adamec & Young 2000; Adamec 1999;

Morgan et al. 1999) han sugerido que el kindling puede incrementar la función de la estructura estimulada. Por ejemplo, se ha reportado que el kindling favorece procesos como el aprendizaje y la memoria (Wig et al. 2002). A continuación, se describen, algunos trabajos al respecto.

1.6.3 Otros efectos del kindling

Se ha demostrado en ratas macho no copuladoras (son machos que no muestran conducta sexual o copula a pesar de ser probadas con hembras receptivas) que la inducción del kindling (Fase 5) en el área preóptica medial (APM: una estructura relacionada con la conducta sexual del macho) provoca el inicio de conductas copulatorias desde el primer mes hasta el octavo mes después de la última crisis (fase 5) (Portillo et al. 2003). No obstante, el kindling de la amígdala (una estructura que no está relacionada con la conducta sexual) de animales no copuladores no induce la conducta copulatoria (Paredes et al. 1990).

Por otro lado, Morgan et al. (1999), demostraron que el kindling de la CI en ratas hembra vírgenes (sin experiencia materna), facilitaba la conducta materna hacia las crías, mientras que el kindling de la amígdala medial en ratas hembra con experiencia materna disminuían esta conducta materna.

En el mismo sentido, Rosen et al. (1996), provocaron kindling parcial de la amígdala y del hipocampo y evaluaron sus efectos sobre un condicionamiento del miedo o “fear conditioning⁷”, 24 horas después del kindling. Las ratas con kindling parcial de la amígdala presentaron un sobresalto o miedo exagerado, comparado

⁷ Condicionamiento del miedo o “Fear Conditioning”: es una tarea de aprendizaje y memoria de tipo aversivo, el cual consiste en asociar un estímulo incondicionado (ej., un choque eléctrico) con un estímulo condicionado (ej., una luz). El estímulo incondicionado o choque eléctrico se aplica en los miembros anteriores y posteriores de las ratas, la finalidad es que el sujeto asocie la luz con el choque, y que después con la sólo presentación del estímulo condicionado o la luz, el sujeto presente sobresaltos o brincos.

con las ratas control y los animales con kindling del hipocampo. El kindling parcial de la amígdala provocó un aumento en la expresión del ARNm de c-Fos, en toda la región límbica (piriforme, perirrinal y entorrinal), la neocorteza, el caudado y el núcleo accumbens. En contraste, el kindling parcial del hipocampo, provocó un aumento en la expresión del ARNm de c-Fos, únicamente en el hipocampo (en el giro dentado de la capa celular granulosa y en todas las regiones de CA, en toda la región rostrocaudal de la formación del hipocampo).

En la misma línea, (2004), animales con kindling de la amígdala basolateral y posteriormente entrenados en el “fear conditioning”, seguían mostrando la respuesta de miedo después de varias presentaciones del estímulo condicionado sin el estímulo incondicionado. En un segundo experimento, una vez que los animales habían extinguido el miedo previamente aprendido volvieron a recuperar el miedo condicionado. Los autores propusieron que el kindling de la amígdala o la excitación del sistema de recuperación de la memoria, refuerza la expresión del miedo aprendido.

Utilizando ratas macho con kindling completo (fase 5) del CI, de la amígdala, de la CI, Paredes et al. (2000), determinaron la preferencia inicial hacia un compartimento de una cámara (la cual tenía 3 compartimentos). Después, los sujetos con kindling recibieron estímulos eléctricos que provocaban nuevamente la crisis fase 5. Al final de la crisis y durante la depresión conductual postictal (respuesta reducida hacia estímulos ambientales con una baja actividad motora, esto es comúnmente observado después de la fase 5) los animales fueron colocados en la cámara no preferida durante 30 minutos. En días alternados, los animales ya sin recibir estimulaciones eléctricas, fueron colocados en la caja

preferida. Al final del condicionamiento los animales kindling mostraron un claro cambio de preferencia hacia la caja no preferida.

Como se describió en el capítulo “Plasticidad y kindling”, una característica notable del kindling, es la presencia de una enorme variedad de cambios neuronales funcionales y estructurales a largo plazo, los cuales ocurren en ausencia de daño neuronal a diferencia de modelos que inducen estatus epilepticus por ácido kaínico, en donde el daño neuronal es notorio, tal como veremos en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 2. MODELO DE ESTATUS EPILEPTICUS INDUCIDO POR ÁCIDO KAÍNICO

Otro modelo que induce crisis generalizadas, consiste en la administración repetida de ácido kaínico, el cual es un agente neurotóxico que actúa sobre los receptores de glutamato. A diferencia del kindling las crisis inducidas por ácido kaínico están asociadas con el daño neuronal de diferentes regiones cerebrales. A continuación describiré brevemente las principales características del modelo del ácido kaínico.

2.1 Receptores de glutamato

El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios. Los receptores de glutamato generalmente se clasifican en receptores ionotrópicos, con canales permeables a cationes y metabotrópicos que modifican la excitabilidad a través de subunidades de las proteínas G. Hay tres familias de receptores ionotrópicos: AMPA, NMDA y kainato. Los subtipos de los receptores de glutamato están formados por subunidades. Los receptores de glutamato ionotrópicos, están constituidos por las subunidades de los receptores AMPA: GluR1, 2, 3 y 4, las subunidades de receptor de kainato: subunidades de baja afinidad (GluR5, 6 y 7) y las de alta afinidad (KA1 y 2) y las subunidades de receptor NMDA: NR1 y NR2A, 2B, 2C y 2D. Los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) están diferenciados en tres grupos: Grupo I comprende a las subunidades mGluR1,5. El Grupo II (mGluR2,3) y el Grupo III (mGluR4,6-8) (revisado en Morimoto et al. 2004).

2.2 Receptores de kainato

La familia de las subunidades que puede contribuir a la formación de los receptores de kainato, se puede dividir en dos subfamilias. La primera incluye las subunidades GluR5, GluR6, GluR7. GluR6 que forman canales funcionales

homoméricos. Aunque, GluR5 y GluR7, difícilmente lo hacen, son capaces de combinarse con GluR6 o de alguna de las subunidades de KA para formar receptores heteroméricos. La otra subfamilia la constituyen las subunidades KA1 y KA2 que no forman canales homoméricos (Lerma 2004; Rodríguez-Moreno 2003).

La distribución de las subunidades del receptor de kainato, varía en las distintas regiones del sistema nervioso. GluR5 se encuentra presente sobre todo en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, el subíctulum, el núcleo septal, la corteza piriforme y el cíngulo, así como en las células de purkinje del cerebelo. GluR6 es abundante en las células granulares del cerebelo, en el giro dentado y en la región CA3 del hipocampo, al igual que en el estriado. La subunidad GluR7 está presente en poca cantidad en el cerebro pero se expresa, en particular en las capas profundas de la corteza cerebral y el estriado, y en las neuronas inhibitorias de la capa molecular del cerebelo. KA1 se encuentra restringido de forma casi exclusiva en la región CA3 del hipocampo, aunque también se expresa en pequeñas cantidades, en el giro dentado, en la amígdala y en la corteza entorrinal. Por el contrario, el mensajero de KA2 se encuentra prácticamente en todos los núcleos del sistema nervioso (Rodríguez-Moreno 2003).

2.3 Características generales

En contraste al kindling, el modelo de estatus epilepticus provocado por ácido kaínico (se caracteriza por crisis recurrentes y continuas), es más fácil de inducir y su expresión es más variable (por ejemplo, poco control sobre la cantidad de crisis). Típicamente, se administran sistemáticamente altas dosis de ácido kaínico (Morimoto et al. 2004). De acuerdo a Morimoto et al. (2004), los cambios morfológicos que se observan en el hipocampo después del estatus epilepticus, son más semejantes a los cambios morfológicos observados en humanos con

epilepsia del lóbulo temporal. Sin embargo, en este modelo animal, el daño neuronal puede ser más severo y amplio. La desventaja de este modelo, es que el estatus puede ser difícil de controlar (muchos de los sujetos mueren en esta fase) y el daño puede ser extenso. Las lesiones neuronales se presentan a partir de las primeras 4 horas después de la inyección de ácido kaínico y hasta 7 meses después del estatus epilepticus. Las principales regiones afectadas son: el hipocampo, la amígdala, corteza piriforme, la corteza entorrinal, la región septal, el tálamo. Las lesiones, incluyen la pérdida neuronal, gliosis, específicamente, la presencia de microglía reactiva y necrosis en áreas muy extensas (Covolan & Mello 2000; Chen & Buckmaster 2005; Hopkins et al. 2000).

Se han descrito al menos 3 fases en el modelo de estatus epilepticus inducido por ácido kaínico (revisado en Leite et al. 2002). La **fase aguda**, se caracteriza, por la pérdida neuronal y por la alta mortalidad de los sujetos asociada a las prolongadas crisis. La **fase latente**, se caracteriza por varios cambios moleculares y neuronales que pueden contribuir al proceso de epileptogénesis. En esta fase, es baja la probabilidad de ocurrencia de las crisis espontáneas. Se ha propuesto, que esta etapa puede ser el análogo a la adquisición o al kindling completo. La **fase crónica**, se caracteriza por crisis espontáneas recurrentes y crónicas

2.4 Mecanismos y acciones de los receptores de kainato en la excitabilidad

Los receptores de kainato se sitúan en la terminal postsináptica de conexiones particulares (por ejemplo, fibras musgosas-neuronas piramidales de CA3 del hipocampo), mediando parte de la señal sináptica. También, los receptores

de kainato se disponen en la terminal presináptica, tanto de las sinapsis excitatorias como inhibitorias, donde regulan la liberación del neurotransmisor (Lerma 2004).

En las sinapsis excitatorias, si bien concentraciones altas de kainato provocan un bloqueo en la excitabilidad, a concentraciones nanomolares, provoca un aumento en la liberación de glutamato. Esto significa que los receptores de kainato controlan la liberación del glutamato de manera bidireccional. Uno de los aspectos más importantes de los receptores de kainato, es que funcionan como autorreceptores, dado que se ha demostrado que el glutamato liberado sinápticamente es capaz de activarlos y potenciar la liberación subsiguiente del transmisor. Así los receptores de kainato contribuyen a la plasticidad de corta duración, tan marcada y significativa en las sinapsis excitadoras.

Por otro lado, la aplicación de kainato en células cultivadas o en rebanadas de hipocampo provoca una depresión de las respuestas postsinápticas inhibitorias (revisado en Lerma 2004). Posteriormente se puso en evidencia que más que interferir con los receptores de GABA, los receptores de kainato provocaban una desinhibición de las células principales al producir una reducción del nivel inhibitorio de estas. También, los receptores de kainato localizados en las terminales inhibitorias pueden deprimir eficientemente la liberación de GABA, lo que resulta en una drástica reducción de la entrada inhibitoria sobre las neuronas postsinápticas (revisado en Lerma 2004). Los receptores de kainato situados en las terminales gabaérgicas que hacen sinapsis sobre interneuronas inhibitorias de la capa de CA1 hipocampal facilitan en vez de inhibir la liberación de GABA. Las interneuronas inhibitorias reciben proyecciones gabaérgicas de interneuronas específicas que controlan su excitabilidad. Esto indicaría que los receptores de kainato presinápticos modulan la actividad sináptica mediada por GABA entre

interneuronas, revelando que el control de la liberación de GABA por receptores de kainato puede ser heterogéneo, dependiendo en última instancia de las propiedades de las sinapsis gabérgicas. Es de notar, que el resultado de una sobreliberación de GABA en este sistema sería una sobreinhibición de las interneuronas gabaérgicas. Esto sería, por tanto, un mecanismo desinhibitorio que se sumaría a la depresión de la liberación de GABA inducida por los receptores de kainato en las terminales gabaérgicas que contactan sobre las células piramidales. Estos mecanismos, actuando al mismo tiempo, podrían producir por si mismos un aumento en la excitabilidad poblacional, tal que eventualmente resulte en actividad epiléptica (Lerma 2004). Esta continua despolarización puede ser excitotóxica, causando necrosis y apoptosis, y dañando un amplio rango de células, las cuales incluyen neuronas piramidales del hipocampo, neuronas del hilo dentado, neuronas piriformes, etc (Morimoto et al. 2004).

Como anteriormente fue descrito, una característica notable del kindling es la enorme variedad de cambios neuronales asociados a este fenómeno. Estos cambios neuronales, pueden tener efectos sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Un modelo de aprendizaje y memoria ideal para estudiar estos efectos, es el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), porque brinda enormes ventajas sobre otras tareas de aprendizaje y memoria: 1) se conocen algunas de las vías neuronales y estructuras implicadas en su formación, 2) es un aprendizaje sencillo y rápido. Por lo tanto, en el siguiente capítulo, describiré con mayor detalle el CAS y su relación con el kindling.

CAPÍTULO 3. CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

3.1 Características generales

La conducta exitosa en la ingesta de los alimentos, depende de la capacidad de recordar las consecuencias del alimento que se ha comido y asociado con las propiedades comestibles del mismo. Por lo tanto, los animales necesitan discriminar entre los alimentos seguros y como los tóxicos, lo cual ayuda a su sobrevivencia. Una de las habilidades de sobrevivencia más importantes, es que los animales han desarrollado una memoria del sabor que les permite evaluar la familiaridad del sabor que previamente estuvo presente.

La **neofobia** es el miedo a un sabor o comida novedosa, esto provoca que el animal consuma pequeñas cantidades de la nueva comida o sabor (Sweatt 2003) como una forma de precaución a sabores o comidas desconocidas. No obstante, cuando el sabor no tiene consecuencias negativas, éste llega a ser reconocido como seguro conduciendo a un incremento en su consumo (**atenuación de la neofobia**). Pero si este nuevo sabor es asociado con un malestar, los animales lo rechazarán cuando se vuelva a presentar, desarrollando una aversión de larga duración hacia el sabor. Esta forma de memoria de reconocimiento se llama **condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)** (Bermudez-Rattoni 2004).

El CAS fue por primera vez descrito por John García et al (1955), quienes demostraron que es posible desencadenar un condicionamiento aversivo hacia la sacarina cuando este sabor es seguido por una exposición a rayos gamma. Los autores describieron que la sacarina es el estímulo condicionado (EC), mientras que los rayos gamma estarían operando como el estímulo incondicionado (EI).

El CAS tiene varias características que lo hacen un modelo experimental muy útil para estudiar los mecanismos fisiológicos y anatómicos del aprendizaje y

memoria (Bermudez-Rattoni 2004; Bermudez-Rattoni et al. 2004). Una de las principales ventajas es el conocimiento de las vías neuronales y estructuras implicadas en su formación. Otra ventaja, es que el sabor es asociado fácilmente con el malestar gastrointestinal después de un único apareamiento entre el sabor (el estímulo condicionado: EC) y el malestar (el estímulo incondicionado: EI). Por último, una fuerte aversión al sabor puede ser provocado incluso si el retardo es muy grande entre EC y el EI (revisado en Schafe et al. 1995b) .

Este condicionamiento consiste en asociar un sabor novedoso (EC) con cualquier sustancia que produzca un malestar (EI). Generalmente se utilizan como **EC**, solución de sacarina y como **EI**, solución de cloruro de litio (LiCl), el cual es inyectado intraperitonealmente y produce peristalsis, flacidez, diarrea entre otros efectos (Nachman & Hartley 1975; Nijima & Yamamoto 1994). La consecuencia de esta asociación se manifiesta durante la segunda presentación del EC; si el consumo del EC disminuye, entonces se infiere que el animal aprendió ya que evita el sabor (Bermudez-Rattoni 2004).

Se le conoce como **extinción** a la exposición no reforzada de un estímulo condicionado, previamente pareado y que conduce a una disminución progresiva de la respuesta condicionada (RC) (revisado en Rosas & Bouton 1996). No obstante, este fenómeno, no refleja un olvido o un proceso de desaprendizaje del trazo original (la asociación EC-EI que ocurre durante la adquisición del CAS), sino refleja un proceso de reaprendizaje (Rescorla 1996), es decir, el sujeto aprende otra nueva asociación durante la extinción, la relación EC-no EI (**EC**, es la sacarina y **noEI**, es la no presentación del LiCl durante la extinción del CAS). Esto último significa, que los sujetos en la extinción, aprenderán que el EC no les produce el malestar gastrointestinal. Diversos tipos de fenómenos apoyan que la extinción no

es un olvido: 1) Recuperación espontánea: una vez extinguida, la respuesta condicionada (RC) puede recuperarse con el tiempo sin requerir de otro entrenamiento. 2) Ahorro: la readquisición de la respuesta extinguida requiere menos ensayos que el entrenamiento original. 3) Reincorporación: la exposición sólo del EC puede restaurar la RC (revisado en Berman et al. 2003).

Se ha propuesto (Eisenberg et al. 2003) que durante la extinción se observan dos fenómenos: 1) El trazo original EC-EI, ya que se puede distinguir la intensidad del aprendizaje aversivo de la asociación original EC-EI. 2) El trazo EC-**no EI**, es decir, durante la extinción, la presentación del EC pero sin la exposición del EI, implica que el sujeto aprende asociar que la sacarina o EC no le produce ningún malestar, el sujeto tiene que reaprender una nueva asociación. Estos dos trazos compiten por el control de la conducta, en donde la salida de esta competencia depende la aceptación innata del sabor y del índice de aversión original después del entrenamiento (Berman et al. 2003).

3.2 Neuroanatomía y fisiología del CAS

3.2.1 Información gustativa

Diversos estudios han identificado las vías del gusto (Bermudez-Rattoni 2004; Bermudez-Rattoni et al. 2004; Yamamoto 2006; Yamamoto et al. 1998; Yamamoto & Sawa 2000; para más información ver Yamamoto et al. 1994). Desde la cavidad oral, la codificación del sabor empieza con la transducción química. La información del sabor que proviene de la boca y lengua, alcanza la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) a través del nervio facial (par craneal VII), y el nervio glossofaríngeo (par craneal IX), y a partir de la laringe y faringe a través del nervio vago (par craneal X). Las neuronas desde NTS proyectan ipsilateralmente al núcleo parabraquial posteromedial. También las fibras alcanzan al núcleo

parabraquial dorsolateral (NPBd) en el mesencéfalo y desde esta estructura, a través de dos vías envía proyecciones: una hacia el hipotálamo lateral, núcleo de la cama de la estría terminal y amígdala (central y basolateral) y la otra hacia la parte parvocelular del núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM) y de ahí se envían proyecciones a la CI. Véase la figura 1.

3.2.2 Información visceral

Hay dos vías por las cuales el estímulo visceral se transmite al sistema nervioso central (Bermudez-Rattoni 2004; Bermudez-Rattoni et al. 2004; Yamamoto & Sawa 2000; ver Yamamoto et al. 1994). En el primer caso, el estímulo que irrita directamente al sistema gastrointestinal, es primero procesado a través del nervio vago (X). En el segundo caso, el estímulo visceral (por ejemplo, el cloruro de litio) que induce el malestar viaja a través del torrente sanguíneo y alcanza el área postrema, una región con una barrera hematoencefálica perforada. Ambas vías proyectan a la parte caudal del núcleo del tracto solitario (NTS), el cual envía proyecciones al subnúcleo lateral externo del núcleo parabraquial (NPBe) y a partir de ahí, finalmente la información viaja a la amígdala central (AMGc) y al núcleo paraventricular del hipotálamo. También desde la parte lateral externa del núcleo parabraquial (NPB) se envían proyecciones a la parte parvocelular del tálamo ventral posterolateral (VPL) y de ahí la información se dirige hacia la CI. Véase la figura 1.

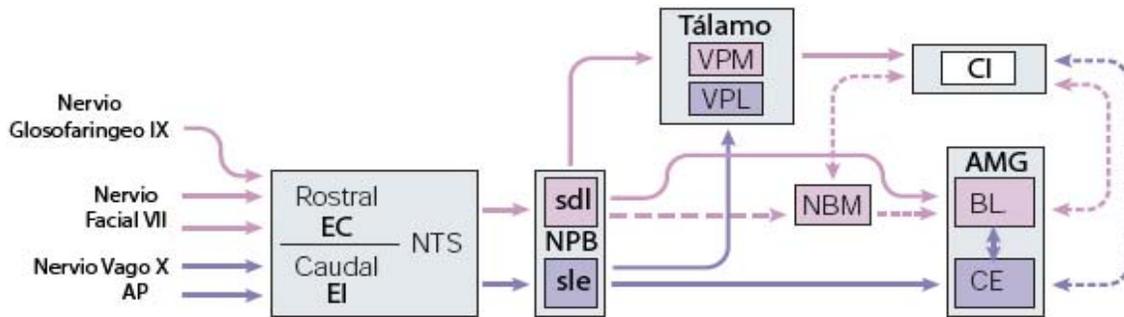


Figura 1. Esquema de las principales vías cerebrales del gusto y viscerales. Las líneas sólidas representan los axones que llevan la información gustativa y visceral. Las líneas punteadas representan las proyecciones involucradas en el condicionamiento aversivo a los sabores pero cuya naturaleza de la información sensorial es desconocida. **AMG**, amígdala; **AP**, area postrema; **BL**, amígdala basolateral; **CE**, amígdala central; **EC**, estímulo condicionado; **EI**, estímulo incondicionado; **sdl**, subnúcleo dorsolateral; **sle**, subnúcleo lateral; exterior; **CI**, corteza insular; **NBM**, núcleo basal magnocelular; **NTS**, núcleo del tracto solitario; **NPB**, núcleo parabraquial; **VPL**, núcleo ventral posterolateral del tálamo; **VPM**, núcleo ventral posteromedial del tálamo. Tomado de Bermudez-Rattoni (2004)

Como se describió anteriormente, ambas vías, visceral y gustativa convergen en varias estructuras cerebrales, que se encargan de la integración del malestar gastrointestinal con el sabor. Las principales estructuras que llevan a cabo esta integración son el NPB (Reilly 1999), el NTS (Haupt et al. 1994; Spray & Bernstein 2004), la amígdala (AMG) (Bermudez-Rattoni et al. 2004; Lamprecht & Dudai 2000; Roldán & Bures 1994; Tucci et al. 1998), la CI (Bermudez-Rattoni et al. 2004) y el tálamo gustativo (Lasiter 1985; Lasiter et al. 1985). Otras estructuras cerebrales que también se encuentran involucradas pero han sido menos estudiadas, son el hipotálamo (Touzani & Sclafani 2002), la corteza prefrontal (Hernadi et al. 2000) y la corteza perirrinal (ver en Swards & Swards 2001).

A continuación describiré brevemente las evidencias que demuestran la participación de algunas de estas estructuras en el CAS.

3.2.3 Estructuras de integración visceral y gustativa

3.2.3.1 Núcleo del tracto solitario

El núcleo del tracto solitario se encuentra paralelo a los núcleos parasimpáticos de los nervios vago y glossofaríngeo. Se localiza lateral a ellos y se extiende aproximadamente en la misma longitud rostrocaudal. El NTS recibe fibras aferentes relacionadas al gusto y aferencias viscerales que entran por medio de los nervios vago, glossofaríngeo y facial. El núcleo rodea el tracto solitario, el cual se compone de muchas de las fibras aferentes que provienen de los nervios craneales (para más detalle ver Paxinos 1995). Como se mencionó anteriormente, las aferencias gustativas están representadas rostralmente, mientras que las aferencias viscerales están representadas caudalmente.

Con respecto al NTS, Yamamoto y Sawa (2000) determinaron la localización de las representaciones sensoriales y hedónicas en el NTS, mediante una inmunohistoquímica para la proteína c-Fos. Los resultados mostraron que la expresión de esta proteína aumentó después de la administración de las infusiones intraorales e intragástricas de sacarosa, sacarina, quinina y agua. Yamamoto y Sawa (2000) encontraron una mayor inmunoreactividad de c-Fos en el NTS rostral, cuando las infusiones eran intraorales, en cambio cuando eran intragástricas, no encontraron cambios, confirmando que la representación de esta área es de carácter sensorial gustativa (no hedónica). En niveles caudales e intermedios, tanto la estimulación intraoral como intragástrica con sacarosa, aumentaron la cantidad de c-Fos, lo que puede considerarse una evidencia de que en estas regiones del NTS se produce la convergencia inicial entre las aferencias sensoriales gustativas y viscerales, y en donde se pueden representar los aspectos hedónicos de la información gustativa aferente (Yamamoto & Sawa 2000). Asimismo, se han

identificado una serie de neuronas, localizadas en la porción parvocelular de la región intermedia del NTS (pcNTSi) que responden sólo al EC (son estímulos que se han convertido en aversivos, tras su asociación con un agente inductor de malestar) y no al estímulo incondicionado (revisado en, de la Torre-Vacas & Agüero-Zapata 2006). Es importante mencionar que el patrón de respuesta de las neuronas del NTSi ante estímulos gustativos aversivos, depende de sus conexiones ipsilaterales con determinadas estructuras como por ejemplo, la AMGc (Spray & Bernstein 2004).

Estos hallazgos sugieren que NTS puede estar implicado en la formación o en la valoración de aspecto hedónico del CAS.

3.2.3.2 Núcleo parabraquial

El núcleo parabraquial es una estructura situada en la zona dorsal lateral del puente, rodeando el haz de fibras del braquium conjutivum o pedúnculo cerebeloso superior. Tradicionalmente se ha dividido en dos subnúcleos principales: el núcleo lateral (NPBl) y el núcleo medial (NPBm), aunque en la actualidad se aceptan la existencia de dos subnúcleos mediales (externo y central) y siete subnúcleos laterales (central, ventral, dorsal, externo, extremo, superior e interno) (para más detalle ver Norgen 1995; Reilly 1999).

Las neuronas gustativas están localizadas en la parte posterior del NPB, principalmente en el subnúcleo medial, el subnúcleo lateral ventral, y en el subnúcleo medial externo y el área del braquium conjutivum. Sin embargo, se ha descrito (revisado en Bermudez-Rattoni 2004), que las fibras del gusto también alcanzan el subnúcleo dorsolateral del NPB. Por otro lado, la información visceral asciende al NPB desde el NTS así como del área postrema. La información visceral general (incluyendo la cardiovascular, la respiratoria y los procesos nociceptivos)

es transmitida a todos los subnúcleos del NPB lateral. De particular relevancia, la información ascendente que proviene del tracto gastrointestinal. Por ejemplo la información que proviene de la intoxicación provocada por el cloruro de litio (LiCl), induce la expresión de c-Fos en el núcleo lateral externo, lateral central y en el subnúcleo medial externo del NPB (Sakai & Yamamoto 1997; Yamamoto et al. 1992). Así, el NPB representa una confluencia de modalidades sensoriales donde las poblaciones de neuronas gustativas y no gustativas se pueden traslapar (para más detalles del NPB ver Reilly 1999).

Diversos estudios indican que el NPB puede estar involucrado en al menos tres de las fases del CAS (revisado en Reilly 1999). Detección del estímulo condicionado (EC), detección del estímulo incondicionado (EI), y en la asociación del EC-EI. Dependiendo de la extensión y lugar del daño (o desactivación neuronal), una lesión del NPB puede afectar uno o más de estos componentes. Específicamente, lesiones del NPB medial interrumpen el procesamiento del EC, causando una reducción en la intensidad percibida del estímulo gustativo, lo cual puede retardar la adquisición del CAS. Los profundos déficits del aprendizaje aversivo observados en ratas con daño del NPB medial, no obstante reflejan una inhabilidad específica para formar una asociación entre el EC y EI. Las lesiones del NPB lateral disminuyen la sensibilidad de la información viscerosensorial, y provocan una alteración en la percepción del EI evitando el desarrollo de la aversión condicionada hacia el EC. Finalmente, las lesiones que bloquean el funcionamiento de todos los núcleos del NPB, provocan una suma de todos los déficits, porque las lesiones abarcan las subdivisiones mediales y laterales del NPB (revisado en Reilly 1999).

3.2.3.3 Amígdala

El término amígdala, deriva de la palabra griega “almendra”, la cual se puede describir como una masa ovoide de materia gris que se encuentra en la porción medial del lóbulo temporal. La amígdala es un complejo multinuclear, que ha sido de gran interés por su implicación en la conducta emocional. El complejo amigdaloides es estructuralmente diverso y comprende 13 núcleos. Además incluye otras subdivisiones que tienen conexiones internucleares e intranucleares extensas. Estos núcleos y subnúcleos se clasifican sobre la base de su citoarquitectura, histoquímica y de las conexiones que tienen. La nomenclatura de estos núcleos está basada en lo descrito por Price et al. (1987) con algunas modificaciones (McDonald 1998). En esta clasificación, los núcleos de la amígdala se dividen en 3 grupos principales: 1) el grupo de los núcleos profundos o grupo basolateral, el cual incluye: el núcleo lateral, el núcleo basal y el núcleo basal accesorio; 2) el grupo de los núcleos superficiales, que incluye al núcleo cortical y a los núcleos del tracto olfatorio lateral; 3) el grupo centromedial, el cual incluye al núcleo medial y central. Hay otro conjunto de núcleos que no caen dentro de estos grupos, como son la masa de células intercaladas y el área amigdalohipocámpal (para más detalle ver Alheid et al. 1995; Pitkanen 2000; Sah et al. 2003).

Los núcleos de la amígdala que están más implicados en el CAS, son la AMGc y basolateral (AMGb) (Lamprecht & Dudai 2000), por lo que las descripciones posteriores en torno a la amígdala y el CAS se enfocaran en estos dos núcleos amigdalinos.

3.2.3.3.1 Amígdala central

La AMGc (la cual pertenece al grupo centromedial de la amígdala) está localizada dorsomedialmente en la parte rostral de la amígdala, limitada

lateralmente por el complejo basolateral o núcleo basolateral, dorsalmente por el globus pallidus y medialmente por la estría terminal. Caudalmente, la AMGc termina cuando aparece el ventrículo lateral. La AMGc tiene 4 divisiones. Capsular, lateral, intermedia y medial (revisado en Sah et al. 2003).

Diferentes estudios sugieren que la AMGc participa en el CAS (Lamprecht & Dudai 1996; Lamprecht & Dudai 2000; Navarro et al. 2000; Schafe et al. 1995a). Se ha planteado que la AMGc (Dunn & Everitt 1988), está principalmente involucrada con los aspectos generales novedosos del ambiente. En un estudio, realizado por Koh et al (2003b), se sugiere este posible papel de la AMGc. En este trabajo, cuando las ratas fueron expuestas a un estímulo novedoso se observó una elevación de la expresión de c-Fos en la AMGc; en cambio esto no se observó cuando fueron expuestas a un sabor familiar.

Por otro lado, diversos trabajos (Ferreira et al. 2006; Gu et al. 1993; Koh et al. 2003a; Lamprecht & Dudai 1995; St Andre et al. 2007; Yamamoto et al. 1997), indican que la AMGc procesa la información visceral provocado por el EI. En general, en estos estudios se ha observado un aumento en la expresión de c-Fos en la AMGc, después de que los animales son inyectados con una solución de LiCl.

En la misma línea (Kwon et al. 2008), recientemente encontraron, mediante el análisis de PCR en tiempo real, la presencia de c-Fos, Fra-2, c-Jun y JunD en la amígdala. Por hibridación in situ, encontraron en la AMGc una elevación de la expresión del ARNm de c-Fos y Fra-2, después de que los sujetos fueron inyectados con el LiCl y después de que los animales habían adquirido el CAS. La inmunohistoquímica también reveló un incremento en la expresión de Fra-2, después de la inyección de LiCl y después de la adquisición del CAS. De acuerdo a los resultados, el gen de expresión inmediata, c-Fos es importante para el

aprendizaje aversivo, pero c-Fos no es el único implicado en este tipo de aprendizaje, por lo tanto la expresión de otras proteínas de la familia AP-1 (diferentes a c-Fos y Jun) pueden participar en el desarrollo del CAS (Kwon et al. 2008). Este trabajo, demuestra la participación de otras proteínas diferentes a c-Fos, en la formación del CAS y que los cambios de c-Fos y Fra2 en la AMGc pueden contribuir al desarrollo del aprendizaje aversivo al sabor. Además confirma los hallazgos realizados en AMGc en los que c-Fos se expresa sólo después de la inyección de LiCl. La expresión de c-Fos no sólo indica mayor actividad neuronal, sino que c-Fos es necesario para la codificación del CAS. Esto fue demostrado por Lamprecht y Dudai (1996); cuando estos autores realizaron microinyecciones de oligonucleótidos antisentido para c-Fos dentro de la AMGc, la adquisición del CAS fue bloqueada.

Sin embargo, St. Andre et al. (2007), han mostrado que aunque las evidencias indican una posible implicación de la AMGc en el procesamiento del EI, los datos conductuales en el CAS han proporcionado poca evidencia de su participación en esta tarea de aprendizaje. Sin embargo, los mismos autores, al final de su discusión, no niegan la posible participación de la AMGc en el CAS, ya que ellos mismos, encontraron un incremento en la expresión de c-Fos en la AMGc (St Andre et al. 2007) después de la presentación del LiCl.

Se ha propuesto que la AMGc (2007) incrementa la sensibilidad para detectar el estímulo condicionado después de la adquisición del CAS, lo cual es importante para reconocer el significado del sabor (es decir, el reconocimiento del significado del EC, una vez que se ha adquirido el CAS). En trabajos pasados, Yamamoto (1997) encontró que la sacarosa (estímulo condicionado que se usó en la adquisición del CAS) pero no la sacarina (presentado sólo después de la

adquisición del CAS y no en la adquisición), inducía en la AMGc, un incremento en la expresión de c-Fos después del establecimiento del CAS. Los siguientes estudios, fueron corroborando sus primeros hallazgos. Tokita et al. (2004), demostraron que la estimulación eléctrica en la AMGc (al mismo tiempo se les administraba intraoralmente la solución de NaCl y otros sabores, como sacarina, quinina, etc), después de la adquisición del CAS, provocaba un efecto excitatorio en varias neuronas del NPB, sobre todo en las neuronas sensibles al cloruro de sodio⁸; este efecto no fue observado cuando estimularon la CI. Los autores propusieron que la AMGc posiblemente module la actividad de las neuronas gustativas en el NPB y que estas neuronas sensibles al NaCl pueden jugar un papel crítico en el reconocimiento del sabor al NaCl.

Se ha propuesto (1997), que la AMGc es una estructura necesaria para la codificación de la memoria a largo plazo del CAS. En este sentido, Lamprecht et al. (1997), investigaron la proteína de unión CRE (CREB: cAMP response element-binding protein), la cual está implicada en múltiples tipos de plasticidad neuronal (Carew 1996; Frank & Greenberg 1994). Para evaluar esta proteína durante el CAS, Lamprecht et al. (1997), administraron en la AMGc de la rata (catorce horas antes del entrenamiento del CAS), microinyecciones locales de oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido para CREB, lo cual, provocó un descenso transitorio en el nivel de la proteína CREB durante el entrenamiento del CAS y un

⁸En este mismo estudio, Tokita et al. (2004) encontraron, después de la adquisición del CAS, un incremento en la actividad neuronal del NPB ante la presencia del estímulo condicionado (cloruro de sodio, NaCl) y fue observado exclusivamente en neuronas que responden al NaCl sensibles a amilorida (diferentes tipos de células neuronales responden mejor a una cualidad gustativa, para una revisión ver Smith et al. 2000) y no ante la presencia de otros sabores. En el NPB existen diversos grupos neuronales que responden mejor a una cualidad gustativa, tal como sacarosa, NaCl, etc. (Nishijo & Norgren 1990), por lo tanto, lo destacado de este trabajo, fue que sólo ante la presencia del NaCl (el estímulo condicionado) hubo un incremento de la actividad neuronal únicamente en las células que responden al NaCl y no se encontró ningún cambio en la actividad neuronal en otros sabores que fueron únicamente presentados después de la adquisición del CAS.

bloqueo en la memoria a largo plazo, cuando los sujetos fueron evaluados de 3 a 5 días después del entrenamiento. En contraste los animales con ODNs sentido, no mostraron una alteración en la memoria. El antisentido para CREB en la AMGc no tuvo efecto sobre la recuperación de la memoria una vez que ésta se formó y además no tuvo efecto sobre la memoria a corto plazo. Lamprecht y Dudai (1997) concluyeron que la AMGc, es necesaria para la memoria a largo plazo y que este proceso implica cambios a largo plazo, donde la expresión de los genes regulados por CRE tiene lugar en la AMGc y por lo tanto, dicha estructura podría estar principalmente implicada en la codificación de la memoria a largo plazo mas que simplemente modular el trazo gustativo durante adquisición del CAS. En otra serie de estudios (Bahar et al. 2004; Bahar et al. 2003), mediante una cánula implantada crónicamente en la AMGc, se hicieron microinfusiones locales de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, o propranolol, un bloqueador de los receptores β -adrenérgicos para probar el efecto de las drogas sobre la adquisición del CAS. Para ello, en el día del condicionamiento, la anisomicina se administró 20 minutos antes y el propranolol inmediatamente después de la presentación del EC. Los resultados mostraron que tanto la inhibición de la síntesis de proteínas, como el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos, interrumpen, la adquisición del CAS. Los autores sugirieron que la AMGc central es esencial para la formación a largo plazo, o consolidación, de la memoria aversiva al sabor (Bahar et al. 2003).

3.2.3.3.2 Amígdala basolateral

La AMGb comprende al núcleo basal y lateral. El núcleo lateral está localizado en el aspecto dorsal de la amígdala; éste núcleo linda ventralmente con el núcleo basal. Este núcleo está limitado lateralmente por la cápsula externa y

medialmente por la AMGc. El núcleo central tiene 3 subdivisiones: el núcleo más pequeño llamado dorsolateral, el más grande llamado ventrolateral, y el medial. El núcleo basal se localiza ventral al núcleo lateral y se subdivide en magnocelular, parvocelular e intermedio (revisado en Sah et al. 2003).

Diversos trabajos han demostrado (para más detalle ver Bermudez-Rattoni et al. 2004; Lamprecht & Dudai 2000) que la AMGb es una estructura muy importante para el desarrollo del CAS.

Se ha planteado que la AMGb está implicada en el procesamiento del malestar gastrointestinal (Ferreira et al. 2006; Miranda et al. 2002).

Al respecto, St. André et al. (2007), evaluaron la expresión de c-Fos después de la inyección intraperitoneal de LiCl y observaron un incremento en la expresión de c-Fos en la AMGb, después de la inyección de LiCl.

Asimismo, se ha reportado (Gallo et al. 1992; Roldán & Bures 1994) que la inactivación de la AMGb por tetrodotoxina (TTX) después del estímulo gustativo o antes del estímulo visceral interrumpe la formación del CAS. Sin embargo, la inactivación por TTX antes del EC (estímulo gustativo) no interrumpe el desarrollo del CAS. Esto podría indicar que la amígdala no está implicada en el procesamiento inicial del sabor, sino que estaría implicada en el procesamiento de la información visceral. De acuerdo a estos resultados, Miranda et al. (2002), mediante estudios de microdiálisis, encontraron un aumento en la liberación de glutamato en la AMGb, después de inducir un malestar gástrico mediante LiCl. El aumento en la liberación de glutamato no ocurrió después de la presentación del sabor novedoso (EC). En este mismo trabajo, justamente antes de la inyección de una dosis baja de LiCl (dosis incapaz de inducir un claro CAS), se administraron microinyecciones de glutamato intra-amigdalares, resultando en el desarrollo de un

claro aprendizaje aversivo al sabor. Esto no ocurrió si únicamente se inyectaba el glutamato (es decir sin la presencia de la dosis baja de LiCl). Estos resultados, sugieren que el glutamato en la AMGb está relacionado con el procesamiento de la entrada de la señal visceral.

Siguiendo la misma línea de investigación, Ferreira et al. (2006), inyectaron a un grupo de ratas una dosis baja de LiCl (la cual no induce un claro CAS) y a otro grupo una dosis alta (suficiente para inducir un claro CAS). Cuando evaluaron la expresión de c-Fos en la AMGc y basolateral, encontraron un incremento en la expresión de c-Fos en la AMGc y basolateral, pero únicamente con la dosis alta de LiCl. Es importante señalar, que en la CI, tanto con la dosis alta como baja de LiCl se observó un aumento en la expresión de c-Fos. Es decir, la amígdala parece ser importante para el procesamiento de la información visceral y su activación depende de la intensidad del estímulo incondicionado (LiCl). La CI, que se describirá más adelante, está más bien implicada en los procesos asociativos EC-EI.

Recientemente, otro estudio (Kwon et al. 2008), confirmó la posible participación de la AMGb, en el procesamiento del estímulo visceral (EI). A través de una inmunohistoquímica, la AMGb mostró un incremento en la expresión de Fra-2, después de la inyección de LiCl (sólo se presentó el LiCl, no se apareó con el EC) y después de la asociación EC-EI. Estos resultados indican, que la amígdala está implicada en el procesamiento del EI en la adquisición del CAS, en donde la proteína Fra 2 está relacionada con este tipo de procesamiento.

Yamamoto ha propuesto (2007) a la AMGb como una estructura importante, tanto para la adquisición como para la expresión del CAS. Al respecto, Yasoshima

y Yamamoto (1997), administraron microinyecciones de inhibidores de PKC dentro de la AMGb, durante el intervalo EC-EI, encontrando que los sujetos fracasaron en adquirir el CAS. Cuando administraron este inhibidor de la PKC, 30 minutos después de la presentación EC-EI, se interrumpió la formación del CAS. En otro trabajo, Yasoshima et al. (2000), bloquearon los receptores de glutamato de la AMGb (mediante antagonistas específicos a los receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos) y encontraron que el bloqueo de cada uno de los tres subtipos de receptor, entre el consumo de la sacarina (EC) y la inyección de LiCl (EI), interrumpió la adquisición del CAS. Después de la adquisición del CAS, sin embargo, sólo el bloqueo de los receptores AMPA, pero no los receptores NMDA, ni los metabotrópicos, dañaron la expresión del CAS. Los resultados indican que ambos receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA) son necesarios para la adquisición del CAS, mientras que sólo receptores AMPA son importantes para la expresión o evocación del CAS. Los autores sugieren, que la transmisión glutamatérgica está implicada en la formación y almacenamiento de la memoria gustativa asociada a los cambios hedónicos de lo positivo a lo negativo (Yasoshima et al. 2000). Estos resultados, también confirman que la AMGb es un sitio importante tanto para la adquisición como para la expresión o evocación del CAS (Yamamoto 2007; 2005). Esta segunda función (expresión o evocación del CAS) de la AMGb, fue descrita en un estudio previo, realizado por Yasoshima et al. (1995). Mediante estudios electrofisiológicos en animales en libre movimiento, las respuestas de la AMGb hacia el sabor o EC, aumentaron durante la recuperación o evocación del CAS, después del condicionamiento.

Los estudios previos, sugieren que la AMGb es una estructura importante en la formación del CAS. Específicamente se ha propuesto, que la AMGb modula la

consolidación de la memoria, pero regulando el procesamiento de otras estructuras cerebrales (McGaugh 2000). Esto ha sido confirmado, por el trabajo de Miranda y McGaugh (2004). En este estudio, cuando se administraron microinfusiones de un agonista muscarínico (8-bromo adenosín monofosfato 3'-5' cíclico o 8-Br-AMPC, un análogo de AMPC) en la CI, aumentó la intensidad del CAS, pero este efecto fue bloqueado cuando en la AMGb se hicieron microinfusiones de propanolol, un antagonista de receptores β -adrenérgicos. En el mismo sentido, Ferreira et al. (2005), observaron que las infusiones intracerebrales de glutamato en la AMGb, en animales inyectados con una dosis baja de LiCl (la cual es incapaz de inducir un claro aprendizaje aversivo), provocaron un fuerte aprendizaje aversivo. Sin embargo, cuando en la CI los receptores NMDA se bloqueaban con un antagonista, se eliminó el incremento del aprendizaje aversivo provocado por la infusión de glutamato en la AMGb. Estos hallazgos, sugieren que la AMGb y el glutamato posiblemente regulen la consolidación de la memoria en otras estructuras cerebrales, en este caso CI (Ferreira et al. 2005; Miranda & McGaugh 2004).

Otra función, en la cual ha sido implicada la AMGb, es en la extinción del CAS. Al respecto, Bahar et al. (2004; 2003), demostraron mediante microinfusiones en la AMGb, de anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) o propanolol (un bloqueador de los receptores β -adrenérgicos), que tanto la anisomicina como el propanolol, no bloquearon la adquisición [para evaluar la adquisición, las microinfusiones fueron hechas 20 minutos antes (anisomicina) y después (propanolol) de la presentación del EC], pero bloquearon la extinción del CAS (para evaluar el efecto sobre la extinción, la anisomicina fue microinfundida 20 minutos antes y el propanolol inmediatamente después de la realización de la

primera prueba de extinción del CAS). Estos resultados sugieren que la AMGb, podría estar implicada en la formación de un nuevo aprendizaje, el cual ocurre en la extinción. Además de que los receptores β -adrenérgicos, y la síntesis de proteínas están relacionados con la extinción.

Reilly y Bornalova (2005), han propuesto que aunque las lesiones en la AMGb interrumpen CAS, esta alteración parece ser más bien consecuencia de una interferencia en la neofobia. Estos autores al revisar una serie de estudios (para más detalle ver la revisión 2005), encontraron que la interrupción del CAS en animales con lesiones en la AMGb usualmente se acompaña por un consumo mayor del EC sobre el primer ensayo del condicionamiento. Por ejemplo, animales lesionados con ácido iboténico, en la AMGb (Yamamoto 1993; Yamamoto & Fujimoto 1991), en la primera exposición al EC o primer ensayo del condicionamiento, aumentaron el consumo del EC. Un trabajo hecho por Kwon et al. (2008) también podría sugerir este posible rol de la AMGb. Se formaron dos grupos, uno preexposto a sacarosa (grupo sabor familiar) y otro sin exposición previa (grupo sabor novedoso). En el grupo sabor familiar, AMGb, mostró una disminución significativa en el número de células positivas a Fra2 comparado con el grupo sabor novedoso. En la AMGb, no encontraron cambios significativos en la expresión de c-Fos ante la presencia de un estímulo novedoso. Los autores indican que la disminución de Fra2 en la AMGb sugiere una correlación específica con el aprendizaje aversivo a los sabores y que Fra-3 ARNm en la AMGb puede contribuir durante al aprendizaje aversivo al sabor. Del mismo modo, Koh et al. (2003b), tampoco encontraron, en la AMGb cambios en la expresión de c-Fos ante la presencia de un sabor novedoso. De acuerdo a Reilly y Bornalova (2005), la interrupción de la formación del CAS, se debe a esta atenuación de la neofobia. En

un trabajo más reciente (Figuroa-Guzman & Reilly 2008), encontraron que la atenuación de la neofobia gustativa depende de la activación de los receptores NMDA de la AMGb.

3.2.3.4 Corteza insular

La corteza insular (CI) de la rata, ocupa la orilla dorsal del surco rinal y se extiende dorsalmente a los límites de las áreas somatosensorial primaria y secundaria. La CI ha sido dividida dentro de la región anterior, la cual es principalmente agranular, y una región posterior, la cual presenta las áreas disgranular y granular, ocupando la porción dorsal del campo. Caudalmente, el área granular desaparece cerca del nivel del foramen de Monro, y CI agranular se fusiona o mezcla imperceptiblemente con la corteza perirrinal (revisado en Gabella 1995).

La CI ha sido principalmente considerada por décadas como una estructura importante en la formación de la memoria gustativa, en la adquisición y en el almacenamiento del CAS (Bermudez-Rattoni 2004; Bermudez-Rattoni et al. 2004).

Estudios previos indican que la CI juega un papel importante en la codificación de la memoria al sabor (Rosenblum et al. 1997; Rosenblum et al. 1993). Koh et al. (2003b), por ejemplo han reportado un incremento de la expresión de c-Fos en la CI ante la presencia de un sabor novedoso.

Berman et al. (1998), identificaron que la CI se activa ante un sabor novedoso (sabor no familiar), pero no ante un sabor familiar. Estos autores, mediante un análisis Western blot, encontraron que las MAP cinasa (mitogen-activated protein kinase o proteínas cinasas activadas por mitógenos: MAPK), específicamente las cinasas reguladas por señales extracelulares (Extracellular signal-regulated kinases: 1–2: ERK1-2), se activaron dentro de la primera media

hora después del consumo del sabor novedoso. En contraste, ERK1-2 no se activó ante la presencia de un sabor familiar. Los autores concluyen que ERK específicamente se activa ante la presencia de un sabor novedoso. En otro estudio (Berman et al. 2000), veinte minutos antes de la presentación de un estímulo novedoso, se realizaron microinyecciones de antagonistas dopaminérgicos, glutamatérgicos, colinérgicos, β -adrenérgicos y gabaérgicos dentro de la CI. Encontraron que los receptores NMDA, metabotrópicos de glutamato, muscarínicos, β -adrenérgicos y dopaminérgicos, contribuían en la adquisición de la memoria de un sabor nuevo; en este caso, los antagonistas a estos receptores habían bloqueado la memoria al sabor e interrumpieron todo el efecto atenuante de la inhibición latente en el CAS (en la inhibición latente, los animales son preexuestos a un sabor novedoso antes de la adquisición del CAS, esto conduce a una disminución de la aversión adquirida durante el CAS, es decir, la familiaridad del estímulo EC disminuye su efectividad para adquirir la respuesta aversiva). Estudios previos demostraron (1998) que ERK1-2 se activa ante la presencia de un sabor novedoso. Para probar los efectos de los diferentes ligandos de los neurotransmisores sobre la activación de ERK1-2, Berman et al. (2000), realizaron microinfusiones de antagonistas dentro de la CI, 20 minutos antes de la exposición a un sabor novedoso y familiar. Treinta minutos después de la ingesta del sabor (en el cual la activación de ERK1-2 es máxima, 1998), los sujetos fueron sacrificados y sus cerebros fueron procesados para analizar la actividad de ERK1-2. Encontraron que la activación de ERK1-2 por el sabor novedoso depende de los receptores muscarínicos y NMDA. Los antagonistas a los receptores NMDA y muscarínicos bloquearon la actividad de ERK1-2, en animales que habían ingerido el sabor

novedoso, en cambio, cuando se consumió el sabor familiar, no se modificó la actividad basal de ERK1-2 ante la presencia de los antagonistas a los receptores NMDA y muscarínicos..

Miranda et al. (2003), propusieron que la actividad colinérgica en la CI está relacionada con el procesamiento del sabor novedoso. Algunos autores han encontrado (2000), que cuando los sujetos consumen un estímulo novedoso, se eleva la liberación de la acetilcolina cortical comparado con la liberación observada durante la presentación del estímulo familiar. Cuando el estímulo novedoso se presentaba en varias ocasiones, la liberación de la acetilcolina disminuye a niveles que aquellos producidos por el sabor familiar, indicando una relación inversa entre familiaridad y la liberación cortical.

La exposición a un estímulo novedoso en la rata, es seguida por una disminución en la ingesta, esto es conocido como neofobia. Este efecto gradualmente desaparece y el consumo se incrementa desde la segunda presentación del sabor (proceso llamado atenuación de la neofobia). Gutiérrez et al. (2003), utilizaron un procedimiento no aversivo (atenuación de la neofobia; en esta condición los sujetos consumen una solución de sacarina al 0.5% por 15 minutos, posteriormente durante 4 días adicionales se mide el consumo de la sacarina o la respuesta neofóbica) para evaluar la relevancia de los receptores muscarínicos de la CI. Encontraron, que la escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos (microinyectada en la CI, 20 minutos antes, inmediatamente después, o 2 horas después de la primera experiencia al sabor.) bloqueó la atenuación de la neofobia, sugiriendo que los receptores muscarínicos están implicados en la adquisición y consolidación de la atenuación de la neofobia. Sin embargo, el antagonista a los receptores NMDA no tuvo efecto alguno. En

resumen, el bloqueo de los receptores muscarínicos, pero no los NMDA impide que un sabor novedoso llegue a ser familiar.

Por otro lado, la CI ha sido considerada como una estructura importante en el procesamiento de la asociación EC-EI. Al respecto, durante la adquisición del CAS, Ferreira et al. (2006), inyectaron a un grupo de ratas, dosis baja de LiCl (que no induce un claro CAS), y a otro grupo se le inyectó una dosis alta de LiCl, que induce un CAS. Posteriormente se evaluó la expresión de c-Fos en la CI y encontraron que tanto la dosis baja como la dosis alta de LiCl provocaban un incremento en la expresión de c-Fos en la CI. Estos resultados, señalaban a la CI como una zona implicada en la asociación EC-EI, sin importar si la dosis de LiCl es suficiente para inducir CAS (Ferreira et al. 2006).

Berman et al. (1998), han propuesto que la CI es necesaria para la consolidación de la memoria a largo plazo del CAS. En su estudio, antes de la presentación del EC, inmediatamente microinyectaron inhibidores de la expresión de las MAPK/ERK en la CI. Esto provocó, un déficit en la memoria a largo plazo del CAS, sin afectar la memoria a corto plazo, concluyendo que la activación de ERK participa en la consolidación de la memoria aversiva al sabor a largo plazo. Posteriormente, Berman et al. (2000), demostraron que los antagonistas a receptores NMDA, muscarínicos, de glutamato metabotrópicos, β -adrenérgicos, dopaminérgicos, inyectados 20 minutos antes de la ingesta del sabor novedoso o estímulo condicionado, atenuaron el aprendizaje aversivo al sabor. Los autores concluyeron, que estos receptores son importantes para la formación de la memoria del CAS.

Sin embargo, en otro trabajo (Ferreira et al. 2002), encontraron un papel diferencial entre los receptores NMDA y muscarínicos de la CI. Evaluaron la

memoria a corto y largo plazo del CAS; para ello a los animales se les presentó nuevamente el EC, 4 y 72 horas después de la inyección de LiCl. Antes de la presentación del EC, se administraron microinyecciones de escopolamina (un antagonista a los receptores muscarínicos) en la CI,. Estas inyecciones interfirieron con la memoria a corto plazo y largo plazo. El bloqueo de los receptores NMDA, con AP5, antes, pero no después de la presentación del EC, interrumpió la memoria a largo plazo, dejando intacta la de corto plazo. Sin embargo, cuando los sujetos fueron inyectados una hora después de la inducción del malestar, AP5 bloqueó tanto la memoria a corto y largo plazo. Ferreira et al. (2002), sugirieron que los receptores muscarínicos participaban en el procesamiento de la memoria al sabor, mientras que los receptores NMDA estaban implicados en la consolidación de la memoria al sabor (porque las infusiones de AP5, antes pero no después de la presentación del EC, bloquearon la memoria a largo plazo del EC). Sin embargo, estos datos también sugieren que los receptores NMDA están implicados en los estadios tardíos de la adquisición o en la memoria a largo plazo del CAS (Bermudez-Rattoni et al. 2004).

Algunos estudios descritos anteriormente, sugieren que la activación de los receptores NMDA regulan la formación de la memoria del CAS. En la misma línea, Gutiérrez et al. (1999), microinyectando AP5 (2-amino-5-phosphonovalerate acid), un bloqueador de receptores NMDA, en la CI, antes o después del entrenamiento o adquisición del CAS, encontraron que AP5 bloqueaba el aprendizaje aversivo al sabor.

La potenciación a largo plazo (Long-term potentiation: LTP), es considerada una forma de plasticidad sináptica dependiente de actividad, la cual se caracteriza por cambios de larga duración en la eficacia sináptica. La LTP se ha reconocido

como un mecanismo que subyace al aprendizaje y la memoria (Bliss & Collingridge 1993) y los receptores NMDA juegan un rol pivote en la inducción de este fenómeno (Collingridge 1987). Estudios previos (Escobar et al. 1998) demostraron que la estimulación de alta frecuencia en la AMGb inducía LTP en la CI y que el bloqueo de los receptores NMDA interrumpía la LTP de la CI. Posteriormente, Escobar y Bermudez-Rattoni (2000), demostraron que la LTP de la CI (la LTP fue provocada antes del entrenamiento al CAS), inducida por la estimulación de alta frecuencia en la AMG, incrementaba la retención del CAS. Antes del entrenamiento del CAS, Escobar et al. (2002), administraron en la CI, un antagonista competitivo de los receptores NMDA (3-2carboxipiperazin-4-yl-propyl-1-phosphonic acid, CPP) el cual provocó una interrupción de la adquisición del CAS, así como de la LTP inducida en la CI. En cambio, cuando se administraron en la CI, un antagonista de los receptores metabotrópicos de glutamato (RS- α -methyl-4- carboxyphenylglycine, MCPG), no se interrumpió la adquisición del CAS, ni la inducción de la LTP de la CI. Estos hallazgos, sugieren que la LTP dependiente de los receptores NMDA, posiblemente constituye un mecanismo para la memoria del aprendizaje aversivo al sabor.

Recientemente, Castillo et al. (2006), encontraron que las microinfusiones de BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) en la CI, administradas antes del entrenamiento del CAS, aumentaron la retención del mismo. El BDNF es una proteína que puede modificar la eficacia sináptica. Por ejemplo, las microinfusiones de BDNF en la CI (Escobar et al. 2003), inducen una potenciación duradera de la eficacia sináptica, en la CI de la rata. Asimismo, recientemente se demostró (Moguel-Gonzalez et al. 2008), que la liberación de BDNF revierte las deficiencias sobre el CAS, causadas por un inhibidor de la síntesis de proteínas (anisomicina)

administrado en la CI. Todos estos datos, apoyan la idea de que la CI es esencial para la memoria a largo plazo del CAS, donde la LTP y el BDNF participan en su integración.

Por otro lado, se ha encontrado (Desmedt et al. 2003) que el CAS induce una fuerte activación de la proteína de unión CRE (cAMP response element-binding protein) en la CI. Esta proteína es esencial para la formación de la memoria a largo plazo en varias especies y tipos de aprendizaje (Frank & Greenberg 1994).

Otro papel que se le ha adjudicado a la CI, es con respecto a su participación en la extinción. En un estudio realizado por Berman y Dudai (2001), veinte minutos antes de la primera prueba de evocación se administraron en la CI microinfusiones de anisomicina, un antagonista de los receptores NMDA (D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid, APV), propanolol o escopolamina. Los resultados mostraron que sólo la anisomicina y el propanolol bloqueaban la extinción. Por lo tanto, estos datos indicarían que la extinción en el CAS depende de la síntesis de proteínas y de la activación de los receptores β -adrenérgicos.

3.3 Algunas anotaciones del CAS

Diversas líneas de investigación descritas en este capítulo demuestran que la AMGc, AMGb y CI, participan en la formación del CAS. La CI es una de las estructuras donde hay un acuerdo más amplio, con respecto a su función en el CAS. Los datos previos sugieren a la CI como una estructura necesaria en la retención de la memoria aversiva y en la memoria al sabor. Mientras, que en la AMGc y AMGb, no hay un acuerdo general con respecto a la función exacta que cada una de ellas tiene en el CAS. Por ejemplo, ambos núcleos, se describen como dos estructuras implicadas en el procesamiento de la señal visceral. Sin embargo,

a pesar de las discrepancias sobre el papel de la AMG en el CAS, es evidente, que ambos núcleos de la AMG, central y basolateral, juegan un papel importante en el desarrollo del CAS.

Como punto final, describiré un modelo propuesto por Bermúdez-Rattoni et al. (2004), el cual explica algunos posibles mecanismos implicados tanto para el trazo de la memoria al sabor como para la memoria a un sabor aversivo:

- Un nuevo sabor activa al núcleo basal magnocelular [una estructura que se ha visto implicada en la formación de la memoria al sabor (Miranda & Bermudez-Rattoni 1999)], el cual libera acetilcolina hacia la CI y activa los receptores muscarínicos de la misma (Miranda et al. 2000). La activación de los receptores muscarínicos induce la fosforilación de proteínas cinasa de tirosina de la subunidad 2B de los receptores NMDA en la CI (Rosenblum et al. 1997). La inducción del malestar visceral produce liberación de glutamato en la amígdala, activando los receptores NMDA de la CI, en donde la fosforilación previa de la subunidad 2B de los receptores NMDA podría facilitar la respuesta de la entrada glutamatérgica proveniente de la AMG (Escobar et al. 1998; Miranda et al. 2002), de esta forma se cambiaría, el trazo de la memoria de un sabor seguro a un trazo de la memoria aversiva. La formación de la memoria aversiva al sabor, activa la proteína de unión CRE (cAMP response element-binding protein) en la CI (Desmedt et al. 2003), la cual induce síntesis de proteínas que sostienen la consolidación de la memoria al sabor aversiva (Frank & Greenberg 1994).

3.4 Efectos de la estimulación eléctrica en el CAS

Diferentes estudios han mostrado que la estimulación eléctrica subconvulsiva, pueden interferir con el CAS. Cuando este tipo de estimulación fue aplicado entre el intervalo del EC-EI, se observó que el grupo estimulado en AMG no aprendió la tarea. (LePiane & Phillips 1978). Se reportaron, resultados similares cuando la estimulación fue aplicada en diferentes intervalos después de la inyección de apomorfina como **EI**. Los grupos estimulados en AMG, 1 minuto, 30 minutos o 3 horas después del **EI**, mostraron una interrupción del aprendizaje aversivo. Los grupos que fueron estimulados 12 horas después del estímulo incondicionado o durante la extinción aprendieron la tarea aversiva al igual que el grupo control. Lo cual indicaba que la estimulación subconvulsiva en AMG provoca una interrupción del CAS que depende del tiempo ya que si la estimulación es administrada a pocas horas de la asociación del EC-EI produce un bloqueo del CAS (Kesner et al. 1975).

El efecto interruptor de la estimulación subumbral parece ser específico de la AMG, porque la estimulación de otras regiones como por ejemplo, el caudado-putamen o sustancia nigra pars compacta no interfiere con el CAS (LePiane & Phillips 1978).

En un estudio realizado por Mikulka y Freeman (1984), a un grupo de ratas a las cuales se les indujo kindling de la AMG (3 crisis fase 5), fueron entrenadas en el CAS y se formaron los siguientes grupos: un grupo control al cual se le desarrolló kindling, pero no recibió estímulos eléctricos durante la asociación EC-EI, otro grupo con kindling al cual se le aplicó una estimulación eléctrica durante el intervalo EC-EI, es decir 15 minutos antes del EI; otro grupo también con kindling pero que recibió una estimulación eléctrica 15 y 30 minutos después de la inyección de LiCl.

Los grupos a los cuales se les aplicó la estimulación eléctrica durante y después del EI no mostraron aversión, es decir hubo un bloqueo del CAS. Estos resultados indicaban de manera clara que las crisis inducidas en animales con kindling interfieren en el aprendizaje cuando las crisis convulsivas ocurren durante la asociación del EC-EI o inmediatamente después del EI. Sin embargo, los animales con kindling a los cuales no se les aplicó la estimulación eléctrica, durante la asociación EC-EI y después del EI, aprendieron la aversión (Mikulka & Freeman 1984). En otro estudio, realizado por Peele y Gilbert (1992), también reportaron que animales que habían desarrollado kindling, cuando se les administraba una estimulación eléctrica, durante el intervalo EC-EI, interrumpía el aprendizaje aversivo al sabor. Un resultado muy similar fue reportado después de aplicar shocks electroconvulsivos durante la asociación del EC-EI o después del EI. Los animales no mostraron el trazo aversivo (Arthur 1975).

Estos resultados sugieren que las crisis provocadas durante la asociación EC-EI interrumpen el CAS, además indican que aún cuando los animales han desarrollado kindling, si las crisis no son provocadas durante la adquisición del CAS, los animales son capaces de aprender la aversión al sabor. Lo cual indica que el intervalo entre la última crisis influye en la interrupción o no de la memoria aversiva al sabor.

Sólo un trabajo ha reportado (Wig et al. 2002) que el kindling de la AMGb puede facilitar el aprendizaje aversivo al sabor. En este estudio, los animales son estimulados eléctricamente (este era el EI) después de la presentación de una solución con sabor (EC). Posterior a varias estimulaciones, los sujetos significativamente bebieron menos del sabor condicionado. Además cuando se

realizó una prueba de preferencia de sabores, los animales consumieron significativamente menos del sabor que fue pareado con la estimulación kindling. Estos datos fueron interesantes, ya que a estimulación pudo haber bloqueado la memoria del sabor, evitando que se forme la asociación EC-EI, sin embargo, esto no ocurrió porque los sujetos fueron capaces de aprender y recordar la aversión al sabor. Es decir, el EI o estimulación eléctrica no interfirió el proceso asociativo del EC-EI.

CAPÍTULO 4.

4.1 Planteamiento y justificación del problema

Existen datos contradictorios sobre el efecto del kindling en el aprendizaje y la memoria, ya que mientras algunos autores postulan que puede favorecer a estos dos procesos (Wig et al. 2002), otros sugieren que los puede interrumpir (Hannesson & Corcoran 2000). Lo que se ha propuesto, es que el déficit cognitivo depende del intervalo entre la última crisis fase 5 del kindling y la tarea conductual a evaluar (Hannesson & Corcoran 2000).

Por otro lado, una característica notable del fenómeno del kindling, es la enorme variedad de cambios neuronales funcionales y estructurales a corto y a largo plazo que están involucrados en el kindling (Morimoto et al. 2004). Así por ejemplo, se han reportado cambios en los niveles de expresión de las proteínas GAP-43 (Elmer et al. 1996) y Syp (Li et al. 2002), las cuales se expresan en condiciones de plasticidad neuronal (Benowitz & Routtenberg 1997; El Far & Betz 2002; Valtorta et al. 2004). Ambas proteínas, están asociadas a diversas funciones tales como, el remodelamiento sináptico y la regulación de la liberación del neurotransmisor (Benowitz & Routtenberg 1997; El Far & Betz 2002; Valtorta et al. 2004). Estas proteínas también se encuentran involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria (Holahan et al. 2007; Routtenberg et al. 2000). Por lo tanto, el kindling, el aprendizaje y la memoria pueden compartir los mismos mecanismos de plasticidad neuronal.

Dado los antecedentes previos, la finalidad del presente trabajo fue evaluar si el kindling favorece o interrumpe el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), 28 días después de la última fase 5 del kindling. Este intervalo fue

seleccionado, porque Li et al. (2002), encontraron 28 días después de la última crisis fase 5, un aumento en los niveles de expresión de la Syp. Nosotros sugerimos que los cambios observados en los niveles de expresión de la Syp posiblemente afecten el aprendizaje aversivo.

De acuerdo a lo anterior, se propuso evaluar, si los cambios observados en el aprendizaje aversivo de los sujetos con kindling de la AMGc y CI, están relacionados con cambios en los niveles de expresión de GAP-43 y Syp.

Finalmente se compararon los efectos sobre el CAS en un modelo de epilepsia, conocido como estatus epilepticus inducido por ácido kaínico que a diferencia del kindling provoca daño neuronal (Chen & Buckmaster 2005). Esto nos permitirá sugerir que la plasticidad neuronal asociada al kindling es la que provoca cambios importantes en una tarea de aprendizaje como el CAS, y que no son producto del daño neuronal.

4.2 Objetivos generales

- Evaluar si 28 días después de la última crisis fase 5 del kindling de la AMGc y de la CI se facilita o favorece el aprendizaje aversivo al sabor.
- Evaluar si los efectos del kindling sobre el CAS están asociados con modificaciones en los niveles de expresión de la GAP-43 y Syp.
- Evaluar si el modelo del ácido kaínico, el cual induce crisis generalizadas y provoca daño neuronal, produce déficits en el CAS.

4.3 Hipótesis generales

- Veintiocho días después del kindling de la AMGc y CI, aumentará la fuerza del aprendizaje aversivo al sabor.

- Los efectos del kindling sobre el CAS estarán relacionados con modificaciones en la expresión de GAP-43 y Syp
- El modelo del ácido kaínico, el cual produce crisis generalizadas semejantes a las del kindling, interrumpirá el aprendizaje aversivo al sabor.

CAPÍTULO 5. MÉTODO GENERAL

5.1 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).

5.2 Diseño

Se integraron los siguientes grupos:

Ratas implantadas

1. En la AMGc ó en la CI o en el APM pero sin kindling: kindling falso (sham).
2. En CI y con kindling
3. En la AMGc y con kindling
4. En el APM y con kindling (este grupo se utilizó como control, ya que esta estructura no está implicada en el CAS).

5.3 PROCEDIMIENTO:

5.3.1 Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (95mg/Kg) y xilazina (12mg/Kg), y colocadas en el estereotáxico para la implantación de un electrodo bipolar. La implantación se realizó en una de las siguientes estructuras: AMGc derecha, CI derecha y APM derecha. Para la implantación de los electrodos en estos sitios se tomaron las siguientes coordenadas de acuerdo a Paxinos y Watson (1987): AMGc, 4.1 mm lateral a la línea media, 2.1 mm posterior a bregma y 8 mm de profundidad a partir de la duramadre; CI, 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 APM 0.5 mm

lateral a la línea media, 0.2 mm 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 3 tornillos colocados en el cráneo (uno funciona como tierra), los cuales fueron cubiertos con acrílico dental.

5.3.2 Kindling

Una semana después de la implantación, las ratas fueron estimuladas eléctricamente a través del electrodo bipolar para detectar el umbral de la postdescarga (PD) de cada sujeto. Los animales se estimularon con pulsos bifásicos cuadrados de 1 ms de duración, a 60 Hz y con una duración del tren de pulsos de 1 seg. El estímulo inicial fue de 50 μ A y la intensidad se fue aumentando de 50 μ A en 50 μ A hasta la aparición de la PD (espigas rítmicas de alta amplitud que varían en frecuencia y duración). Iniciando el día siguiente, se administró un estímulo diario con los parámetros que se establecieron en la primera postdescarga para cada sujeto. Para la inducción de la PD de la AMGc y CI se requirieron 150 μ A, para el APM se necesitaron 400 μ A.

Después de cada estímulo se registraron las manifestaciones conductuales de los animales y se clasificaron de acuerdo a las 5 fases descritas por Racine (1972): fase 1= clonos facial; fase 2 = fase 1 más 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. Todos los sujetos presentaron al menos tres fases 5 consecutivas al final del procedimiento del kindling.

El tiempo transcurrido entre la última crisis Fase 5 y el día de la adquisición del CAS fue de 28 días.

5.3.2 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 consumo fue medido y registrado, diariamente, con una probeta graduada de 50 ml. En el séptimo día (día de la adquisición), en la sesión matutina el agua fue sustituida por una solución de sacarina al 0.1%; 30 minutos después los animales fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con una solución de LiCl (7.5ml/kg i.p., 0.2M). Durante el día séptimo, octavo y noveno se registró nuevamente la línea base de consumo de agua. En el día 10 y hasta el vigésimo sexto día, sólo en la sesión matutina el agua se sustituyó por la solución con sacarina (en la sesión vespertina se les daba 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).

5.3.3 Análisis estadístico

Se usó un ANDEVA y pruebas Post-hoc Fischer para evaluar el aprendizaje aversivo a los sabores, el número de estímulos totales para inducir la fase 5 y la duración de la postdescarga del kindling.

CAPÍTULO 6. EXPERIMENTOS 1 y 2 (ANÁLISIS DEL KINDLING)

En los experimentos 1 y 2, que posteriormente se describirán en detalle, se indujo a los animales kindling en diferentes estructuras cerebrales para evaluar posibles modificaciones en el CAS. A continuación presentaré únicamente los resultados del desarrollo del kindling eléctrico tomando en cuenta a los sujetos de ambos experimentos para facilitar la presentación y discusión de los resultados. Los resultados sobre el CAS se describirán en cada experimento respectivamente.

6.1 MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 85 ratas macho de la cepa Wistar.

Estos sujetos tienen las mismas condiciones (Procedimiento: cirugía y kindling) descritas en el Método General.

Análisis estadístico

Se usó un ANDEVA y pruebas Post-hoc Fisher para la cuantificación del número de estímulos y la duración de la postdescarga del kindling. El número de estímulos para inducir la primera fase 5, entre los diferentes grupos, se analizó con un ANDEVA de una vía para medidas independientes. La duración de la postdescarga se analizó con un ANDEVA 3 (grupos) x 10 (número de postdescarga) para medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de Fisher.

6.2 RESULTADOS

Histología

El sitio del electrodo (ver figura 2,3 y 4) fue determinado por dos observadores, en donde uno de ellos fue ciego al grupo.

A continuación se describe en la tabla 2, como quedaron conformados los grupos tanto para el experimento 1 como para el experimento 2.

Tabla 2. Distribución de los sujetos en el experimento 1 en donde se evaluó el efecto del kindling sobre el CAS y en el experimento 2 donde se estudiaron los cambios inducidos por el kindling en el CAS asociados a modificaciones en GAP 43 y Syp.

REGIÓN DE IMPLANTE	Exp 1	Exp 2	Total
Corteza Insular (CI)	14	9	23
Amígdala central (AMGc)	15	9	24
Área preóptica medial (APM)	13	8	21
Sham	10	7	17
Totales	52	33	85

Abreviaturas: Exp, experimento

A continuación se presenta la histología de todos los sujetos con kindling

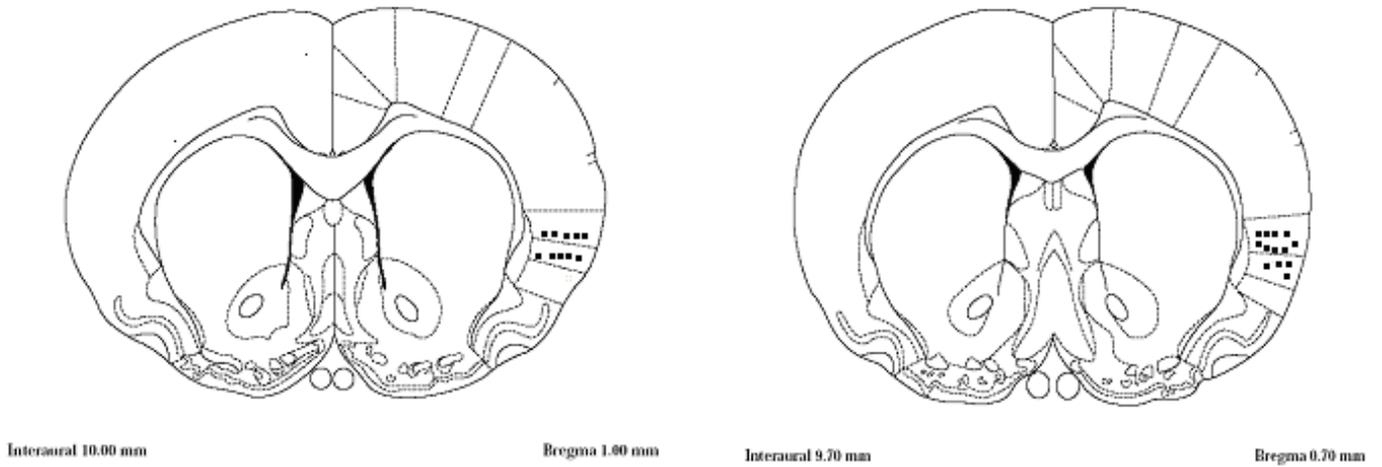


Figura 2. Se muestra el sitio del electrodo para cada uno de los animales que desarrollaron kindling de CI de los experimentos 1 y 2. Los puntos negros representan a cada uno de los sujetos con kindling.

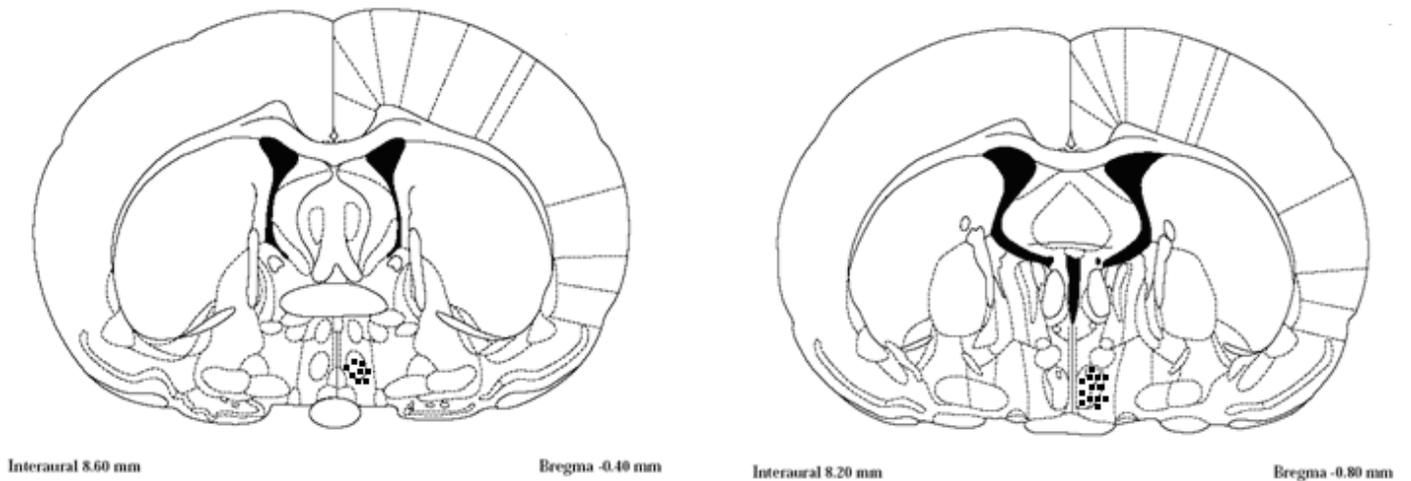


Figura 3. Se muestra el sitio del electrodo para cada uno de los animales que desarrollaron kindling del APM. Los puntos en negro representan a cada uno de los sujetos con kindling.

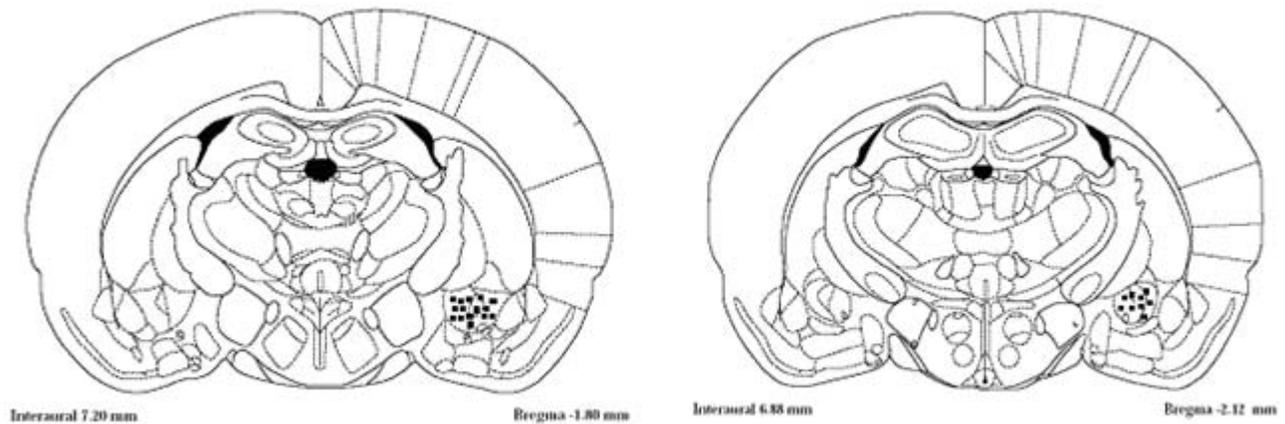


Figura 4. Se muestra el sitio del electrodo para cada uno de los animales que desarrollaron kindling de AMGc. Los puntos en negros representan a cada uno de los sujetos con kindling.

Kindling

El ANDEVA de una vía demostró diferencias significativas en el número de estímulos para inducir la fase 5 ($F_{(2,65)} = 25.96, p < 0.0001$). Las pruebas post hoc demostraron que el APM necesitó más estímulos para inducir la fase 5 con respecto a los animales con kindling de la CI ($p < 0.01$) y AMGc ($p < 0.01$). El número de estímulos para inducir fase 5 en AMGc fue significativamente mayor que para CI. Ver tabla 3.

Tabla 3. Se muestra el número de estímulos para inducir la fase 5. Los datos se expresan como media \pm Error estándar

Sitio estimulado	Número de Estímulos para inducir la Fase 5.
Amígdala central (n=24)	9.88 \pm 0.41
Corteza Insular (n=23)	13.92 \pm 1.34^{AMGc}
Área Preóptica Media (n=21)	22.90 \pm 1.84^{CI,AMGc}

En APM se encontraron diferencias significativas en el número de estímulos para inducir la Fase 5 con respecto a AMGc y CI. En CI también se encontraron diferencias significativas con respecto a AMGc. Todas las $p < 0.05$.

El ANDEVA de la duración de la postdescarga mostró una diferencia significativa en el factor grupo (estructuras estimuladas), $F_{(2,9)} = 537.59$, $p < 0.0001$, en el factor sesión (número de la PD), $F_{(2,9)} = 32.33$, $p < 0.0001$ y en la interacción grupo x sesión, $F_{(2,9)} = 11.25$, $p < 0.0001$ (Fig. 5). Las pruebas post hoc mostraron que la duración de la PD en la CI fue menor mientras que la duración de la PD es mayor cuando se estimula la AMGc y el APM (Fig. 5). También se puede notar un incremento en la duración de la primera PD a la última PD que presentó cada estructura. En la figura 5 se muestra la duración de la PD de la fase 5, en CI se observa que es la que tiene una menor duración con respecto a APM y AMGc ($F_{(17,18)} = 17.18$ $p < 0.0001$).

DURACION DE LA POSTDESCARGA (PD)

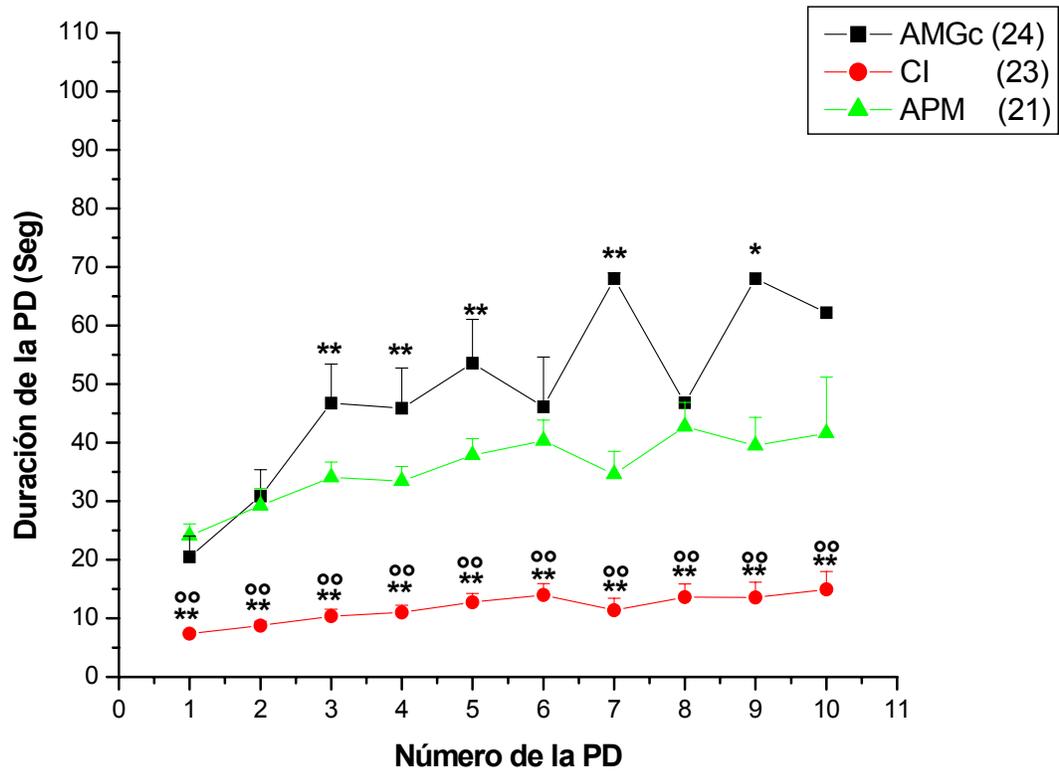


Figura 5. Duración de las postdescargas para cada una de las estructuras estudiadas. Obsérvese como se va incrementando la duración de la PD conforme se desarrolla el kindling. Abreviaturas: AMGc, amígdala central; CI, corteza insular; APM, área preóptica medial. Diferente de APM: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de AMGc: ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar.

6.3 DISCUSIÓN

En el presente estudio las características electroencefalográficas para cada una de las estructuras estimuladas fueron muy semejantes a las descritas en otros estudios. Los sujetos con kindling de la AMGc necesitaron alrededor de 10 estimulaciones, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura en donde se requieren aproximadamente entre 8-15 estímulos para producir la fase 5 (Goddard et al. 1969; Joy 1985; Paredes et al. 1990; Racine 1972b) y la duración de la PD fue de 62 segundos, concordando con lo reportado en la literatura, en donde varía entre 50 y 100 segundos (Adamec et al. 2004; Joy 1985; Morgan et al. 1999; Paredes et al. 1990; Racine 1972b). Para el APM, se ha reportado (Goddard et al. 1969; Paredes et al. 1990; Portillo et al. 2003) que se necesitan entre 17 y 32 estímulos para inducir la fase 5, lo cual es muy semejante a nuestros resultados: 23 estímulos. La duración fluctúa entre 20 y 75 segundos (Morgan et al. 1999; Paredes et al. 1990); en nuestro estudio observamos una duración máxima de la PD de aproximadamente 41 segundos.

Existen escasos estudios que hayan caracterizado el kindling de la CI (Mohapel & Corcoran 1996; 2001). Un estudio más detallado fue realizado por Mohapel et al. (2001), quienes reportaron que se requieren de 4 a 12 estimulaciones eléctricas para inducir la fase 5; en nuestro estudio, se requirieron aproximadamente 14 estímulos para producir la fase 5. Nuestros datos mostraron que la duración de la PD de la primera fase 5, fue de 15 segundos y en el estudio de Mohapel et al. (2001) reportaron una duración aproximada de 16 a 56 segundos.

CAPÍTULO 7. EXPERIMENTO 1 (CAS Y KINDLING)

7.1 INTRODUCCIÓN

Como previamente se describió en la sección 1.6, existe cierta controversia en el efecto que tiene el kindling sobre el aprendizaje y memoria. Este tipo de controversia ha originado ciertas sugerencias aún no comprobadas, las cuales proponen que el déficit cognitivo depende del intervalo entre la última crisis fase 5 del kindling y la tarea conductual.

Dado estos antecedentes, la finalidad del presente trabajo fue evaluar si el kindling favorece o interfiere con CAS, 28 días después de la última fase 5 del kindling.

Como se describió anteriormente, en el capítulo 3, durante el CAS ocurre un fenómeno llamado extinción, proceso que no refleja un proceso de desaprendizaje u olvido del trazo original (la asociación EC-EI que ocurre durante la adquisición del CAS), sino refleja un proceso de reaprendizaje (Rescorla 1996), es decir, el sujeto aprende otra nueva asociación durante la extinción, la relación EC-no EI (**EC**, es la sacarina y **noEI**, es la no presentación del LiCl durante la extinción del CAS). Sin embargo, en la extinción no sólo se puede observar un trazo, sino se expresan dos trazos: la asociación original EC-EI y la asociación EC-no EI. Si los sujetos con kindling muestran una fuerte aversión y un retardo en la extinción con respecto a los sujetos sham, podría sugerirse una alteración en el proceso de extinción o que el aprendizaje aversivo fue muy “fuerte”. Una forma de probar que la extinción no es un olvido, es realizando un segundo CAS pero con dosis bajas de LiCl que no inducen una clara aversión. Entonces si los sujetos han tenido un fuerte aprendizaje durante la adquisición del primer CAS, se espera que después de la extinción del primer CAS, en el segundo CAS con la baja dosis de LiCl recuperen o recuerden

mejor el aprendizaje aversivo. Para ello, los sujetos que previamente habían sido entrenados en el CAS con una dosis alta de LiCl fueron entrenados nuevamente en (segundo CAS) pero con una dosis baja de LiCl, incapaz por sí sola de inducir aversión. Esperábamos que en estos animales el trazo original del primer CAS reapareciera por segunda ocasión; ello sugeriría que el trazo original nunca fue abolido y que probablemente el kindling esté fortaleciendo el aprendizaje aversivo. Esto significa que un estímulo que por sí solo no tiene ningún efecto, es capaz de recuperar la primera asociación EC-EI.

7.2 OBJETIVOS

1. Evaluar si el kindling permite la asociación EC-EI y si modifica la extinción del CAS después de 28 días de la última fase 5.
2. Evaluar si el kindling facilita o fortalece el aprendizaje aversivo al sabor y si este se presenta cuando los sujetos son expuestos a una concentración baja de LiCl que por sí sola no produce aversión.

7.3 HIPÓTESIS

H1: La extinción del CAS se modificará en los animales con kindling de la CI y mostrarán un aprendizaje aversivo más fuerte con una concentración baja de LiCl.

H2: La extinción del CAS se modificará en los animales con kindling de la AMGc y mostrarán un aprendizaje aversivo más fuerte con una concentración baja de LiCl.

H3: La extinción del CAS no se modificará en los animales sham y con kindling del APM y mostrarán un aprendizaje aversivo más débil con una concentración baja de LiCl.

7.4 MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 52 ratas macho de la cepa Wistar.

Estos sujetos tienen las mismas condiciones descritas (Procedimiento: cirugía y kindling) en el método general, excepto en el segundo entrenamiento del CAS

CAS

Veintiocho días después del kindling, los sujetos fueron entrenados en la adquisición del CAS con una concentración de LiCl 0.2M, el cual induce un claro CAS (el procedimiento del CAS fue como el descrito en el método general). Una vez que se extinguió la aversión al sabor en todos los sujetos, se cubrió el primer objetivo del primer experimento.

En estos mismos sujetos, en los cuales la extinción del CAS había ocurrido, fueron nuevamente entrenados en el CAS con dos concentraciones bajas de LiCl, las cuales se han reportado (Berman et al. 2003; Houpt & Berlin 1999) que son incapaces de inducir un aprendizaje aversivo, LiCl 0.015M y 0.030M. Durante dos días (días 1 y 2) se les dio a beber agua en dos sesiones de 10 minutos (mañana y tarde). En el día 3, en la mañana, se les dio de tomar una solución con sacarina al 0.1 % y 30 minutos después, se les inyectó la solución de LiCl 0.015M. En los días 4, 5 y 6, a los sujetos, nuevamente se les dio agua (en la mañana y tarde). En el día 7 y los restantes días, se volvió a dar sacarina en la mañana, con la finalidad de medir la fuerza de la aversión al sabor. Cuando se extinguió la aversión al sabor, se realizó otro entrenamiento del CAS, pero con la otra concentración baja de LiCl 0.030M. En todas las sesiones vespertinas, tanto del primer como de los

subsiguientes condicionamientos, se les dio agua a los sujetos. Con esto último se cubría el segundo objetivo de este primer experimento.

Histología

Una vez terminado el CAS, los sujetos fueron anestesiados con una sobredosis de anestésico y perfundidos vía intracardíaca con 150 ml de PBS 0.1 M (pH 7.4) seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M a temperatura ambiente. Los cerebros fueron extraídos y mantenidos en sacarosa al 30% y en buffer fosfato 0.1M (pH 7.4) a 4°C. Posteriormente, los cerebros fueron congelados y utilizando un microtomo se hicieron cortes de 40µm. Por último, los cerebros fueron montados y teñidos con violeta de cresilo para la verificación histológica del sitio del electrodo.

Análisis estadístico

Para medir la fuerza de la aversión o la intensidad de la respuesta aversiva, entre los diferentes grupos, se analizó con un ANDEVA 4 (grupos) x 26 (días de consumo) para medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de Fisher.

Los resultados de este experimento fueron divididos en dos partes. La parte "A", evaluar si el kindling permite la asociación EC-EI y si modifica la extinción del CAS después de 28 días de la última fase 5 y la parte "B" incluye los resultados del experimento que cubren el segundo objetivo; es decir, evaluar si el kindling incrementa la intensidad de la respuesta aversiva y si se presenta el aprendizaje aversivo cuando los sujetos son expuestos a una concentración baja de LiCl que por sí sola no produce aversión.

7.5 RESULTADOS PARTE A (PRIMER OBJETIVO)

Localización del electrodo

En la figura 7 se muestra la localización del electrodo en cortes teñidos con violeta de cresilo.

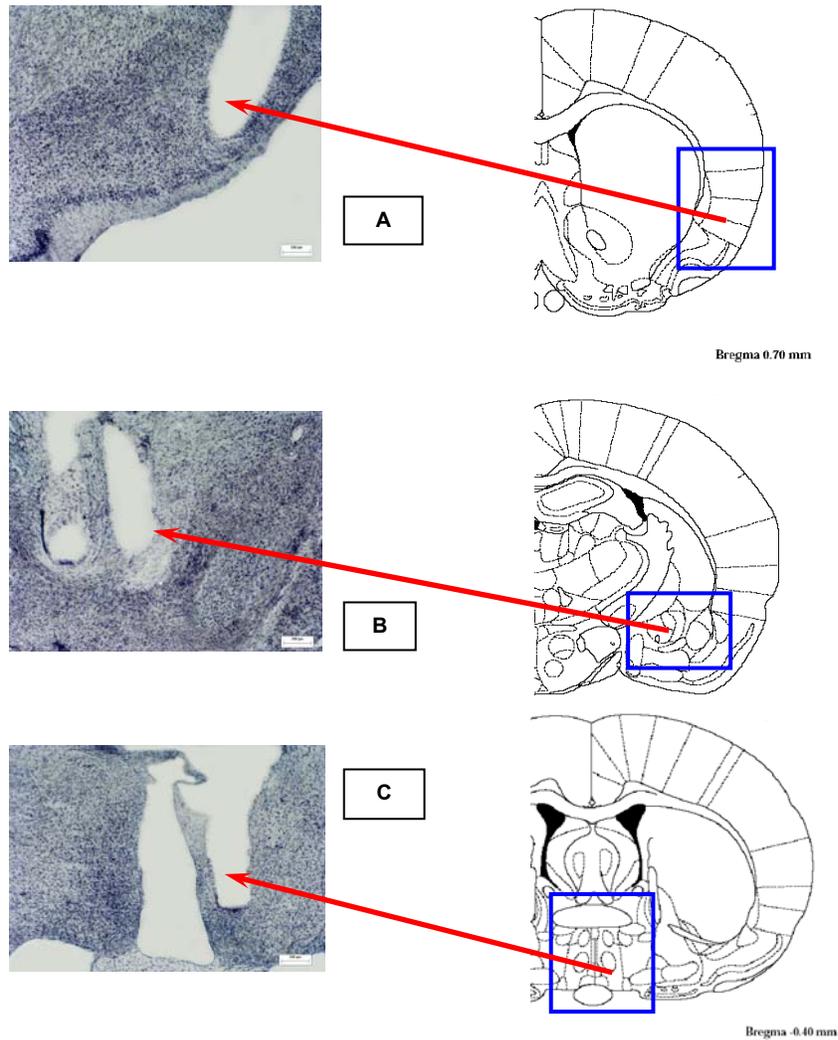


Figura 7. Cortes de cerebro teñidos con violeta de cresilo, en donde se muestra el sitio del electrodo de animales con kindling de la corteza insular (A), amígdala central (B) y área preóptica medial (C). Para una una mejor ubicación del sitio del electrodo, en el lado derecho, se muestra la representación gráfica de cortes de cerebro, tomados del atlas de Paxinos y Watson (1987).

CAS

En la figura 8 se observa la curva de adquisición y extinción del CAS, en animales con kindling que fueron inyectados con una concentración de LiCl (0.2M). Se encontró que los animales sham y con kindling de la CI, de la AMGc y del APM aprendieron la asociación estímulo condicionado-estímulo incondicionado (EC-EI). Utilizando un ANDEVA 4 (grupos) x 26 (días de consumo) para medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de Fisher, se encontraron diferencias significativas en el factor A (Grupos) $F_{(3,25)} = 4.32$, $p = 0.008$, en el factor B (días de consumo) $F_{(3,25)} = 59.287$, $p < 0.0001$ y en la interacción A x B, $F_{(3,25)} = 1.33$, $p = 0.046$. Estos datos mostraron que los animales con kindling de la CI después de 28 días sin estimulación eléctrica, mostraron un retraso en la extinción. Estos sujetos consumieron menos sacarina, a partir del día 12, que los grupos de APM y sham ($p < 0.01$, $p < 0.05$) y también consumieron menos sacarina los días 19, 20 y 22 con respecto al grupo AMGc ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Esto puede indicar un incremento en la intensidad de la respuesta aversiva de los animales con kindling de la CI. Los animales con kindling de la AMGc consumieron significativamente menos sacarina ($p < 0.05$) en los días 14, 15, 16, 17 y 18 con respecto al grupo APM y en los días 18 y 23 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) con respecto al grupo sham. El consumo de sacarina fue similar entre los grupos sham y APM, no encontrándose en ninguno de los días diferencias significativas con respecto al consumo de sacarina ($p > 0.05$).

CAS EN ANIMALES CON KINDLING

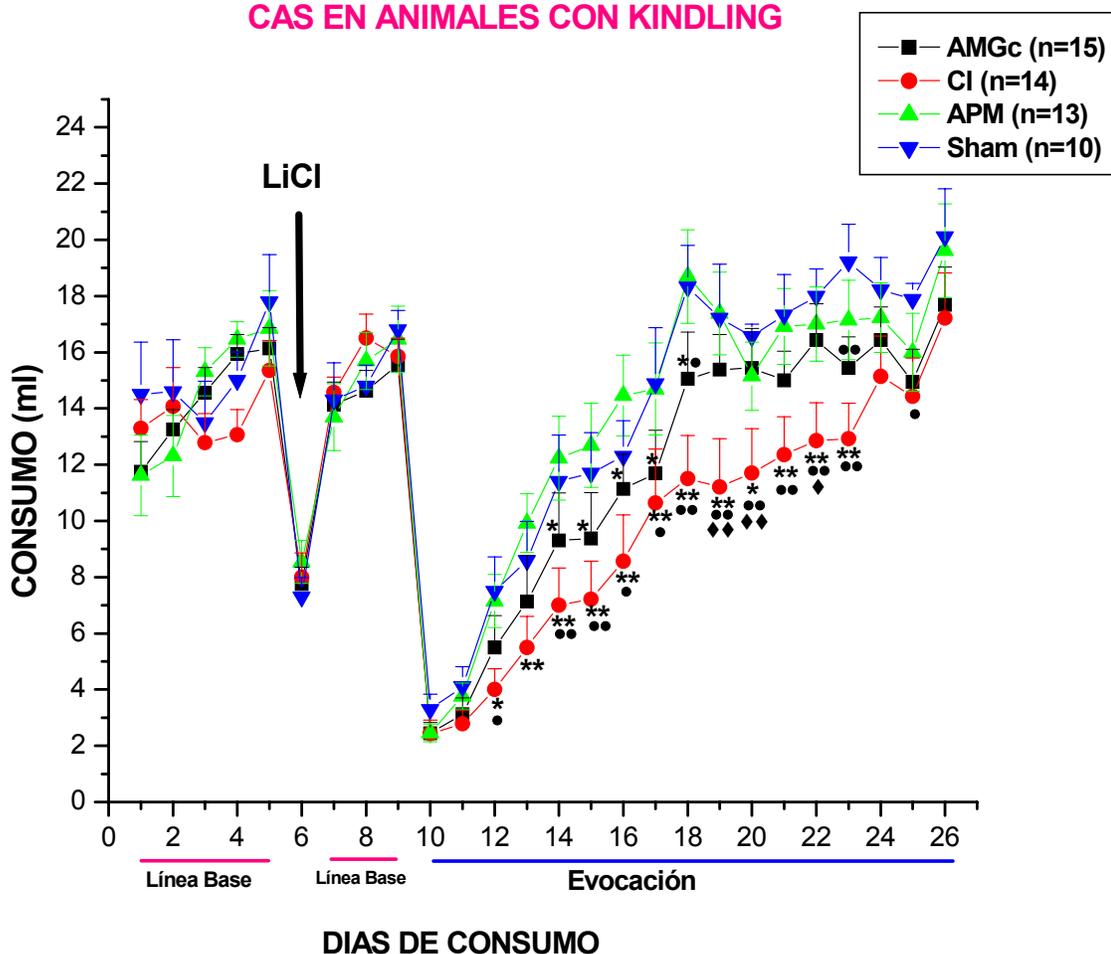


Figura 8. Se muestran los resultados del CAS de animales que desarrollaron kindling y que fueron inyectados con una concentración (LiCl, 0.2M) que induce aversión a los sabores. Los días 1 a 5 son la línea base o de entrenamiento. En el día 6 se pareó el estímulo condicionado (Sacarina) y el estímulo incondicionado (LiCl). Los días 7, 8 y 9 son la línea base, a partir del día 10 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos: implantados; AMGc, amígdala central; CI, corteza insular; APM, área preóptica medial y sham. Diferente de APM: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de sham: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de AMGc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar. Se usó un ANDEVA de dos vías y prueba Post hoc Fisher

En resumen, tanto los sujetos con kindling como los sham aprendieron el CAS. Específicamente, los animales con kindling de la CI mostraron una aversión más fuerte hacia la sacarina con respecto a los sujetos sham y APM. En algunos días, los animales con kindling de la AMGc mostraron una aversión fuerte hacia la sacarina, aunque la aversión más fuerte fue en los sujetos con kindling de la CI.

7.6 DISCUSIÓN

CAS

Los resultados del presente experimento demuestran que todos los sujetos con kindling y sham, fueron capaces de aprender la tarea aversiva. Estos datos van en contra de la idea general de que el kindling produce déficits en el aprendizaje y memoria de diversas tareas (revisar Hannesson & Corcoran 2000). Así por ejemplo, Hanesson y Corcoran (2001b) han reportado que ratas con kindling completo en el hipocampo dorsal, muestran un deterioro en la adquisición y memoria a corto plazo, en una tarea de laberinto acuático. Con relación a los efectos del kindling sobre el CAS, se ha observado que produce tanto déficits (Mikulka & Freeman 1984; Peele & Gilbert 1992) como una facilitación en el aprendizaje aversivo al sabor (Wig et al. 2002). En el trabajo de Mikulka y Freeman (1984), la interrupción del aprendizaje aversivo fue debido, a que los sujetos con kindling completo recibieron nuevamente estímulos eléctricos en el día del entrenamiento del CAS, en el intervalo EC-EI. En el mismo trabajo de Mikulka y Freeman, los sujetos que no recibieron ninguna estimulación eléctrica en el intervalo EC-EI, aprendieron el CAS, lo cual enfatizaba que la estimulación eléctrica durante el entrenamiento del CAS era la que bloqueaba este aprendizaje asociativo.

En relación a la facilitación del CAS, el estudio de Wig et al. (2002) fue interesante, ya que en lugar de usar el LiCl como **EI**, lo sustituyeron por la estimulación eléctrica que induce kindling, es decir, dicha estimulación fue el **EI**. Sorprendentemente, los sujetos con kindling consumieron menos cantidad de sacarina que los sujetos control, lo cual no sólo indicaba que los sujetos habían

aprendido el CAS, sino que la aversión hacia la sacarina fue mayor que los animales control. Estos resultados, contradicen los datos obtenidos por Mikulka y Freeman (1984); Peele y Gilbert (1992) en los cuales, el kindling interrumpe el CAS. Recientemente, se reportó (Leung & Shen 2006) que animales con kindling parcial de la región de CA1 que fueron entrenados en una tarea de laberinto acuático, mostraron deficiencias en la retención de la memoria espacial durante 4 semanas, pero no a la séptima u octava semana después del kindling. El trabajo de Leung y Chen (2006), y nuestros resultados, pueden sugerir que el efecto amnésico del kindling depende del intervalo de estimulación eléctrica y la tarea a evaluar.

Algunos trabajos, han sugerido (Adamec & Young 2000; Adamec 1999; Morgan et al. 1999) que el kindling posiblemente incremente la función de la estructura estimulada. Un ejemplo, que refleja claramente este efecto del kindling, fue el trabajo de Morgan et al. (1999), en donde observaron que el kindling de APM (una zona que favorece la conducta materna) de ratas hembra vírgenes (sin experiencia materna), facilitaba su conducta materna hacia las crías, mientras que el kindling de la amígdala medial (una estructura que inhibe la conducta materna) de ratas hembra con experiencia materna disminuía su conducta materna. Estos datos demostraban claramente, que el efecto del kindling sobre la conducta dependía de la estructura que se había estimulado y que además esta función se incrementaba con la estimulación eléctrica. Es difícil saber de qué depende el efecto facilitatorio del kindling, probablemente dependa de la tarea que se está evaluando y del momento en que se entrene al sujeto en una tarea de aprendizaje y memoria. Hasta el momento, no se ha observado que el kindling facilite el aprendizaje en un tarea de laberinto acuático, únicamente se ha reportado que el

efecto amnésico del kindling en esta tarea, parece ser transitorio (Leung & Shen 2006), pero no se conoce, si después de este tiempo los sujetos son capaces de aprender mejor la tarea .

En nuestro experimento, los sujetos con kindling de la CI y AMGc mostraron una mayor aversión hacia la sacarina que los sujetos sham y con kindling del APM. Estos resultados muestran que el kindling provocó cambios en la aversión en las estructuras principalmente implicadas en el CAS, la CI y AMGc (Bahar et al. 2003; Bermudez-Rattoni 2004). Este efecto no se observó en el APM, una estructura que participa en otras funciones, como la conducta sexual (Portillo et al. 2003). Los datos de nuestro experimento nos sugieren que el kindling de la CI, probablemente esté facilitando el aprendizaje aversivo, aunque el efecto no fue tan claro para los animales con kindling de la AMGc.

Aunque los sujetos con kindling de la CI y AMGc consumieron menos sacarina que los sujetos con kindling del APM y sham, no podemos conocer específicamente en cuáles fases del CAS pudo haber actuado el kindling.

Se ha señalado a la CI como una estructura esencial en la formación de la memoria a largo plazo del CAS (Berman & Dudai 2001; Berman et al. 2000; Bermudez-Rattoni 2004; Bermudez-Rattoni et al. 2004). Por lo tanto, es probable que el kindling de la CI favoreciera la formación de la memoria a largo plazo del CAS. La atenuación de la neofobia (disminución de la neofobia inicial del sabor novedoso) pudo ser afectada por el kindling de la CI, es decir, el aumento aversivo en los sujetos con kindling de la CI pudo ser ocasionado por una disminución en la atenuación de la neofobia. Se ha reportado que la CI es importante en la adquisición y consolidación de la atenuación de la neofobia (Gutiérrez et al. 2003) .

En el caso de los animales con kindling de la AMGc, aunque el efecto sobre el CAS fue menos claro, es posible que el bajo consumo de la sacarina sea producto de la fuerte asociación durante la adquisición del CAS debido a un aumento en la percepción de la intensidad del estímulo incondicionado o tal vez a que el kindling esté favoreciendo la memoria a largo plazo del CAS. Esto es una posibilidad ya que a la AMGc se le ha relacionado con el procesamiento de la información visceral (Koh et al. 2003a) y la memoria a largo plazo del CAS (Bahar et al. 2003),

Con respecto a la neofobia, nuestros resultados, indican que la neofobia observada en el primer día de la presentación de la sacarina o estímulo condicionado, no se vio afectada en los sujetos con kindling de la CI y AMGc. Es decir, cuando la sacarina es presentada por primera vez, los sujetos no muestran alteraciones en la neofobia, su consumo inicial de la sacarina, es similar al de los sujetos sham y con kindling del APM.

Los efectos del kindling sobre el CAS, se observaron en los sujetos con kindling en las estructuras relacionadas al CAS. Los sujetos estimulados en la CI y AMGc mostraron un aumento en la aversión con respecto a los grupos sham y las ratas con kindling del APM, una estructura no relacionada con el CAS. Esto último, nos lleva al planteamiento sobre la especificidad funcional del kindling. Sólo en las estructuras relacionadas al CAS se observó el efecto del kindling, mientras en las no relacionadas con este aprendizaje no se observó ningún cambio en el CAS. Esta especificidad funcional del kindling ha sido confirmada por otros autores (Hannesson et al. 2005; Morgan et al. 1999; Paredes et al. 1990) en otro tipo de conductas (materna, sexual, memoria, etc.).

Extinción

Los sujetos con kindling de la CI, presentan un retardo en la extinción del CAS (los animales logran extinguir la aversión hacia la sacarina, pero esta se extingue más lentamente). Este retardo en la extinción puede ser interpretado de dos formas: 1) los sujetos con kindling de la CI presentaron un aprendizaje más fuerte que los animales sham y con kindling del APM ó 2) los sujetos presentaron algunas deficiencias para reaprender que la sacarina no les produce ningún malestar gastrointestinal. Previamente, se describió en los antecedentes que la extinción es un fenómeno de reaprendizaje, en donde el sujeto aprende con el tiempo que la sacarina no le produce ningún malestar gástrico. Sin embargo, en la extinción también se mide la fuerza del aprendizaje aversivo de la asociación sacarina-LiCl (primer aprendizaje o asociación EC-EI).

El retardo en la extinción de los sujetos con kindling, puede ser el resultado de esta competencia entre estos dos aprendizajes observados durante la extinción, la cual depende de la intensidad del entrenamiento o del aprendizaje original (Berman & Dudai 2001) es decir, si el entrenamiento o aprendizaje original es muy fuerte, el trazo **EC-noEI** puede no ganar apreciable control sobre la conducta (Eisenberg et al. 2003):, esto significa que los sujetos al presentar un aprendizaje aversivo muy fuerte por la primera asociación (EC-EI), tardarán más tiempo en extinguir su aprendizaje aversivo. Por lo tanto, durante la extinción los sujetos tardarán más tiempo en aprender que la sacarina no les produce el malestar gastrointestinal, entonces la primera asociación o aprendizaje (EC-EI), tomará control (porque es el trazo dominante) sobre el segundo aprendizaje o asociación (EC-noEI) (Berman & Dudai 2001).

Para tratar de discernir este punto se diseñó el experimento 1B en el cual se realizó un segundo CAS pero con dosis bajas de LiCl que no inducen una clara aversión. Si el trazo original del primer CAS reaparece por segunda ocasión esto permitirá sugerir que el kindling fortaleció el aprendizaje aversivo.

7.7 RESULTADOS-PARTE B (SEGUNDO OBJETIVO)

Hay que tomar en cuenta que para la realización de este segundo objetivo, se utilizaron los mismos del experimento 1. Sin embargo, dos animales se enfermaron y fueron eliminados, antes de comenzar este segundo CAS, de los cuales, un animal pertenecía al grupo de kindling del APM y el otro animal al grupo sham, quedando la muestra como sigue: 15 sujetos con kindling de la AMGc, 14 sujetos con kindling de la CI, 12 sujetos con kindling del APM y 9 sujetos sham.

Como previamente se describió en el procedimiento del experimento 1, en estos mismos sujetos, en los cuales la extinción del CAS había ocurrido, fueron entrenados nuevamente en el CAS con dos concentraciones bajas de LiCl, las cuales son incapaces de inducir un aprendizaje aversivo: 0.015M y 0.030M (Berman et al. 2003; Houpt & Berlin 1999). Para cada dosis, los datos del CAS se analizaron con un ANDEVA 4 (grupos) x 12 (días de consumo) para medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de Fisher.

Segundo y tercer CAS

Se encontraron diferencias significativas con una concentración de LiCl 0.015M en el factor A (Grupos), $F_{(3,11)} = 3.506$, $p = 0.022$, en el factor B (días de consumo) $F_{(3,11)} = 3.396$, $p = 0.0001$ y en la interacción A x B, $F_{(3,11)} = 1.790$, $p = 0.005$. Con una dosis 0.030M, también se encontraron diferencias significativas en el factor A (Grupos) $F_{(3,11)} = 3.524$, $p = 0.021$, en el factor B (días de consumo) $F_{(3,11)} = 12.574$, $p < 0.0001$, en la interacción A x B, $F_{(3,11)} = 1.816$, $p < 0.004$. Para

ambas dosis (0.015 y 0.030) los animales con kindling de la CI mostraron una mayor aversión. Esto se mantuvo alrededor de 5 días durante la extinción (figura 9 y 10). Los animales con kindling de la AMGc mostraron una mayor aversión sobre todo con la dosis de 0.030 (ver figura 10). Con ambas dosis de LiCl, el consumo de sacarina fue similar entre los grupos sham y APM, no encontrándose diferencias significativas ($p>0.05$).

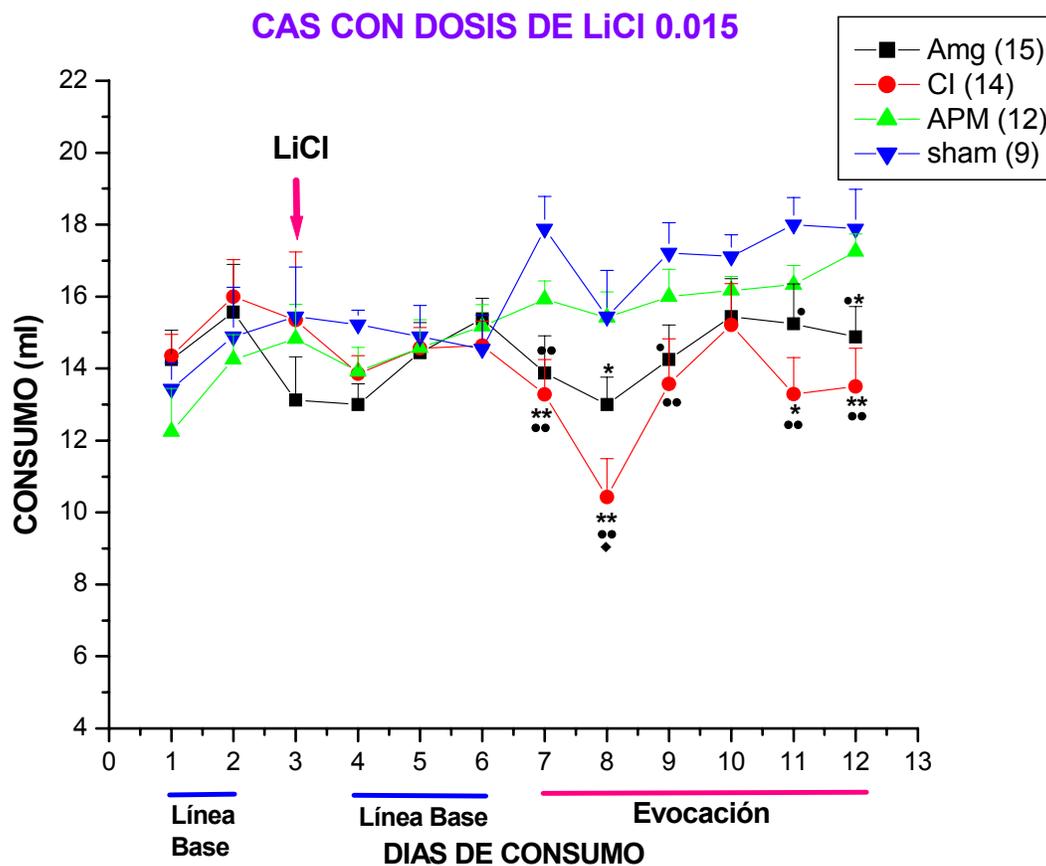


Figura 9. Se muestran los resultados del CAS de animales que desarrollaron kindling y que fueron inyectados con una concentración (LiCl, 0.015M) que no induce aversión. Estos animales habían sido previamente entrenados con una concentración de LiCl 0.2M que induce el CAS. El entrenamiento del CAS con la concentración baja de LiCl (0.015M), fue hecho una vez que la aversión al sabor se había extinguido con la dosis de 0.2M. Los días 1 a 2 son la línea base o de entrenamiento. En el día 3 se pareó el estímulo condicionado (Sacarina) y el estímulo incondicionado (LiCl). Los días 4, 5 y 6 son la línea base, a partir del día 7 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos implantados en; AMGc, amígdala central; CI, corteza insular; APM, área preóptica medial y Sham. Diferente de APM: * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Diferente de Sham: * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Diferente de AMGc: * $p<0.05$. Los datos se expresan como media \pm Error estándar. Se usó un ANDEVA de dos vía y prueba Post hoc Fisher

CAS CON UNA DOSIS DE LiCl 0.030M

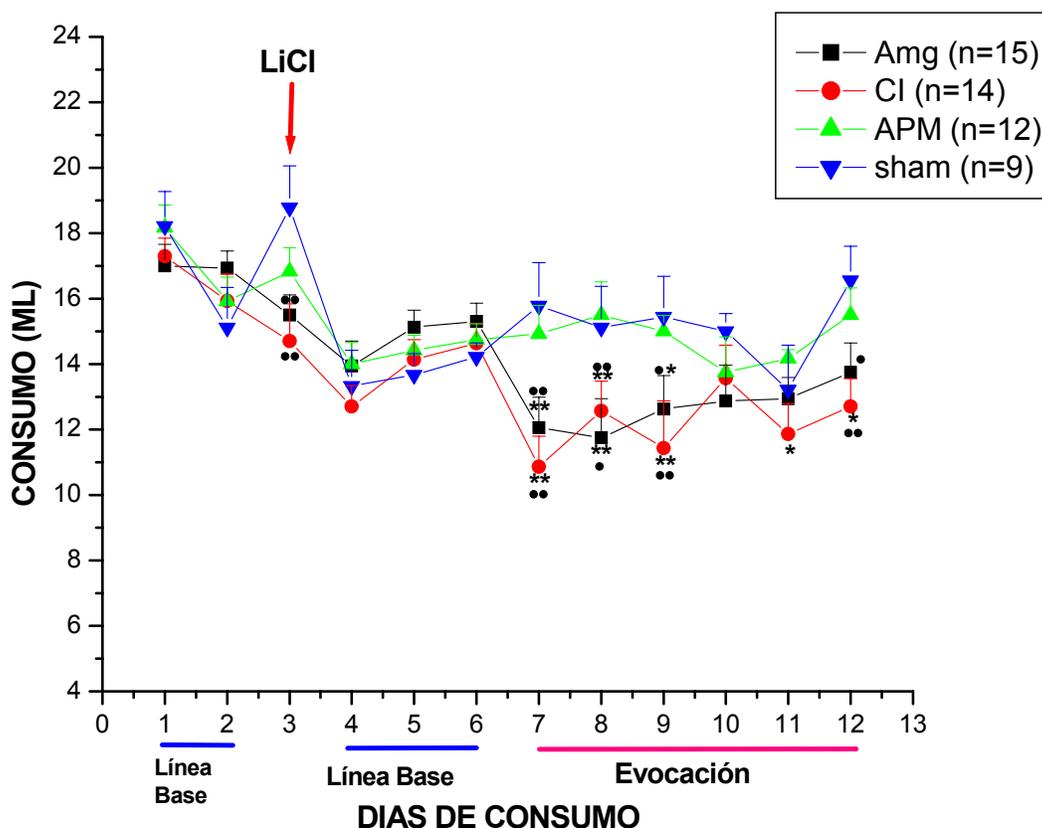


Figura 10. Se muestran los resultados del CAS de animales que desarrollaron kindling y que fueron inyectados con una concentración (LiCl, 0.030M) que no induce aversión. Estos animales habían sido previamente entrenados con una concentración de LiCl 0.015M que induce el CAS. El entrenamiento del CAS con la concentración baja de LiCl (0.030M), fue hecho una vez que la aversión al sabor se había extinguido con la dosis de 0.015M. Los días 1 a 2 son la línea base o de entrenamiento. En el día 3 se pareó el estímulo condicionado (Sacarina) y el estímulo incondicionado (LiCl). Los días 4, 5 y 6 son la línea base, a partir del día 7 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos implantados en: AMGc, amígdala central; CI, corteza insular; APM, área preóptica medial y Sham. Diferente de APM: * p<0.05, ** p<0.01. Diferente de Sham: *p<0.05, **p<0.01. Los datos se expresan como media \pm Error estándar. Se usó un ANDEVA de dos vía y prueba Post hoc Fisher.

En resumen, los animales con kindling de la CI al parecer recuperan la aversión (la aversión hacia la sacarina no es tan fuerte con respecto al primer consumo de la sacarina) del primer condicionamiento con ambas dosis de LiCl que no son efectivas para inducir CAS. Los sujetos con kindling de CI mostraron una mayor aversión con ambas concentraciones de LiCl que los sujetos sham y los grupos con kindling de AMGc y del APM. En el caso de los animales con kindling de la AMGc mostraron una mayor aversión principalmente con la concentración de 030M que los sham y los animales con kindling del APM. Los sujetos sham y con kindling del APM no mostraron aversión con ninguna de las dosis bajas de LiCl.

7.8 DISCUSIÓN

El efecto más notable fue para los sujetos con kindling de la CI, ya que con ambas concentraciones de LiCl la aversión siempre fue mayor en estos sujetos. Aunque en el caso de los sujetos con kindling de la AMGc, la aversión principalmente observada fue con la concentración de LiCl 0.030M. En los animales con kindling del APM y sham no mostraron aversión hacia la sacarina con la concentración baja de LiCl 0.015M. En el CAS con la concentración 0.030M, los sujetos sham y los sujetos con kindling del APM, consumieron menos sacarina durante la evocación del CAS que con respecto al consumo de la sacarina durante la adquisición. Sin embargo, en estos mismos sujetos (sham y con kindling del APM), como se puede observar en la gráfica (fig. 9), el consumo de la sacarina, durante la evocación es muy similar con respecto al consumo de agua en los días 4-6. Esto lleva a la pregunta, si en realidad los sujetos, entrenados en el tercer condicionamiento (LiCl 0.030), habían recuperado la aversión del primer condicionamiento con la concentración de LiCl 0.030M. Los sujetos con kindling en CI y AMGc con la concentración de LiCl 0.015M, en el último día de la extinción,

bebieron una cantidad similar de sacarina al consumido durante el día de la adquisición del CAS; sin embargo, en el último día de la extinción del CAS (día 12) seguían bebiendo menos sacarina con respecto a los sujetos sham y con kindling del APM, esto último pudo afectar el entrenamiento del siguiente CAS, cuando se utilizó la concentración de LiCl 0.030M, ya que durante la adquisición del CAS con la concentración de LiCl 0.030M, el consumo de la sacarina fue menor en los sujetos con kindling de CI y AMGc. Esto, podría ser una consecuencia de que los sujetos durante el último día de la extinción del CAS con la concentración de LiCl 0.015M, habían mostrado diferencias con respecto a los sujetos sham y con kindling del APM, afectando la aversión observada con 0.030 en los animales con kindling de la AMGc y CI, magnificando el efecto aversivo de esta concentración.

Como los sujetos sham y con kindling del APM (probablemente también los sujetos con kindling de AMGc) no mostraron una recuperación de la respuesta aversiva con la dosis baja de LiCl, esto nos sugería que nuestros datos con la concentración 0.015 M (incluyendo la de 0.030, por las críticas previamente descritas), no concordaban con los observados por Berman et al. (2003), en donde ellos encontraron una clara recuperación de la respuesta aversiva con la concentración 0.015M. Es muy probable que el método para evaluar la aversión haya influido en nuestros resultados, ya que Berman et al. (2003), utilizaron un método diferente para evaluar el CAS, la prueba de dos botellas simultáneas, mientras que nosotros usamos la prueba de una botella. Se ha demostrado (Dragoin et al. 1971; Grote & Brown 1971), que el método o prueba de dos botellas es más sensible que el de una botella cuando el objetivo es la detección de un CAS débil. Esto sucede porque al usar dos botellas, la rata evita el EC (la sacarina) porque bebe el agua que contiene la otra botella, por lo tanto, ello amplifica la

magnitud de una aversión débil (Dragoin et al. 1971). Cuando nosotros empleamos la concentración de 0.015 y 0.030, no se pudo observar una clara recuperación de la respuesta aversiva (tanto en los grupos sham y con kindling de AMGc, CI y APM) porque estábamos usando una botella, lo cual no permitía tener la misma sensibilidad con dosis tan bajas de LiCl, evitando de esta forma evaluar la recuperación de la respuesta aversiva. Sin embargo, la prueba de dos botellas puede no ser efectiva para comparar grupos cuando poseen fuerzas aversivas diferentes, por lo que se ha sugerido que el método de una botella es mejor para evaluar diferencias entre grupos (Batsell & Best 1993). Como el método de dos botellas amplifica la aversión, los grupos que posean aversiones débiles mostrarán una amplificación de la respuesta aversiva, por lo tanto, cuando se comparen con los grupos con una fuerza aversiva mayor, los resultados pueden no mostrar diferencias entre los grupos, debido a que los sujetos con aversiones débiles fueron amplificadas por usar la prueba de dos botellas (Batsell & Best 1993). En los siguientes experimentos, se utilizará otra concentración baja de LiCl, cuya concentración será 0.075M, la cual se ha utilizado en la misma prueba (una botella) que nosotros usamos y que no induce un claro CAS, tal como ha sido reportado por Miranda et al. (2002).

Sin embargo, a pesar de las críticas sobre el experimento con las dosis bajas de LiCl, lo interesante es que aún considerando que nuestro método de una botella es menos sensible para detectar diferencias con la dosis baja de LiCl, los sujetos con kindling de AMGc y CI, durante el condicionamiento en donde se empleó la concentración LiCl 0.015M, mostraron una aversión mayor con respecto a los sham y los animales con kindling del APM. Esto nos sugiere que la aversión después de la extinción, en estos sujetos no se había borrado por completo.

Estos experimentos volverán a replicarse, pero cambiando la dosis de LiCl como se mencionó anteriormente y empleando sólo dos condicionamientos, el primero con una dosis alta de LiCl 0.2M, el cual provoca un claro CAS y el otro con una dosis baja de LiCl 0.075, el cual es incapaz de inducir un claro CAS (Miranda et al. 2002). La finalidad no sólo será corregir los errores previos, sino evaluar la expresión de GAP-43 y Syp en sujetos con kindling y CAS.

Algunos otros aspectos importantes de la recuperación de la respuesta aversiva serán tratados en la discusión del segundo experimento, en donde usamos una dosis empleada con el mismo método del CAS que nosotros utilizamos.

CAPÍTULO 8. EXPERIMENTO 2 (GAP-43 Y SINAPTOFISINA)

8.1 INTRODUCCIÓN

Como previamente se describió en la sección 1.2, la GAP-43 y la Syp son dos proteínas que median diferentes procesos importantes de la plasticidad neuronal. Por un lado, la GAP-43 juega un rol clave guiando el crecimiento de axones, modula la formación de nuevas conexiones y la liberación del neurotransmisor. Por el otro, se han propuesto distintas funciones en las que participa la Syp: regulación de la liberación del neurotransmisor; biogénesis y reciclaje de las vesículas sinápticas y regulación de la formación de la sinapsis. Ambas proteínas, también están relacionadas como el aprendizaje y la memoria. En el kindling también se han observado modificaciones en los niveles de expresión, tanto de la GAP-43 como de la Syp (Bendotti et al. 1993; Li et al. 2002).

De acuerdo a lo anterior, se propuso evaluar, el siguiente objetivo.

8.2 OBJETIVO

Evaluar si los cambios observados en el CAS de animales con kindling de la CI y AMGc, están asociados a modificaciones en los niveles de expresión de GAP-43 y Syp,

8.3 HIPÓTESIS

H1: Los cambios en la expresión de la Syp en CI, están asociados con el incremento en la intensidad de la respuesta aversiva de los animales con kindling en CI.

H2: Los cambios en la expresión de la Syp en AMGc, están asociados con el incremento en la intensidad de la respuesta aversiva de los animales con kindling de la AMGc.

H3: Los cambios en la expresión de la GAP-43 en CI, están asociados con el incremento en la intensidad de la respuesta aversiva de los animales con kindling en CI.

H4: Los cambios en la expresión de la GAP-43 en AMGc, están asociados con el incremento en la intensidad de la respuesta aversiva de los animales con kindling de la AMGc.

8.4 MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 33 ratas macho de la cepa Wistar. Estos sujetos tienen las mismas condiciones descritas (Procedimiento: cirugía y kindling) en el método general, excepto en el segundo entrenamiento del CAS

CAS

Veintiocho días después del kindling, los sujetos fueron entrenados en la adquisición del CAS con una concentración de LiCl 0.2M (el procedimiento del CAS fue como el descrito en método general). Una vez que se extinguió la aversión en estos sujetos, se realizó un segundo condicionamiento: Durante dos días (días 1 y 2) se les dio de tomar agua en dos sesiones de 10 minutos (mañana y tarde), en el tercer día se les volvió a inyectar una solución de LiCl al 0.075 M, la cual no induce CAS (Miranda et al. 2002). Durante los días 4, 5 y 6, se les volvió a dar agua y en el séptimo día se midió la aversión al sabor.

Por las razones previamente expuestas, en la discusión del primer experimento, en la sección donde usamos dosis bajas de LiCl, en este segundo experimento, no se utilizará la misma concentración de LiCl del primer experimento. Recuérdese, que nuestros resultados no concordaban con los obtenidos por Berman et al. (2003), ya que ellos emplearon la prueba de dos botellas, una prueba

diferente a la usada por nosotros. Por lo tanto, para este experimento se usó otra concentración baja de LiCl de 0.075M (Miranda et al. 2002), la cual es utilizada en la prueba o método de una botella, misma que nosotros empleamos.

Inmunohistoquímica

Una vez terminado el CAS con la dosis baja de LiCl, los sujetos fueron anestesiados con una sobredosis de anestésico y perfundidos vía intracardíaca con 150 ml de PBS 0.1 M (pH 7.4), seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M a temperatura ambiente. Los cerebros fueron extraídos y mantenidos en sacarosa al 30% y en buffer fosfato 0.1M (pH 7.4) a 4 °C. Posteriormente, los cerebros fueron congelados y utilizando un microtomo se hicieron cortes de 40µm. Los cortes fueron puestos en Buffer-Fosfato 0.1M e incubados por una hora en solución bloqueadora (suero normal de caballo al 2%, tritón X-100 al 0.3% en salina buffer-fosfato). Cortes seriados alternos a nivel de la CI, la AMGc y el APM fueron incubados por 36 horas a 4 °C con un anticuerpo primario policlonal para GAP-43, 1:200 (sc-10786, Santa Cruz Biotechnology) o el anticuerpo primario policlonal para sinaptofisina, 1:500 (sc-9116, Santa Cruz Biotechnology). Ambos fueron diluidos en solución bloqueadora. El producto de la reacción fue observado usando el procedimiento de peroxidasa de avidina-biotina. Finalmente, los cortes fueron montados en el portaobjetos. De tal manera que para cada sujeto teníamos cortes alternos de cada región de interés con inmunoreactividad para GAP-43 y Syp. Se cuantificó mediante un análisis densitométrico.

Análisis densitométrico

Para disminuir la variabilidad de la tinción inmunoreactiva a Syp o GAP-43, en cada corrida se incluyeron cortes de cada grupo, tratando de tener el mismo

número de sujetos por grupo. Fueron analizados cinco cortes por cada animal con un aumento de 4X y utilizando un sistema de análisis de imágenes (ImagePro-Plus), el cual está conectado a un microscopio de luz (Olympus). Se cuantificó la densidad óptica (DO) del lado ipsilateral y contralateral de la región estimulada y se comparó contra la misma región ipsilateral y contralateral del sitio del electrodo en el grupo sham. Por ejemplo, en el grupo estimulado en APM se cuantificó la DO de la misma región estimulada y esta DO se comparó contra la DO del APM del grupo sham o falso estimulado.

Para determinar la inmunoreactividad a Syp y GAP-43 en AMGc, CI, APM, se midió la DO en estas áreas, se colocaron 10 círculos con un diámetro de 300 μm en CI y 6 círculos de 250 μm en AMGc, para APM 1 cuadrado de 550 μm (altura) x 300 μm (ancho). Para medir la DO de la señal de fondo de la GAP-43, se colocaron en el quiasma óptico (una región con bajos niveles de GAP-4, Rekart et al. 2005) 5 círculos adyacentes de 200 μm de diámetro. El promedio de la DO para GAP-43 de cada área de interés cerebral fue dividido por el promedio de las cinco lecturas de la DO del quiasma óptico (ó DO de la señal de fondo; background de GAP-43). Para medir la DO de la señal de fondo (background) de la Syp, se colocaron en el cuerpo calloso (una región con bajos niveles de sinaptofisina, Stroemer et al. 1995) 8 círculos adyacentes de 200 μm diámetro. El promedio de las lecturas de la DO para Syp de cada área de interés cerebral fue dividido por el promedio de las ocho lecturas de la DO del cuerpo calloso (ó DO de la señal de fondo de Syp). La técnica de cuantificación densitométrica fue tomada de Li et al. (2002) y Rekart et al. (2005).

Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas T de student para evaluar la inmunoreactividad (DO) de Syp y GAP-43 comparando cada región estimulada con el grupo falso estimulado (sham). Para el CAS, se utilizó un ANDEVA 4 (grupos) x 21 (días de consumo) seguida de la prueba post hoc de Fisher.

Los resultados se dividieron en dos partes: parte **A**, incluye sólo los resultados conductuales del CAS y en la parte **B** se incluyen sólo los resultados del análisis inmunohistoquímico tanto de GAP-43 como de Syp.

8.5 RESULTADOS-PARTE A

Histología

Los animales quedaron agrupados de la siguiente manera: 9 sujetos implantados en CI y con kindling; 8 sujetos implantados en APM y con kindling; 9 sujetos implantados en AMGc y con kindling; 7 sujetos sham.

Primer CAS

Utilizando un ANDEVA de medidas repetidas y pruebas post-hoc Fisher, se encontraron diferencias significativas en el factor A (Grupos) $F_{(3,20)} = 6.62$, $p = 0.001$; en el factor B (días de consumo), $F_{(3,20)} = 104.435$, $p < 0.0001$ y en la interacción A x B, $F_{(3,20)} = 1.75$, $p = 0.0005$. En la figura 11, se observa la curva de adquisición y extinción del CAS, en animales con kindling que fueron inyectados con una concentración de LiCl (0.2M). Se encontró que los animales con kindling en CI, AMGc, APM y sham aprendieron la asociación EC-EI. Los Animales con kindling en CI y AMGc después de 28 días sin estimulación eléctrica, mostraron un retraso en la extinción. Estos sujetos consumieron menos sacarina a partir del día 13 que los grupos APM y sham. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo sham y APM con respecto al consumo de sacarina ($p > 0.05$).

ANIMALES CON KINDLING EN UNA PRUEBA DE CAS(LiCl 0.2M)

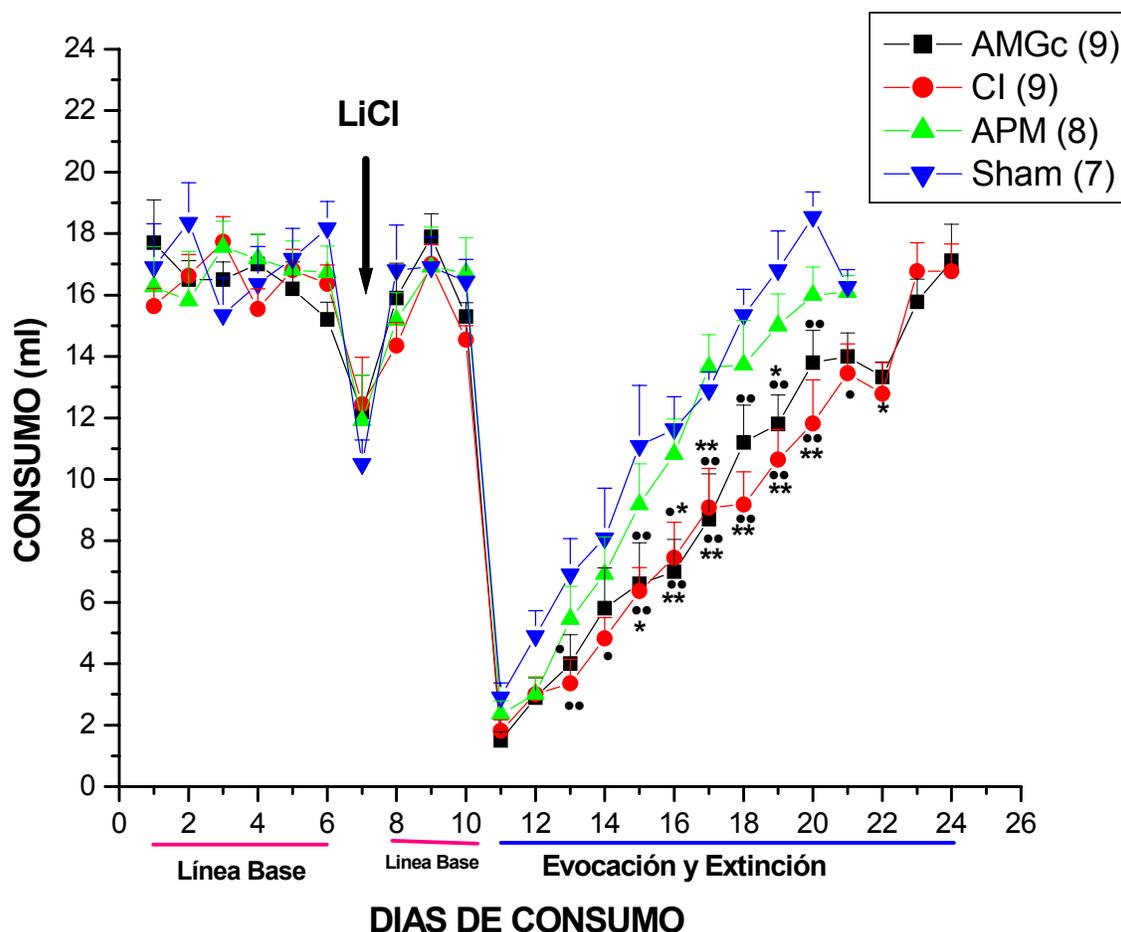


Figura 11. Se muestran los resultados del CAS de animales que desarrollaron kindling y que fueron inyectados con una concentración (LiCl, 0.2M) que induce aversión a los sabores. Los días 1 a 6 son la línea base o de entrenamiento. En el día 7 se pareó el estímulo condicionado (Sacarina) y el estímulo incondicionado (LiCl). Los días 8,9 y 10 son la línea base, a partir del día 11 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos: implantados; AMGc, amígdala central; CI, corteza insular; APM, área preóptica medial y Sham. Diferente de APM: * p<0.05, ** p<0.01. Diferente de Sham: *p<0.05, **p<0.01. Los datos se expresan como media ± Error estándar. Se usó un ANDEVA de dos vías y prueba Post hoc Fisher.

Segundo CAS

Se encontraron diferencias significativas con una concentración de LiCl 0.075M en el factor A (Grupos), $F_{(3,10)}= 3.88$, $p=0.0198$, en el factor B (días de consumo) $F_{(3,10)}= 26.118$, $p<0.0001$ y en la interacción A x B, $F_{(3,10)}= 2.015$, $p<0.0019$. Los sujetos sham y con kindling en CI, AMGc y APM recuperaron la

respuesta aversiva. En el día siete no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el consumo de sacarina de cada uno de los grupos. Los animales con kindling en CI y AMGc mostraron una aversión más fuerte ($p<0.05$) con respecto a los sham en los días 8 al 11. Los sujetos con kindling en CI y AMGc mostraron una aversión más fuerte ($p<0.05$) en los días 10 y 11 con respecto a los animales con kindling del APM. (ver figura 12). El consumo de sacarina fue similar entre los grupos sham y APM, no encontrándose en ninguno de los días, diferencias significativas con respecto al consumo de sacarina ($p>0.05$). Los animales con kindling de la AMGc y CI, recuperaron la aversión del trazo original (EC-EI) con un dosis baja de LiCl que no es efectiva para inducir CAS, mostrando una aversión más fuerte con respecto a los sujetos sham y los sujetos con kindling del APM.

RATAS KINDLING CON UNA DOSIS BAJA DE LiCl (0.075M)

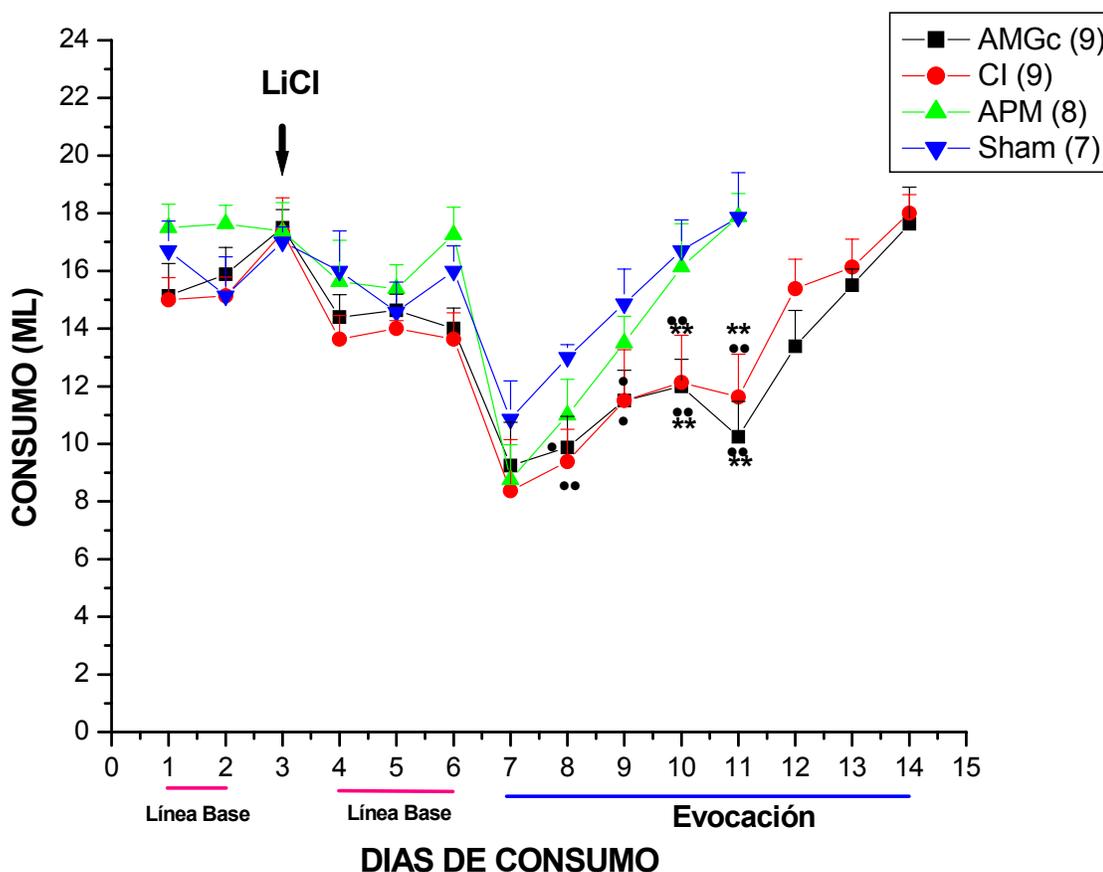


Figura 12. Consumo de sacarina en los días de prueba (del día 7 al 14) de la respuesta aversiva en ratas inyectadas con una concentración baja LiCl 0.075M. Estos animales habían sido previamente entrenados con una concentración de LiCl 0.2M que induce el CAS. El entrenamiento del CAS con la concentración baja de LiCl (0.075M), fue hecho una vez que el trazo EC-EI con la concentración LiCl 0.2M, se había extinguido. Los días 1 a 2 son la línea base o de entrenamiento. En el día 3 se pareó el estímulo condicionado (Sacarina) y el estímulo incondicionado (LiCl). Los días 4, 5 y 6 son la línea base, a partir del día 7 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos: implantados; AMGc, amígdala central; CI, corteza insular; APM, área preóptica medial y Sham.

En resumen, en el primer CAS, los sujetos con kindling en CI mostraron una mayor aversión hacia la sacarina con respecto a los sham y a los sujetos con kindling del APM. En el caso de los animales con kindling de la AMGc también mostraron una mayor aversión hacia la sacarina. Los sujetos sham y con kindling del APM consumieron la misma cantidad de sacarina. Estos resultados confirman

los datos del primer experimento del presente trabajo. En el segundo, condicionamiento todos los grupos mostraron una recuperación aversiva hacia la sacarina. Los sujetos con kindling en CI y AMGc mostraron una aversión más fuerte que los sujetos sham y que los animales con kindling del APM.

8.6 DISCUSIÓN

Primer CAS

Los sujetos con kindling de la CI y la AMGc muestran una mayor aversión que los sujetos sham y con kindling del APM. Siendo este efecto más notorio en la CI. Los resultados de este segundo experimento, corroboran los obtenidos en el primer experimento.

El incremento en la fuerza aversiva de los sujetos con kindling en CI, concuerda con los estudios realizados sobre el efecto de la potenciación a largo plazo (LTP: Long-term potentiation) sobre el CAS (2000). Específicamente, Escobar y Bermúdez-Rattoni (2000), demostraron que la LTP en la CI, inducida antes del entrenamiento del CAS, mostraban una mayor aversión hacia la sacarina, lo cual indicaba que la LTP había incrementado la retención del CAS. Además, se ha sugerido que el LTP dependiente de la activación de los receptores NMDA juega un rol esencial, en la formación del CAS (Escobar et al. 2002). Algunas evidencias indican que el kindling induce un incremento duradero en los niveles de expresión (Yeh et al. 1989) y un aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA (revisado en Armijo et al. 2000). Mody y Lieberman (1998), han descrito que los receptores NMDA permanecen abiertos de 28 a 60 días después del kindling. Mody y Lieberman (1998) sugirieron que la apertura prolongada de los receptores NMDA después del kindling y en ausencia de las crisis, puede ser parte del “estado kindling” (la susceptibilidad a la hiperexcitabilidad neuronal) más que ser una

consecuencia de la actividad de la crisis del lóbulo temporal. La prolongada apertura de estos canales, debe afectar los mecanismos regulatorios que gobiernan la función de estos receptores, tales como las proteínas cinasas o fosfatasas u otras proteínas reguladoras, como la calmodulina (Mody & Lieberman 1998). Es posible que en los sujetos con kindling de la CI, los cambios asociados en la expresión y sensibilidad de los receptores NMDA, hayan influido en el aumento aversivo hacia la sacarina con respecto a los sham. En el caso de los sujetos con kindling del APM, los cambios en la expresión y función de los receptores NMDA también pudieron estar presentes. Sin embargo, como esta estructura no está relacionada con el CAS, los posibles efectos conductuales provocados por estos cambios en los receptores NMDA del APM, no se observaron en el CAS.

El kindling induce la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) (Foster et al. 2004). Aunque el aumento de BDNF es transitorio, si los sujetos con kindling muestran cambios duraderos en la expresión y un aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA, esto provocaría una rápida activación de los mismos con la consecuente liberación de BDNF (la liberación de BDNF depende de la activación de los receptores NMDA, para más detalle ver Bramham & Messaoudi 2005). Se ha demostrado (2006; Moguel-Gonzalez et al. 2008), que la expresión de BDNF en la CI, es importante en la formación de la memoria a largo plazo del CAS. Entonces, si los sujetos con kindling en CI tienen receptores NMDA más sensibles, esto facilitaría la expresión de BDNF y por consiguiente aumentando la memoria a largo plazo del CAS.

La AMGc (Agassandian et al. 2006) también contiene BDNF y su receptor TrkB. Los sitios en donde se han encontrado, han sido en las terminales axonales

y en las espinas dendríticas, las cuales reciben información visceral y gustativa de la amígdala basolateral, de la CI, del tálamo ventromedial y posterior, sugiriendo que este sistema tiene conexiones directas aferentes capaces de apoyar asociaciones sensorio-sensoriales (revisado en Agassandian et al. 2006). Como el BDNF se ha visto asociado a el CAS (Castillo et al. 2006), esto podría sugerir que el BDNF en la AMGc podría también igualmente participar en el aprendizaje aversivo, y por lo tanto de la misma forma que en la CI, es posible que el aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA provocados por el kindling, estén relacionados con un aumento en la expresión de BDNF en la AMGc. Esto sugeriría que la codificación de la información visceral en los animales con kindling de la AMGc, podría estar regulada por BDNF.

Extinción

Como en el primer experimento los sujetos con kindling en CI mostraron un retraso en la extinción, lo cual confirma nuestros datos del primer experimento. En el caso de los sujetos con kindling de la AMGc, en este segundo experimento, los sujetos mostraron un retraso en la extinción más evidente que el observado en el primer experimento.

En la AMGc, el kindling probablemente: 1) está incrementando la sensibilidad para detectar el estímulo condicionado o sacarina después de la adquisición del CAS; 2) favorece la formación de la memoria a un sabor novedoso; 3) aumentó la sensibilidad para detectar el estímulo incondicionado o LiCl; 4) o está favoreciendo la memoria a largo plazo del CAS.

Está bien establecido que la fuerza aversiva aumenta conforme aumenta la intensidad del estímulo incondicionado (EI) (Batsell & George 1996; Nachman & Ashe 1973). Por lo tanto, es posible que los sujetos con kindling de la AMGc

presenten una mayor aversión por un aumento en la sensibilidad para detectar el estímulo incondicionado, ya que la AMGc se ha planteado como una estructura importante en el procesamiento de la información visceral (Gu et al. 1993; Lamprecht & Dudai 1995; St Andre et al. 2007). Este aumento en la sensibilidad para detectar el LiCl, pudo haber provocado que los sujetos hayan detectado el LiCl como un estímulo intenso, lo cual desencadenó un incremento de la fuerza aversiva. Sin embargo, otra posibilidad es que la memoria a largo plazo haya sido fortalecida en estos sujetos con kindling de la AMGc. Existen algunos estudios (Bahar et al. 2003; Lamprecht et al. 1997) que indican a la AMGc como una estructura importante en la formación de la memoria a largo plazo del CAS.

Como ya se había discutido previamente, los sujetos con kindling de la CI mostraron una mayor aversión hacia la sacarina, probablemente porque se estimuló una zona relacionada con la memoria a largo plazo del CAS. En ambos casos, tanto los sujetos con kindling de la CI como en la AMGc, presentaron un retraso en la extinción, posiblemente porque el aprendizaje es muy intenso durante la adquisición, entonces la segunda asociación no puede tomar control sobre el primer trazo EC-EI (Eisenberg et al. 2003), ello significa que los sujetos tardarán más tiempo en extinguir la aversión, porque el trazo inicial EC-EI o primera asociación fue muy fuerte.

Segundo CAS

En todos los sujetos sham y con kindling en CI, AMGc y APM se observó una clara recuperación de la respuesta aversiva, utilizando una concentración de LiCl que no induce CAS (0.075M). Además, los sujetos con kindling en CI y AMGc mostraron una aversión mayor que los sujetos sham y con kindling del APM,

confirmando los datos del primer experimento cuando se usaron dosis bajas de LiCl (ej., 0.015M).

Estos resultados indican que los sujetos con kindling en CI y AMGc recordaron o recuperaron con mayor intensidad la aversión del primer CAS que los sujetos sham y con kindling del APM, demostrando con ello que la extinción no es un olvido y que los sujetos con kindling en CI y AMGc recordaban mejor la aversión original (o del primer CAS). Nuestros datos pueden indicar, que la primera asociación EC-EI tomó control sobre la segunda asociación EC-noEI (Eisenberg et al. 2003), por lo tanto, en el segundo CAS, el recuerdo de la aversión original (primer CAS) fue lo suficientemente intenso como para recuperar la aversión con mayor intensidad, en el segundo CAS con una dosis baja de LiCl.

Las estructuras asociadas a la recuperación de la respuesta aversiva, han sido la CI (Berman et al. 2003; Mickley et al. 2007), la corteza prefrontal y la amígdala basolateral (Herry & Garcia 2003; Herry & Mons 2004; Mickley et al. 2007). Sin embargo, nuestros datos sugieren que la AMGc, probablemente esté también implicada. Algunos mecanismos fisiológicos asociados la recuperación de la respuesta aversiva se discutirán más adelante.

8.7 RESULTADOS-PARTE B

Inmunohistoquímica

En la figura 13 se muestra la localización del electrodo en cortes de cerebro inmunoreactivos a Syp. Ya que en el mismo cerebro se usó una serie de cortes para Syp y otra para GAP-43, la localización del sitio del electrodo será el mismo para los cerebros en ambas inmunohistoquímicas.

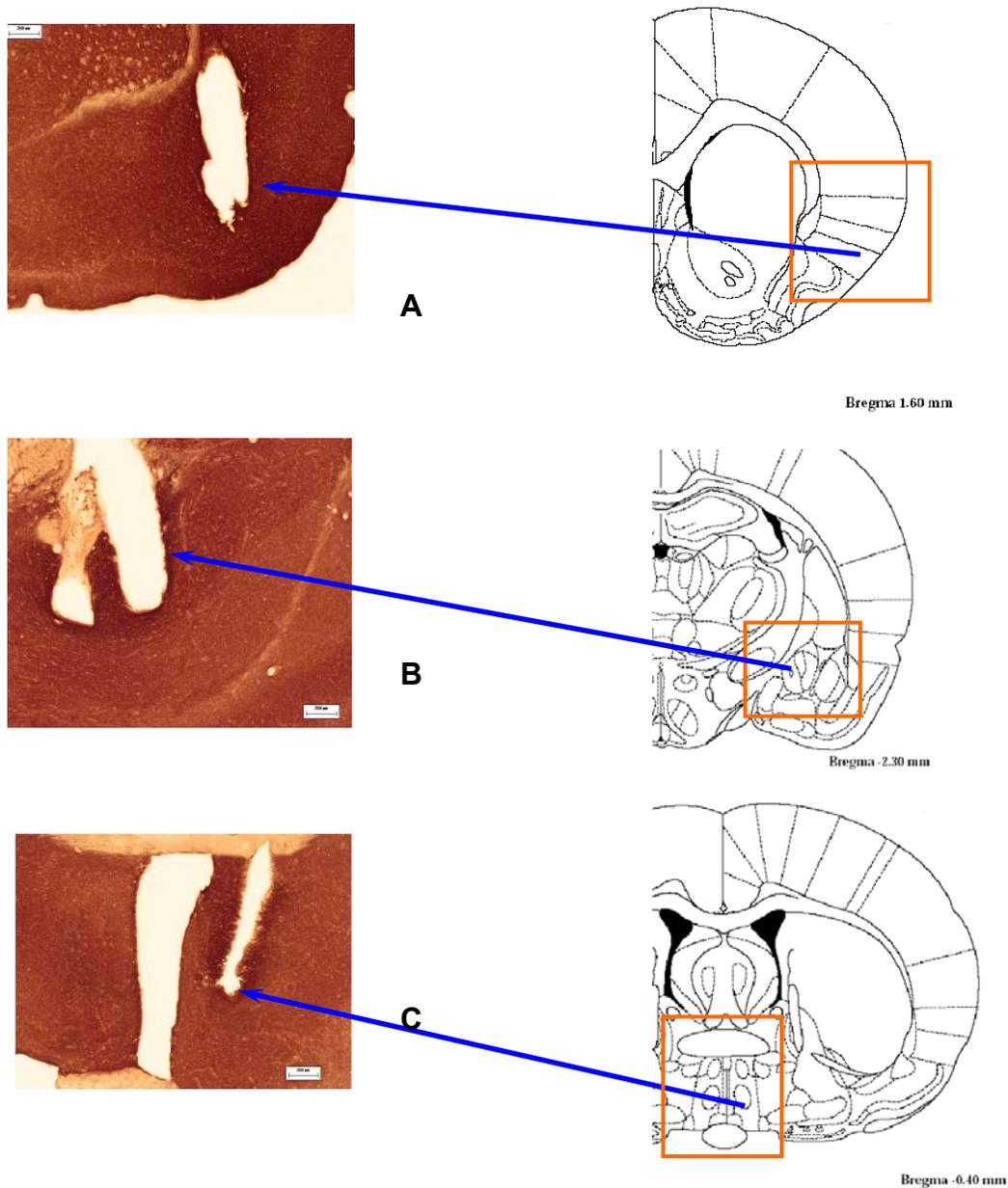


Figura 13. Cortes de cerebro con una inmunohistoquímica para Syp, en donde se muestra el sitio del electrodo de los animales con kindling en CI (A), AMGc (B) y APM (C). Para una una mejor ubicación del sitio del electrodo, en el lado derecho, se muestra la representación gráfica de cortes de cerebro, tomados del atlas de Paxinos y Watson (1987).

Sinaptofisina

En la figura 14 y 15 se muestran cortes representativos de CI; APM y AMGc, con una inmunoreactividad a Syp.

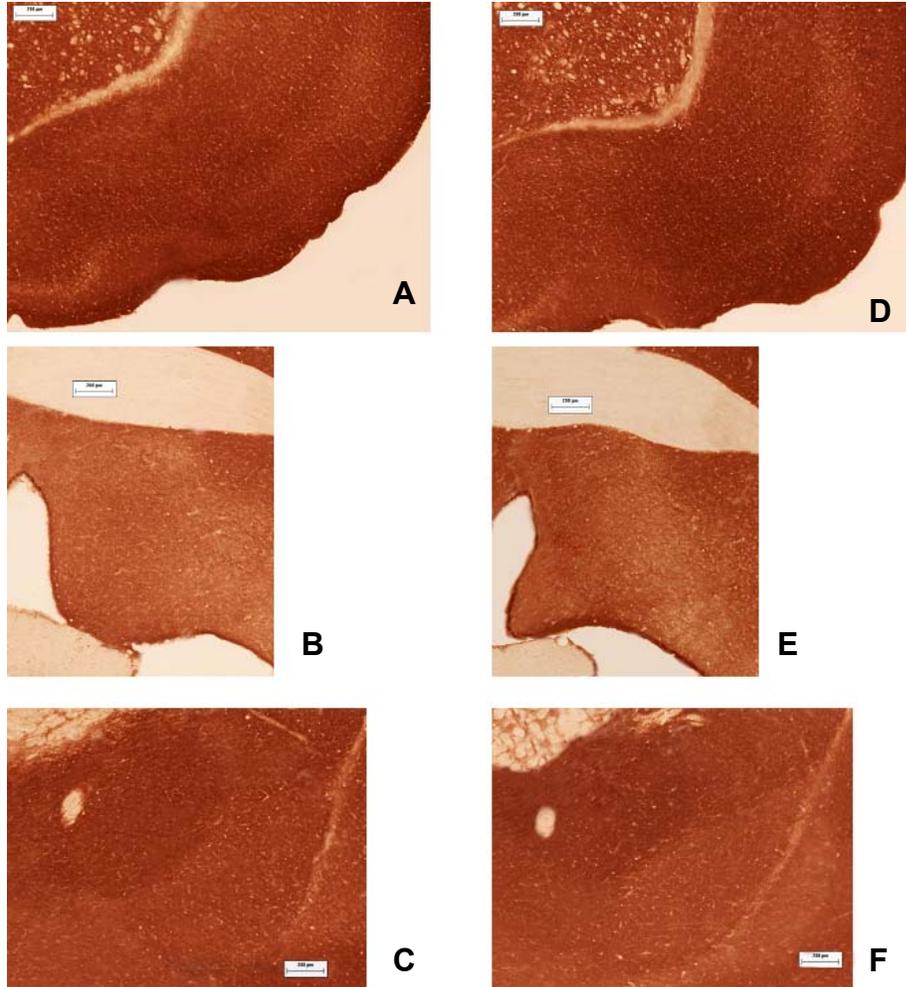


Figura 14. Cortes del hemisferio derecho de CI (**A, D**), APM (**B, E**) y AMGc (**C, F**) con una inmunoreactividad a Syn. En **A, B** y **C** se muestran los cortes de los sujetos sham y en **D, E** y **F** se muestran los cortes del grupo kindling. No se encontraron diferencias significativas en la inmunoreactividad del grupo kindling con respecto al grupo sham. $p > 0.05$.

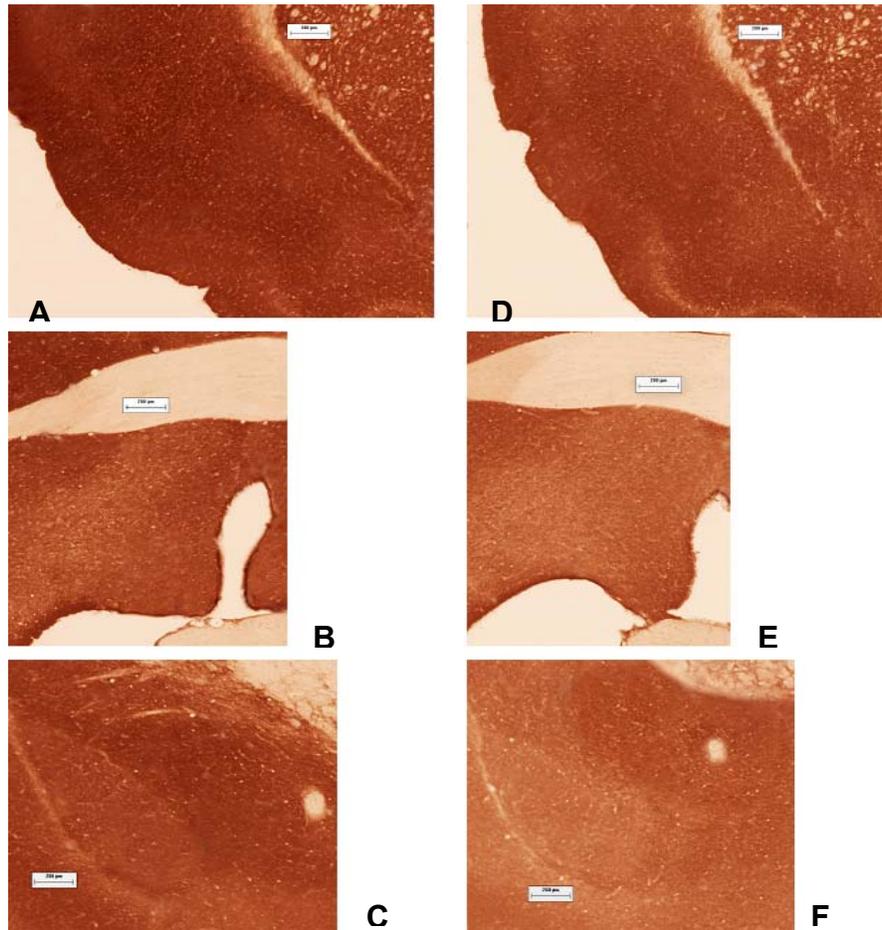


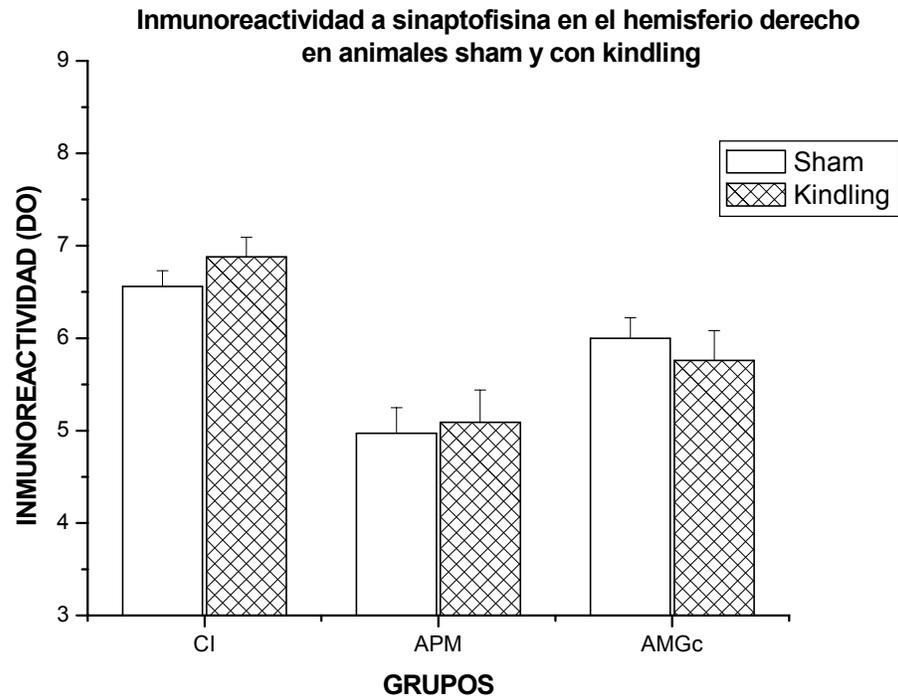
Figura 15. Cortes del hemisferio izquierdo de CI (**A, D**), APM (**B, E**) y AMGc (**C, F**) con una inmunoreactividad a Syn. En **A, B** y **C** se muestran los cortes de los sujetos sham y en **D, E** y **F** se muestran los cortes del grupo kindling. En la figura 17B se muestran los datos cuantitativos donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la inmunoreactividad del grupo con kindling en CI (**A**) con respecto a la CI del grupo sham (**D**) y también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) de los sujetos con kindling de la AMGc (**C**) con respecto a la AMGc del grupo Sham (**F**).

Densidad óptica

Los resultados obtenidos de la DO para Syp fueron los siguientes (ver figura 16): Utilizando una prueba T de student se encontró que no había diferencias significativas ($T_{(30.23)} = 0.285$), entre el APM derecha del grupo estimulado en el APM y el APM derecha del grupo sham. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($T_{(37.22)} = 1.186$), entre la CI derecha del grupo estimulado en la CI y la CI derecha del grupo sham. No se encontraron diferencias significativas ($T_{(27.46)} = -0.627$) entre la AMGc derecha del grupo estimulado en la AMGc y la AMGc derecha del grupo sham.

Con respecto al lado izquierdo de cada región se encontró lo siguiente (ver figura 16): Utilizando una prueba T de student se encontró que no había diferencias significativas ($T_{(33.63)} = -0.714$), entre el APM izquierda del grupo estimulado en el APM y el APM izquierda del grupo sham. Se encontraron diferencias significativas ($T_{(34.60)} = -2.089$), entre la CI izquierda del grupo estimulado en la CI y la CI izquierda del grupo sham, es decir, la CI izquierda del grupo sham presentó una mayor inmunoreactividad a Syp que la CI izquierda del grupo estimulado en la CI. También se encontraron diferencias significativas ($T_{(30.95)} = -1.768$) entre la AMGc izquierda del grupo estimulado en la AMGc y la AMGc izquierda del grupo sham, específicamente se observó que la AMGc izquierda del grupo sham mostraba una mayor inmunoreactividad a la Syp que la AMGc izquierda del grupo estimulado en la AMGc. Ver tabla 4 para una mayor claridad de los resultados.

A



B

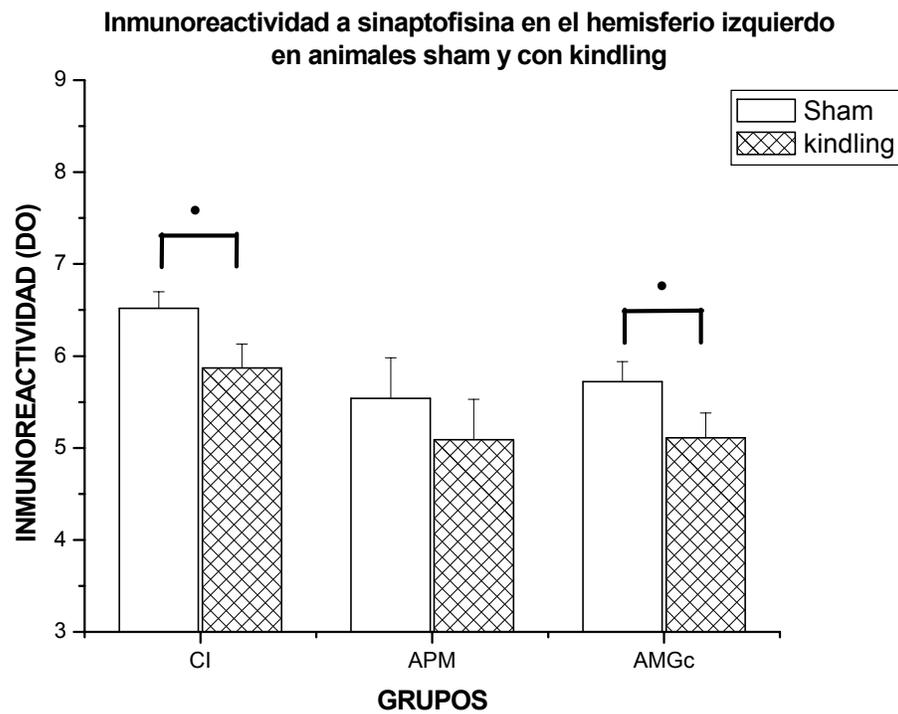


Figura 16. Se Muestra la densidad óptica media de la inmunoreactividad a Syn en animales Sham y con kindling. Se comparó el lado ipsilateral y contralateral de la región estimulada de los animales con kindling contra el mismo lado y región pero de los sujetos Sham. La cuantificación fue realizada en **A)** el lado derecho y **B)** lado izquierdo de cada estructura. Abreviaturas: CI corteza insular, APM, área preóptica medial y AMGc, amígdala central, Se muestran los datos como la media \pm Error estándar.

GAP-43

En la figura 17 y 18 se muestran cortes representativos de CI; APM y AMGc, con una inmunoreactividad a GAP-43.

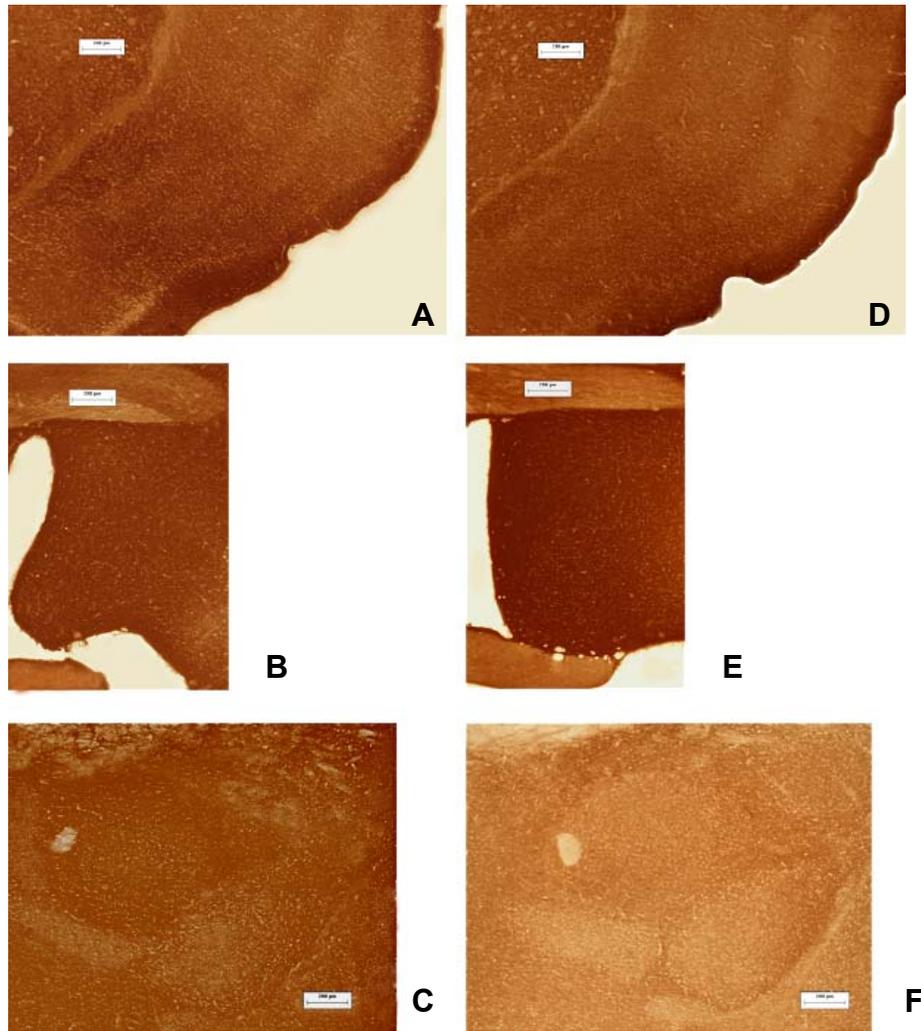


Figura 17. Cortes del hemisferio derecho de CI (**A, D**), APM (**B, E**) y AMGc (**C, F**) inmunoreactivos a GAP-43. En **A, B y C** se muestran los cortes de los sujetos sham y en **D, E y F** se muestran los cortes del grupo kindling. En la figura 19A se muestran los datos cuantitativos en donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la inmunoreactividad del grupo con kindling en APM (**B**) con respecto a la APM del grupo sham (**E**) y también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) de los sujetos con kindling de la AMGc (**C**) con respecto a la AMGc del grupo Sham (**F**).

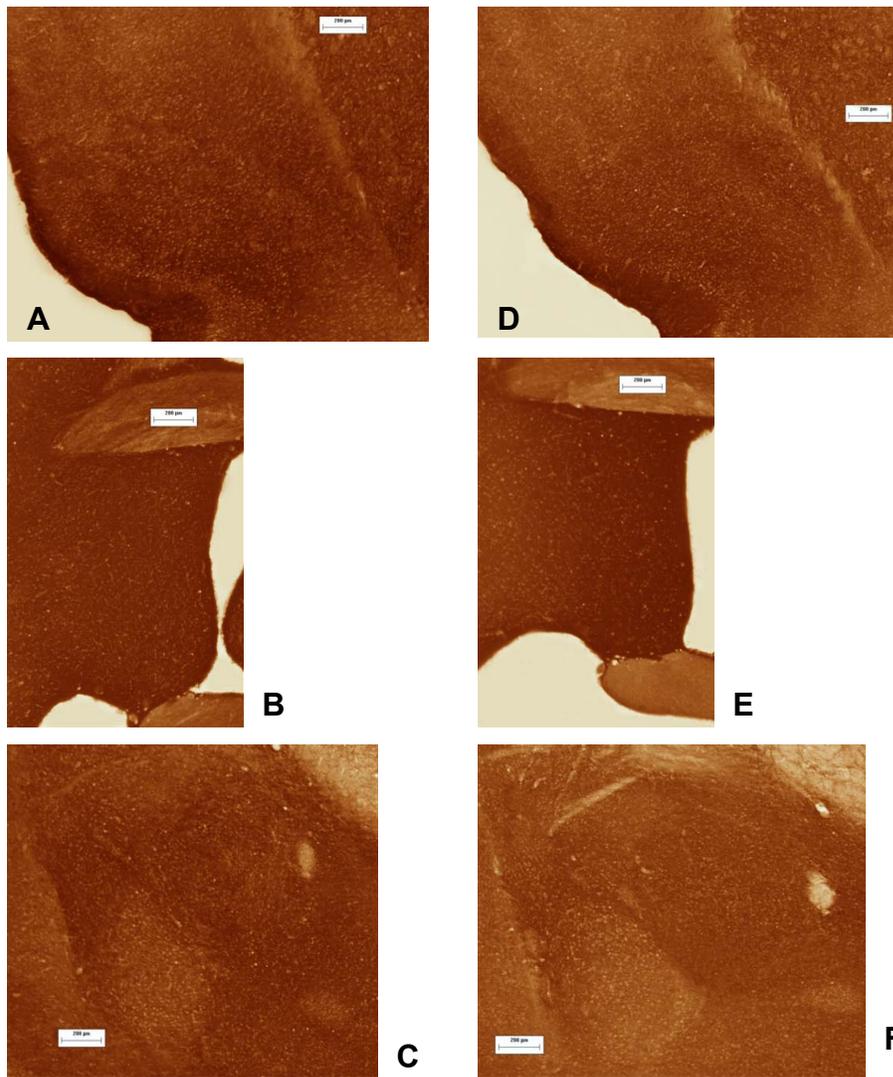


Figura 18. Cortes del hemisferio izquierdo de CI (**A, D**), APM (**B, E**) y AMGc (**C, F**) con una inmunoreactividad a GAP-43. En **A, B y C** se muestran los cortes de los sujetos sham y en **D, E y F** se muestran los cortes del grupo kindling. En la figura 19 se muestran los datos cuantitativos donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la inmunoreactividad del grupo con kindling en CI (**A**) con respecto a la CI del grupo sham (**D**) y también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) de los sujetos con kindling en AMGc (**C**) con respecto a la AMGc del grupo Sham (**F**).

Densidad óptica

Los resultados obtenidos de la DO de la GAP-43 fueron los siguientes (ver figura 19): Utilizando una prueba T de student se encontró que había diferencias significativas ($T_{(41.93)} = 1.98$), entre el APM derecha del grupo estimulado en el APM y el APM derecha del grupo sham; es decir, la inmunoreactividad a GAP-43 en el APM derecha de los animales estimulados en el APM, fue mayor que la inmunoreactividad del APM derecha de grupo sham. No se encontraron diferencias significativas ($T_{(44.44)} = -1.137$), entre la CI derecha del grupo estimulado en la CI y la CI derecha del grupo sham. Se encontraron diferencias significativas ($T_{(13.95)} = -2.25$) entre la AMGc derecha del grupo estimulado en la AMGc y la AMGc derecha del grupo sham; observándose que la inmunoreactividad en la AMGc derecha de los animales estimulados en la AMGc, fue menor que la inmunoreactividad de la AMGc derecha de grupo sham. Con respecto al lado izquierdo de cada región se encontró lo siguiente (ver figura 19): Utilizando una prueba T de student se encontró que no había diferencias significativas ($T_{(39.37)} = 0.58$), entre el APM izquierda del grupo estimulado en el APM y el APM izquierda del grupo sham. Se encontraron diferencias significativas ($T_{(41.86)} = -1.78$), entre la CI izquierda del grupo estimulado en la CI y la CI izquierda del grupo sham, es decir, la CI izquierda del grupo sham presentó una mayor inmunoreactividad a GAP-43 que la CI izquierda del grupo estimulado en la CI. También se encontraron diferencias significativas ($T_{(23.23)} = -6.77$) entre la AMGc izquierda del grupo estimulado en la AMGc y la AMGc izquierda del grupo sham, es decir la AMGc izquierda del grupo sham mostraba una mayor inmunoreactividad a GAP-43 que la AMGc izquierda del grupo estimulado en la AMGc. Ver tabla 4, para una mayor claridad de los resultados.

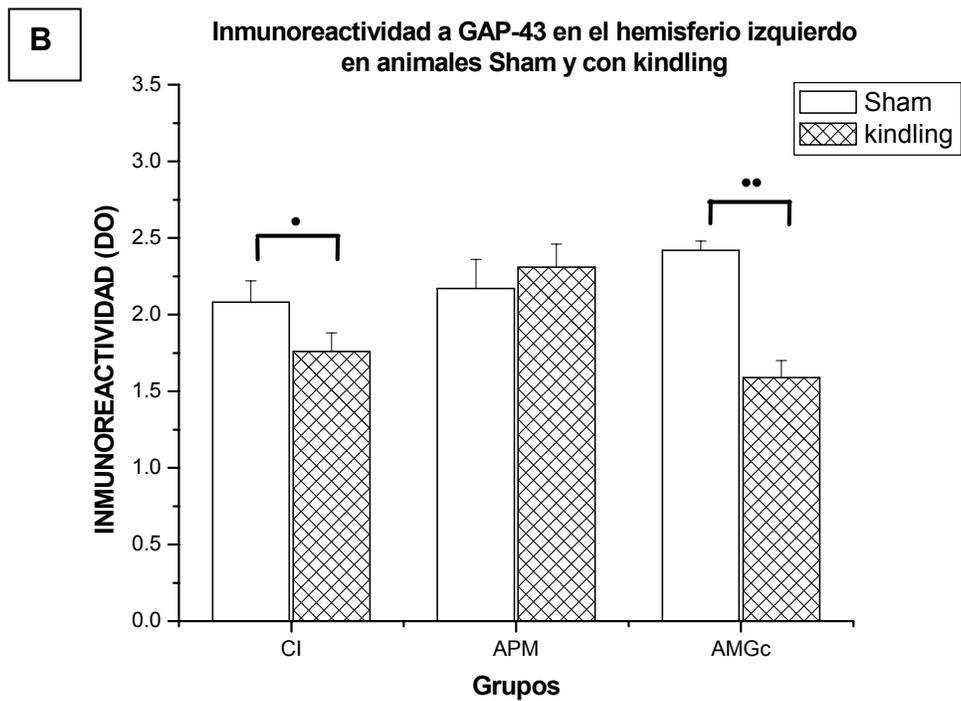
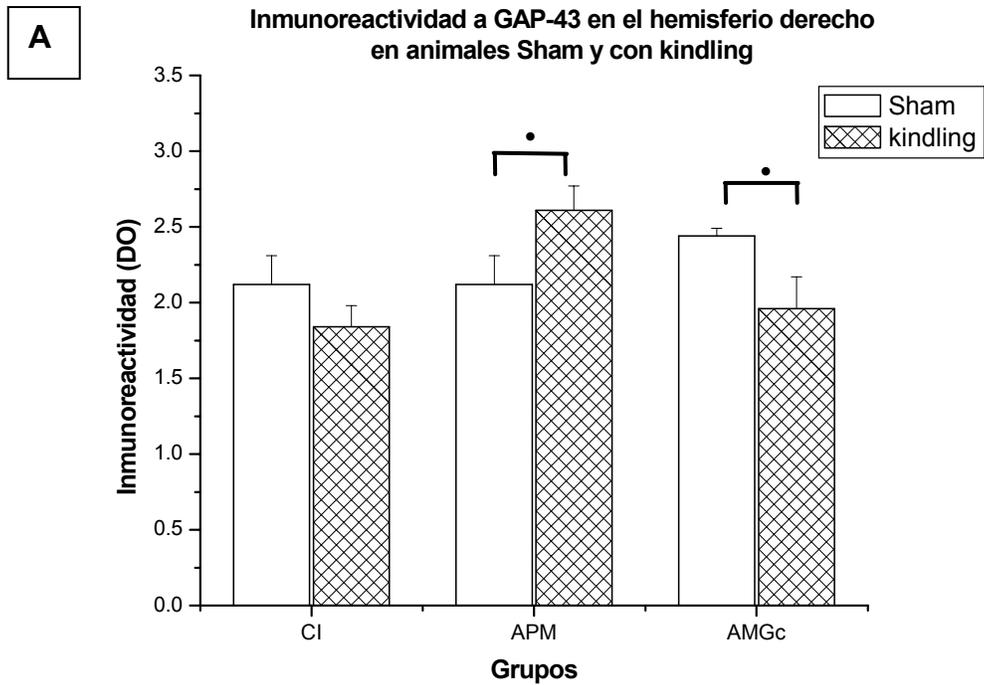


Figura 19. Se Muestra la densidad óptica media de la inmunoreactividad a sinaptofisina en animales con kindling y Sham. Se comparó el lado ipsilateral y contralateral de la región estimulada de los animales con kindling contra el mismo lado y región pero de los sujetos Sham. La cuantificación fue realizada en el **A)** lado derecho y **B)** lado izquierdo de cada estructura. Abreviaturas: CI corteza insular, APM, área preóptica medial y AMGc, amígdala central, Se muestran los datos como la media \pm Error estándar.

Tabla 4. Se muestra un resumen de los resultados de la inmunoreactividad a Syp y GAP-43 en animales con kindling. Los datos fueron cuantificados con la prueba T de student. Todos los resultados son comparados con respecto al grupo sham.

	Área preóptica		Corteza Insular		Amígdala	
	Media					
	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda
Syp	=	=	=	↓*	=	↓*
GAP-43	↑*	=	=	↓*	↓*	↓**

La inmunoreactividad en el APM de animales con kindling del APM fue solo diferente en la inmunoreactividad a GAP-43 en el lado derecho del APM. La inmunoreactividad a Syp y GAP-43 en CI de animales con kindling en CI mostró únicamente diferencias en el lado izquierdo de la CI. La inmunoreactividad a GAP-43 en AMG de animales con kindling en AMG mostró diferencias en el lado izquierdo y derecho de la AMG y para Syp sólo se encontró diferencias en el lado izquierdo de la AMG. = igual a sham; ↑ Mayor que sham. ↓ Menor a sham. Prueba T de student.* p<0.05.

En resumen, los animales con kindling en CI mostraron una disminución en la expresión de la GAP-43 y Syp en el lado izquierdo de dicha estructura. Los animales con kindling de la AMGc mostraron una disminución de la Syp en el lado izquierdo de dicha estructura y en relación a la expresión de la GAP-43, la inmunoreactividad de esta proteína fue menor tanto en el lado derecho, como en el lado izquierdo de la AMGc. Los sujetos con kindling del APM mostraron un aumento en la expresión de GAP-43 en el lado derecho de esta estructura; con respecto a la expresión de la Syp en estos sujetos no se encontró ninguna modificación en ninguno de los hemisferios.

8.8 DISCUSIÓN

GAP-43 y Sinaptofisina

En la CI y AMGc hubo una menor expresión de GAP-43 y Syp de los sujetos estimulados en dichas estructuras que en la CI y AMGc (respectivamente) de los sujetos sham, predominantemente la disminución ocurrió en el lado contralateral (hemisferio izquierdo) de la región estimulada, con excepción de la AMGc en donde la disminución de la expresión de la GAP-43 ocurrió en ambos hemisferios. Los sujetos con kindling del APM mostraron una inmunoreactividad mayor de GAP-43 en el APM (una región no relacionada con el CAS), pero únicamente en el lado derecho (sitio de estimulación), en estos sujetos no hubo cambios en la expresión de Syp.

Los resultados fueron sorprendentes, porque la literatura relacionada con kindling y las proteínas GAP-43 y Syp reportan un aumento en la expresión de estas proteínas, en los cerebros de los sujetos con kindling. Sin embargo, es necesario aclarar que en estos trabajos, la estructura que principalmente se ha cuantificado es el hipocampo. En el trabajo de Élmer et al. (1996) indican un aumento transitorio de la expresión del ARNm de GAP-43, en la amígdala basolateral de los sujetos con kindling. En el caso de la Syp, el único reporte donde se ha evaluado en otras estructuras diferentes al hipocampo, es el trabajo de Li et al (2002), ellos encontraron un aumento en la corteza piriforme, pero no en la corteza entorrinal. Nuestros resultados podrían indicar que el kindling no solamente provoca un aumento en la expresión de la GAP-43 y Syp, sino puede producir una disminución de estas proteínas.

Sin embargo, estos cambios en la expresión de estas proteínas, no sólo son resultado de los efectos del kindling, sino también de los mecanismos neuronales

asociados al CAS. Porque, es muy curioso, que sólo las estructuras relacionadas al CAS (AMGc y CI) hayan presentado una menor inmunoreactividad tanto a la GAP-43 como a la Syp.

Nuestra idea inicial fue que si los receptores NMDA de los sujetos con kindling muestran una mayor sensibilidad (Armijo et al. 2000), entonces esta sensibilidad facilitaría la expresión de GAP-43, ya que su expresión depende de la activación de los receptores NMDA (Benowitz & Routtenberg 1997). Lo que parcialmente podría explicar el incremento en el aprendizaje aversivo de los sujetos con kindling. Sin embargo, nuestros resultados fueron diferentes con respecto a los niveles de expresión de GAP-43 y Syp.

Una explicación posible de por qué no encontramos un aumento en la expresión de GAP-43 y Syp, es porque sacrificamos a los sujetos después de la extinción del segundo CAS (recuérdese, en este segundo CAS, la respuesta aversiva se recuperó con una dosis baja de LiCl que no induce una clara aversión).

No se conocen, exactamente los mecanismos que subyacen a la extinción de aprendizajes aversivos, pero recientemente, se ha reportado (Dalton et al. 2007) que la depresión a largo plazo (long term depression: LTD⁹) juega un papel muy importante en el desarrollo de la extinción. Dalton et al. (2007), encontraron que el bloqueo del LTD durante la sesión inicial de la extinción del condicionamiento al miedo (Fear Conditioning¹⁰) provocaba una interrupción de la extinción.

⁹ LTD es una disminución en la eficacia sináptica a largo plazo que es inducida por estímulos eléctricos de baja frecuencia.

¹⁰ Condicionamiento al miedo o "Fear Conditioning": es una tarea de aprendizaje y memoria de tipo aversivo, el cual consiste en asociar un estímulo incondicionado (ej., un choque eléctrico) con un estímulo condicionado (ej., una luz). El estímulo incondicionado o choque eléctrico se aplica en los miembros anteriores y posteriores de las ratas, la finalidad es que el sujeto asocie la luz con el

Dalton et al. (2007), también observaron que el bloqueo de la LTD durante el condicionamiento, no afectaba el recuerdo del “Fear Conditioning”, ni tampoco se afectaba su recuperación espontánea, cuando se bloqueaba la LTD después de la extinción del miedo o “Fear Conditioning” Los autores sugirieron (Dalton et al. 2007), que la LTD media la extinción de este condicionamiento y que puede ser un mecanismo que facilite la modificación de una asociación aprendida (ej., miedo condicionado).

Sin embargo, con respecto a la recuperación espontánea de la respuesta aversiva, algunos estudios (Herry & Garcia 2003; Herry & Mons 2004) han encontrado, que la recuperación espontánea del miedo condicionado está asociada con el LTD y con una disminución de los niveles de c-Fos en la corteza prefrontal y en la amígdala basolateral. Se ha observado (Herry & Mons 2004) que el LTD y la disminución de la expresión de c-Fos son factores relacionados con el fracaso de extinguir el miedo condicionado. Específicamente, se ha encontrado (Herry & Mons 2004) que en la sesión inicial de la extinción hay una disminución en la expresión de c-Fos y cuando ocurre la extinción completa se observa un incremento en la expresión de c-Fos y una mayor fuerza del LTP. Los resultados de Herry y Mons (2004) indicarían que la resistencia a la extinción está asociado al LTD. Nuestros resultados, con respecto a la expresión de GAP-43 y Syp, podrían sugerirnos que la extinción completa del segundo CAS está relacionada con una disminución en la fuerza sináptica, esto podría contradecir el trabajo de Herry y Mons (2004). A pesar de esto, también es posible que la disminución de estas

choque, y que después con la sólo presentación del estímulo condicionado o la luz, el sujeto sobresalte.

proteínas esté relacionada con la resistencia a la extinción del CAS o el incremento en la respuesta aversiva de los sujetos con kindling en CI y en AMGc.

Diversos estudios (Bastrikova et al. 2008; Kamikubo et al. 2006; Trachtenberg et al. 2002) han demostrado que la LTD está asociada con una disminución en la fuerza sináptica acompañada por la eliminación de las sinapsis. Incluso, recientemente, (Bastrikova et al. 2008) se ha observado que la LTD provoca una completa separación entre el botón presináptico y la espina dendrítica. Este proceso de eliminación de sinapsis, ha sido considerado como un mecanismo que subyace al remodelamiento de los circuitos neuronales y a la formación de la memoria (De Paola et al. 2006).

Así que la disminución en la expresión de las proteínas GAP-43 y Syp en los sujetos con kindling de la AMGc y CI, podría reflejar un proceso de eliminación sináptica, asociado a una remodelación de los circuitos neuronales. En donde estas modificaciones sinápticas podrían estar asociadas al proceso de extinción del CAS.

Otra posible propuesta es la siguiente: si el kindling está asociado a un aumento en la expresión y sensibilidad de los receptores NMDA, esto desencadenaría una rápida activación de los mismos con la consecuente liberación de BDNF. Esto, por consiguiente, en el caso de la CI podría facilitar la formación de la memoria a largo plazo y para la AMGc aumentaría su sensibilidad para detectar el estímulo incondicionado, lo cual traería como consecuencia un aumento en la fuerza aversiva del CAS. Todos estos eventos, estarían relacionados con una sobreexcitabilidad neuronal, generada no sólo por el kindling sino por el aprendizaje. Una vez adquirido y consolidado el CAS, es posible, que estas redes neuronales incorporen mecanismos homeostáticos que impiden la saturación del sistema y el bloqueo de su capacidad de almacenamiento (Bruehl-Jungerman et al. 2007), por

ejemplo, la saturación de la LTP provoca un deterioro en la memoria espacial (Moser et al. 1998). Los mecanismos de fortalecimiento y debilitamiento sináptico pueden ocurrir simultáneamente en diferentes sinapsis, impidiendo la excitación crónica que podría causar una disfunción (Bruehl-Jungerman et al. 2007). Por ejemplo, se ha descrito que 3 días después de la LTP, disminuye la expresión de la GAP-43 (Meberg et al. 1993), lo cual podría sugerir un mecanismo de estabilización sináptica. Esto, puede estar relacionado con el hecho de que la LTD produce una disminución en la fosforilación de la GAP-43, que posiblemente esté relacionado con una disminución en la eficacia sináptica que caracteriza al LTD (Ramakers et al. 2000). Entonces, lo anterior podría sugerirnos que una vez que se consolidó el aprendizaje aversivo, haya ocurrido un debilitamiento en el fortalecimiento sináptico. Este debilitamiento, podría estar asociado con la disminución en la expresión de la GAP-43 y Syp, reflejando un proceso de estabilización sináptica. Un modelo teórico predice que el debilitamiento sináptico produce una mayor ganancia en la capacidad de almacenamiento que un fortalecimiento sináptico (Brown & Bashir 2002). Este mecanismo podría explicar porque los animales con kindling de la AMGc y CI mostraron una fuerte aversión al sabor y por consiguiente un retraso en la extinción.

Entonces, se proponen dos posibles explicaciones: 1) que la disminución en la expresión de GAP-43 y Syp haya fortalecido el aprendizaje aversivo, y 2) que la disminución de estas proteínas esté asociado al proceso de extinción del CAS.

CAPÍTULO 9. EXPERIMENTO 3

9.1 INTRODUCCIÓN

Como previamente se describió en la sección “Kindling y Plasticidad”, en el kindling ocurre una enorme variedad de cambios neuronales funcionales y estructurales a corto y largo plazo, los cuales ocurren en ausencia de daño neuronal, muy por el contrario de modelos que inducen estatus epilepticus por ácido kaínico, en donde el daño neuronal es evidente, tal como fue descrito en el capítulo “**Modelo de estatus epilepticus inducido por ácido kaínico**”. Nuestros resultados previos demostraron que el kindling favorece el aprendizaje aversivo al sabor. Esto condujo a evaluar, si el modelo del ácido kaínico, el cual provoca daño neuronal y crisis generalizadas interfiere o bloquea el CAS.

9.2 OBJETIVO

- Evaluar si el modelo del ácido kaínico, el cual provoca daño neuronal y crisis generalizadas interfiere o bloquea el CAS.

Inicialmente, en este experimento se planteó únicamente la realización de este objetivo. Sin embargo, los resultados del primer objetivo mostraron que los animales tratados con ácido kaínico si bien no exhibían un bloqueo en su aprendizaje aversivo, si mostraban un deterioro en este aprendizaje, sobre todo durante los primeros días de prueba del CAS y además presentaban una alteración en la neofobia inicial. Como el aprendizaje aversivo al sabor no fue bloqueado completamente, estos resultados llevaron a plantear la realización de otro objetivo, cuya finalidad fue:

- Evaluar si los sujetos tratados con AK y entrenados en un segundo CAS, presentaban un deterioro del CAS.

9.3 HIPÓTESIS

Los animales tratados con ácido kaínico presentarán interferencias ó un bloqueo en el CAS.

9.4 MÉTODO

Sujetos

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 200 gramos, mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad invertido (12:12hrs) con comida y agua ad libitum (excepto durante el CAS)

Diseño

Se formaron los siguientes grupos:

Ratas inyectadas con ácido kaínico (AK) (5mg/kg, ip), que fueron entrenadas en el CAS e inyectadas con LiCl: Grupo AKLi

Ratas inyectadas con AK (5mg/kg, ip), que fueron entrenadas en el CAS e inyectadas con cloruro de sodio (NaCl): Grupo AKNa

Ratas a las que no se les inyectó el AK, que fueron entrenadas en el CAS e inyectadas con LiCl: Grupo IntacLi (intactas Litio)

Ratas a las que no se les inyectó el AK, que fueron entrenadas en el CAS e inyectadas con NaCl. Grupo IntacNa (intactas Sodio)

PROCEDIMIENTO

Estatus epilepticus

La inducción de las crisis epilépticas por medio del AK consistió en inyectar a los sujetos con AK (5mg/kg por hora, i.p.) durante un periodo aproximado de 5 horas, hasta que las ratas presentaran tres fases 5. Este procedimiento se realizó de acuerdo a Hellier et al. (1998). Los sujetos inyectados con AK fueron observados para registrar las crisis conductuales, las cuales fueron clasificadas de

acuerdo a la escala de Racine (1972b). Una vez que los sujetos presentaron por lo menos 3 fases 5, se les dejó 2 semanas de recuperación y posteriormente fueron entrenados al CAS.

CAS

Los sujetos fueron entrenados en dos CAS y en cada condicionamiento se utilizó un sabor diferente como estímulo condicionado (solución de sacarina o de NaCl). Cuando los sujetos son entrenados en 2 CAS independientes, se usa un sabor distinto para cada entrenamiento del CAS (Gutierrez et al. 1997).

Primer CAS

Para el primer CAS, se siguió el mismo protocolo del CAS que el presentado en la sección del método general. El estímulo condicionado para el primer CAS fue la solución de sacarina al 0.1%.

Segundo CAS

Cuando ocurrió la extinción del primer CAS, en los sujetos tratados con AK e intactos, fueron nuevamente entrenados en un segundo CAS. Se usó el mismo protocolo del CAS del método general, pero el estímulo condicionado fue la solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl).

Análisis estadístico

Para medir la fuerza aversiva del CAS entre los diferentes grupos, se analizó con un ANDEVA 4 (grupos) x 23 (días de consumo) para medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de Fisher.

9.5 RESULTADOS

Primer CAS (sacarina)

A continuación se describen los resultados del presente experimento. En el primer CAS de las ratas tratadas con AK e intactas, la ANDEVA mostró un efecto significativo en el factor A (Grupo), $F_{(3,22)} = 5.497$, $p = 0.0046$; en el factor B (días de consumo), $F_{(3,22)} = 21.2307$, $p < 0.0001$ y en la interacción A x B (Grupo-días de consumo), $F_{(3,22)} = 2.56$, $p < 0.0001$. Se encontró que las ratas en el día de séptimo (día de la adquisición) AKLi y AKNa, consumen significativamente más sacarina que las ratas IntacNa e IntacLi ($p < 0.05$). En el día 11 (evocación y extinción) se encontró que el grupo AKLi y AKNa consumió la misma cantidad de sacarina que el grupo IntacNa ($p > 0.05$). Los sujetos AKLi en los días 11 al 13 consumieron más sacarina que los sujetos IntacLi ($p < 0.05$), no se observa un claro aprendizaje aversivo hacia la sacarina en los animales AKLi durante estos días. El consumo de sacarina del grupo AKLi en los días del 14 al 23 no fue significativamente diferente del grupo IntacLi. Entre los sujetos AKNa e IntacLi no se observan diferencias significativas en el consumo de sacarina del día 14 al día 23 ($p > 0.05$), sólo excepto durante el día 16 ($P < 0.05$). Los sujetos IntacLi consumieron menos sacarina que los IntacNa del día 11 al día 22 ($p < 0.05$). Los sujetos AKLi consumieron menos sacarina del día 12 al día 23 que los IntacNa ($p < 0.05$). Los sujetos AKNa también consumieron significativamente menos sacarina del día 12 al día 22 que el grupo IntacNa ($p < 0.05$), excepto el día 16 y 20. Del día 16 al 19 los sujetos AKLi consumieron significativamente menos que los sujetos AKNa ($p < 0.05$). En general, los datos sugieren que los animales AKLi no muestran un claro aprendizaje aversivo hacia la sacarina. Ver figura 20.

CAS (SACARINA) DE ANIMALES TRATADOS CON ACIDO KAINICO E INTACTOS

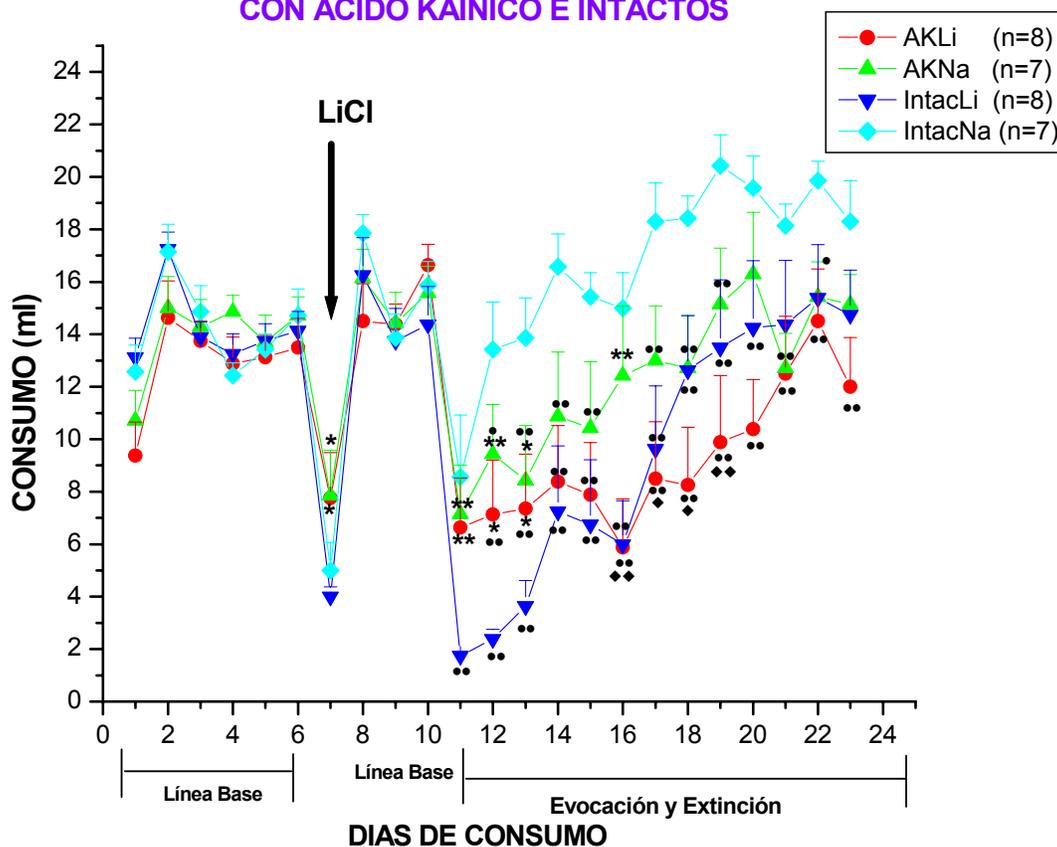


Figura 20. Adquisición, evocación y extinción del aprendizaje aversivo a los sabores de ratas tratadas con Ácido kaínico (AK). En el día siete se apareó el Estímulo Condicionado (Sacarina) y el Estímulo Incondicionado (LiCl), los días 8, 9 y 10 son la línea base, a partir del 11 se registra el consumo de sacarina. Se muestran los grupos: AKLi, ratas tratadas con AK e inyectadas con LiCl para producirles la aversión; AKNa, ratas tratadas con AK e inyectadas con NaCl para usarlas como control en el CAS; IntacLi, ratas sin AK pero inyectadas con LiCl para inducirles el condicionamiento aversivo; IntacNa, ratas sin AK pero inyectadas con NaCl para usarlas como control en el CAS. Los datos se expresan como media \pm Error estándar. Diferente de IntacLi: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de IntacNa: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de AKNa: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Segundo CAS (NaCl)

En el segundo CAS de las mismas ratas tratadas con AK (en donde se sustituyó la sacarina por cloruro de sodio), la ANDEVA mostró un efecto significativo en el factor A (Grupos), $F_{(3,18)}= 4.7$, $p=0.0097$; en el factor B (días de consumo), $F_{(3,19)}= 6.14$, $p<0.0001$ y en la interacción A x B (Grupos-días de consumo), $F_{(3,19)}= 3.84$, $p<0.0001$. Se encontró que las ratas AKLi y AKNa consumen la misma cantidad de solución de NaCl que las ratas IntacNa, ($p>0.05$). Las ratas IntacLi consumen significativamente menos sacarina que las ratas AKNa, AKLi e IntacNa, en los días del 11 al 13 y del día 15 al 18 ($p<0.05$), excepto el día 14 y 16 en los cuales consumen la misma cantidad de sacarina que los grupos AKNa, AKLi e IntacNa. En este segundo condicionamiento es evidente que los sujetos AKLi presentan un bloqueo en el CAS. Ver figura 21.

SEGUNDO CAS (CLORURO DE SODIO) DE ANIMALES TRATADOS CON ACIDO KAINICO E INTACTOS

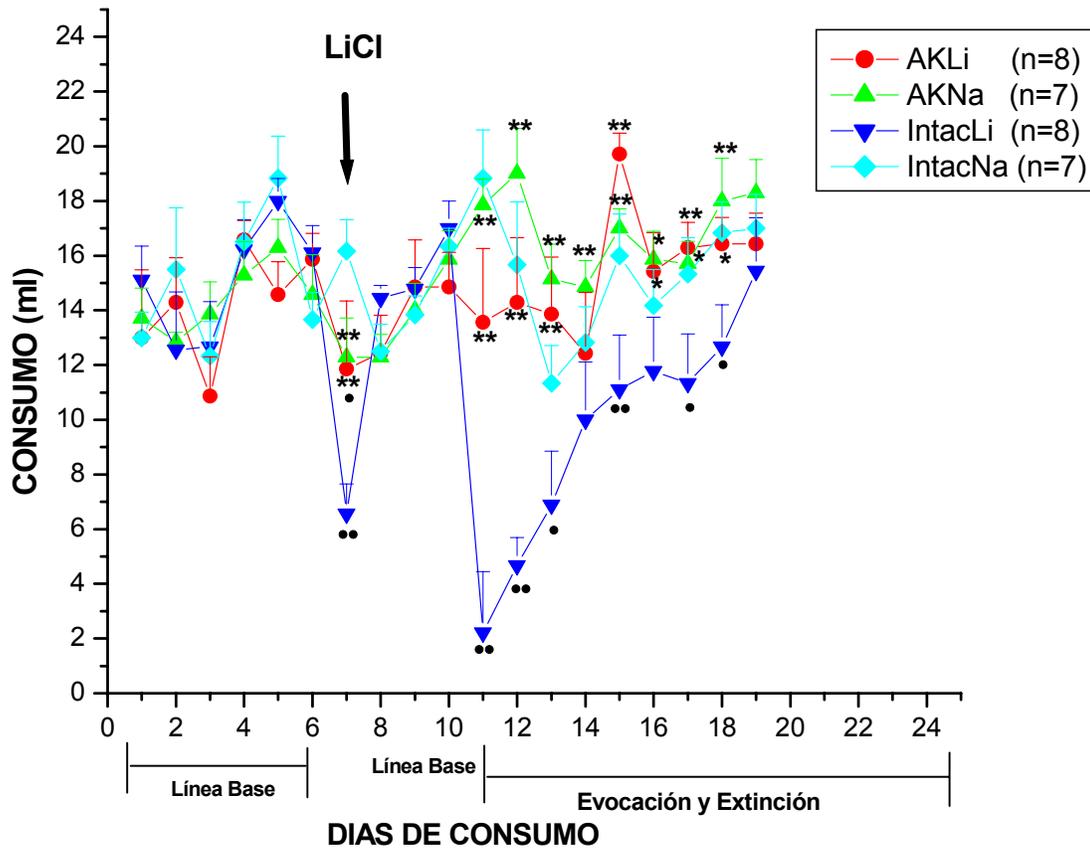


Figura 21. Adquisición, evocación y extinción en un segundo CAS de ratas tratadas con ácido kaínico (AK). En el día siete se apareó el Estímulo Condicionado (cloruro de sodio) y el Estímulo Incondicionado (LiCl), los días 8, 9 y 10 son la línea base, a partir del 11 se registra el consumo de cloruro de sodio. Se muestran los grupos: AKLi, ratas tratadas con AK e inyectadas con LiCl para producirles la aversión; AKNa ratas tratadas con AK e inyectadas con NaCl para usarlas como control en el CAS; IntacLi, ratas sin AK pero inyectadas con LiCl para inducirles el condicionamiento aversivo; IntacNa, ratas sin AK pero inyectadas con NaCl para usarlas como control en el CAS. Los datos se expresan como media \pm Error estándar.

Diferente de IntacLi: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Diferente de IntacNa: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

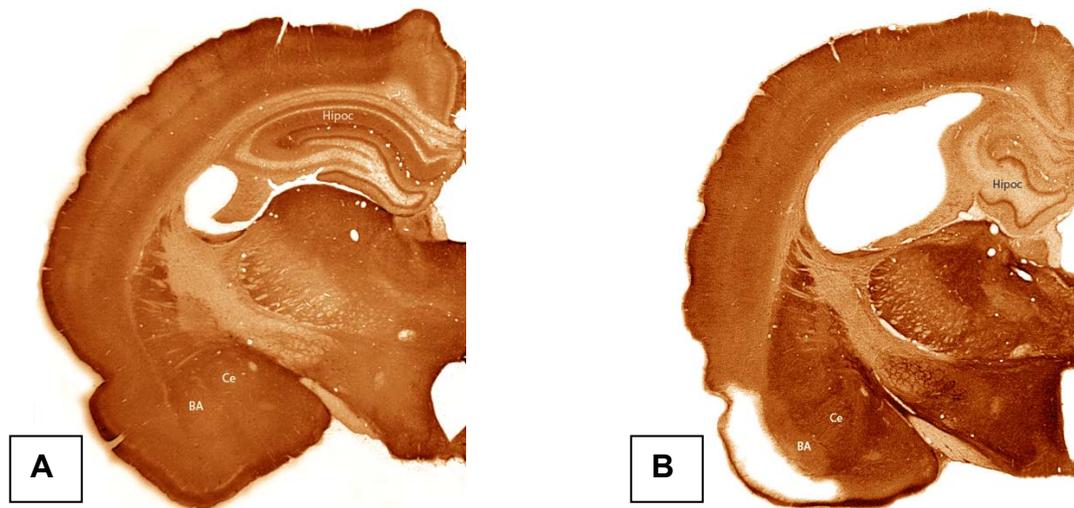


Figura 22. Cortes del hemisferio cerebral izquierdo inmunoreactivos a GAP-43, en donde se puede observar, el hipocampo (Hipoc), la amígdala central (Ce) y basolateral (BA). En **A** se muestra un corte de cerebro de un animal kindling. En **B** se muestra un corte de cerebro de un animal tratado con ácido kaínico. Amplificación 2x.

En resumen, los sujetos tratados con ácido kaínico, mostraron deficiencias en el desarrollo del CAS, tanto en el primero como en el segundo, en donde fue más notorio el deterioro del aprendizaje aversivo.

9.6 DISCUSIÓN

Los sujetos AKLi mostraron un deterioro en el aprendizaje aversivo comparado con los sujetos IntaLi (los cuales no recibieron ningún tratamiento con AK). Estos datos demuestran que otro modelo que provoca daño neuronal y crisis generalizadas, interfiere con el aprendizaje aversivo al sabor. Esto contrasta con el kindling, el cual favorece este aprendizaje.

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios (Kemppainen et al. 2006; Sarkisian et al. 1997; Yin et al. 2005), que también han observado en sujetos con estatus epiléptico inducido por AK, deficiencias en el aprendizaje y memoria de otras tareas. Por ejemplo, en animales con epilepsia inducida por AK, se ha encontrado (Kemppainen et al. 2006) una atenuación de la respuesta al miedo de

un estímulo condicionado (en una tarea llamada “fear conditioning”). También se han reportado (Sarkisian et al. 1997; Yin et al. 2005) deficiencias en la memoria espacial en una tarea de laberinto acuático en animales con epilepsia inducida por AK .

Está ampliamente documentado (Chen & Buckmaster 2005; Hopkins et al. 2000; Schwob et al. 1980) que las crisis epilépticas por AK inducen daño neuronal. En la figura 22 B se muestra un corte del hemisferio cerebral izquierdo de un animal tratado con AK, en el cual se puede ver un enorme ventrículo lateral, un hipocampo deformado, un orificio en la zona donde se encontraba la corteza piriforme y solo se observa una parte de la amígdala basolateral. Por lo que el deterioro en el aprendizaje aversivo pudo ser causado por el daño neuronal que provoca el AK. A partir de las primeras 4 horas después de la inyección de AK el daño neuronal empieza a ser notable (Chen & Buckmaster 2005). Este daño neuronal se presenta en diferentes estructuras cerebrales, entre ellas, el hipocampo, la AMGb, la AMGc y la CI (Hopkins et al. 2000; Schwob et al. 1980; Weiss et al. 1996), que están implicadas en el CAS. En la figura 22 B se pueden observar algunas de estas áreas lesionadas por el AK El deterioro en esta tarea de aprendizaje, fue posiblemente resultado no sólo del daño en la CI y la AMG, ya que otras estructuras cerebrales también presentan daño neuronal y necrosis, entre las cuales están, la corteza piriforme, la corteza entorrinal, la región septal y el tálamo (Chen & Buckmaster 2005). Por lo tanto, el efecto del AK sobre el CAS es inespecífico, ya que la pérdida neuronal involucra diferentes regiones cerebrales.

Cuando se evaluó el segundo CAS o segundo condicionamiento, en donde se empleó el cloruro de sodio como EC, los sujetos tratados con AK, mostraron un completo bloqueo en el aprendizaje aversivo del CAS, que pudo ser consecuencia

de una alteración en la neofobia del sabor, ya que consumieron más del estímulo condicionado en el día de la adquisición, o pudo ser un efecto combinado, tanto del deterioro de la neofobia inicial como del déficit en el aprendizaje aversivo. Recientemente, De la Cruz et al. (2008) encontraron que el hipocampo parece ser esencial en procesos asociados a la neofobia, por lo que la disminución de la neofobia hacia la solución con sacarina en el primer día de exposición de esta solución, pudo estar relacionado con el daño en el hipocampo.

El hecho de que los sujetos tratados con AK en el segundo CAS con la solución salina como EC, hayan presentando un claro déficit del aprendizaje aversivo, pudo deberse a un daño neuronal progresivo y a un aumento de las crisis convulsivas espontáneas.

Esto contrasta con los datos observados con el kindling, ya que se ha demostrado que el kindling no induce daño neuronal (Hawrylak et al. 1993; Letty et al. 1995; Smith et al. 2005; Tooyama et al. 2002) en la estructura estimulada ni en otras regiones cerebrales (Tuunanen & Pitkanen 2000). El daño neuronal no se observa después de cinco fases 5 (Tuunanen & Pitkanen 2000), incluso se ha reportado (Brandt et al. 2004) que cuando se realiza kindling extendido (varias estimulaciones eléctricas después de la fase 5 hasta provocar crisis espontáneas), este se desarrolla en ausencia de daño neuronal.

Otros trabajos (Letty et al. 1995; Tooyama et al. 2002), han comparado simultáneamente las alteraciones neuronales inducidas tanto por el modelo de estatus inducido por AK como por el modelo del kindling. Letty et al (1995) encontraron, en los animales con estatus epiléptico inducido por AK, lesiones severas en la amígdala, corteza piriforme e hipocampo y además los sujetos presentaron deficiencias en la memoria espacial. Por el contrario, cuando

evaluaron a los sujetos con kindling no encontraron lesiones en ninguna de las estructuras cerebrales y los sujetos no mostraron deficiencias en la memoria. En otro estudio (Tooyama et al. 2002), observaron que los sujetos con estatus epiléptico inducido con AK presentaron microglia reactiva, lo cual indicaba un proceso de degeneración neuronal. En cambio, los sujetos con kindling no mostraron procesos de degeneración neuronal. Estos datos nos sugieren que la disminución en la expresión de GAP-43 y Syp, observada en los sujetos con kindling de la AMGc y CI, está posiblemente relacionada a procesos de reorganización neuronal y tal vez asociados con la misma tarea del CAS, tal como ya se explicó previamente. En el caso de los sujetos tratados con AK, sus deficiencias en el CAS fueron posiblemente causados por el daño neuronal provocado por el AK. Es claro, que estos dos modelos (kindling y estatus epiléptico inducido por ácido kaínico) tienen efectos conductuales diferentes, ya que los procesos neuronales asociados en cada uno de ellos son distintos.

CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados del presente trabajo demuestran para el caso del experimento uno, que todos los sujetos sham y con kindling, fueron capaces de aprender la tarea aversiva. Estos datos contradicen los trabajos que señalan que el kindling interfiere con el aprendizaje y memoria (revisar Hannesson & Corcoran 2000). Además, encontramos que los sujetos con kindling en CI y AMGc mostraron una mayor aversión hacia la sacarina que los sujetos sham y con kindling del APM. Esto nos sugiere que el kindling en CI y AMGc probablemente esté facilitando el aprendizaje aversivo y que los efectos del kindling son específicos del sitio de estimulación, esto fue evidente ya que la estimulación eléctrica en el APM no tuvo ningún efecto sobre el CAS, ya que es una estructura que no está involucrada en este tipo de aprendizaje aversivo. Cuando los sujetos sham y con kindling en CI, AMGc y APM, fueron nuevamente entrenados en un segundo CAS con una dosis baja de LiCl que es incapaz de inducir un claro aprendizaje aversivo, los sujetos presentaron nuevamente la aversión al sabor. Esto sugiere, que los sujetos recordaban la asociación EC-EI que fue adquirida durante el primer CAS. Sin embargo, sólo los sujetos con kindling en CI y AMGc presentaron una aversión más fuerte hacia el EC (sacarina). Lo cual indica que los sujetos con kindling en CI y AMGc recordaban mejor la asociación EC-EI que fue adquirida en el primer CAS.

En el experimento dos, se encontró una menor expresión de GAP-43 y Syp, en el lado contralateral del sitio de estimulación de los sujetos con kindling en CI y AMGc con respecto a los sujetos sham. De forma interesante el APM (una región no relacionada con el CAS) de los sujetos estimulados en dicha región, mostraron una mayor inmunoreactividad de GAP-43 pero únicamente en el lado derecho (sitio de estimulación). En estos sujetos no hubo cambios en la expresión de Syp, esto

sugiere, que probablemente la disminución en los niveles de expresión de la GAP-43 y Syp, no sólo sean consecuencia de los efectos del kindling sino de los mecanismos implicados en el CAS. Como se propuso anteriormente, la disminución en la expresión de estas proteínas, podría reflejar un proceso de eliminación sináptica, asociado a una remodelación de los circuitos neuronales. En el caso del APM, el incremento en la expresión de GAP-43, probablemente sólo fue consecuencia del kindling y no del CAS, porque es una región que no está implicada en el procesamiento del CAS. El hecho de que los cambios en los niveles de expresión de la GAP-43 y Syp, sean predominantemente del lado contralateral del sitio de estimulación, es difícil de explicar. Una posible sugerencia, es que el lado del sitio de estimulación, primero se haya saturado, por la entrada directa del estímulo eléctrico. Es decir, la sobreexcitabilidad neuronal generada por la directa estimulación eléctrica pudo generar mecanismos homeostáticos inmediatos que impiden la “saturación del sistema”¹¹ (Brael-Jungerman et al. 2007), impidiendo la excitación crónica que podría causar una disfunción (Brael-Jungerman et al. 2007). Esto pudo favorecer, en el sitio de estimulación, una mayor facilidad para que se disparen los mecanismos de eliminación sináptica y por lo tanto se desencadene más rápidamente la estabilización sináptica, hasta alcanzar los niveles basales de estas proteínas (GAP-43 y Syp). Es probable que el lado contralateral del sitio de estimulación, aún no haya alcanzado una completa estabilización sináptica.

Por último, en el experimento tres, los sujetos tratados con AK, mostraron un bloqueo del aprendizaje aversivo. El daño neuronal que caracteriza a los sujetos

¹¹ Término empleado en Brael-Jungerman et al. (2007) y usado en los modelos de redes neuronales.

con crisis inducida por AK, pudo ser responsable de la interrupción del CAS. Estos datos nos sugieren que la disminución en la expresión de GAP-43 y Syp, observada en los sujetos con kindling de la AMGc y CI, está posiblemente relacionada con procesos de reorganización neuronal. En el caso de los sujetos tratados con AK, sus deficiencias en el CAS estuvieron posiblemente relacionadas con el daño neuronal provocado por el AK. Estos modelos tienen efectos conductuales diferentes, ya que los procesos neuronales asociados en cada uno de ellos son distintos.

En futuros experimentos será importante evaluar si los niveles de expresión de GAP-43 y Syp varían en diferentes etapas del CAS. Por ejemplo, medir los niveles de expresión de las proteínas GAP-43 y Syp, inmediatamente después de la adquisición, o medirlas en el primer día de prueba del CAS (primer día de la evocación del CAS), o medirlas en el día inicial de la extinción o en diferentes días de la extinción. Esto, tal vez nos permita saber, si la disminución de la GAP-43 y Syp se debe a la extinción o a un fortalecimiento del aprendizaje aversivo.

Antes de finalizar, es importante hacer algunos señalamientos con respecto al estudio de los mecanismos de la plasticidad en el kindling.

Los cambios funcionales y estructurales a largo plazo de los circuitos neuronales que provoca el kindling son similares a los que induce el LTP. Por ejemplo, en ambos se produce una facilitación sináptica, dependen de la síntesis de proteínas que resultan en cambios estructurales sinápticos, muchos de estos se traslapan, sugiriendo un continuum de las modificaciones neuronales que conducen tanto a funciones normales (ej. memoria) como anormales (crisis epilépticas) (McEachern & Shaw 1999; Meador 2007). A pesar de que el kindling ha sido

investigado en el contexto de su relevancia clínica en la epilepsia y la potenciación sináptica inducida por las crisis, sólo pocos estudios están relacionados con la plasticidad sináptica después del kindling (Schubert et al. 2005).

REFERENCIAS

- Adamec, R., Blundell, J. & Burton, P. 2004 Anxiolytic effects of kindling role of anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right basolateral amygdala. *Brain Res* **1024**, 44-58.
- Adamec, R. & Young, B. 2000 Neuroplasticity in specific limbic system circuits may mediate specific kindling induced changes in animal affect-implications for understanding anxiety associated with epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 705-23.
- Adamec, R. E. 1999 Evidence that limbic neural plasticity in the right hemisphere mediates partial kindling induced increases in anxiety-like behavior: effects of low frequency stimulation (quenching?) on long term potentiation of amygdala efferents and behavior following kindling. *Brain Res* **839**, 133-52.
- Adams, B., Von Ling, E., Vaccarella, L., Ivy, G. O., Fahnstock, M. & Racine, R. J. 1998 Time course for kindling-induced changes in the hilar area of the dentate gyrus: reactive gliosis as a potential mechanism. *Brain Res* **804**, 331-6.
- Agassandian, K., Gedney, M. & Cassell, M. D. 2006 Neurotrophic factors in the central nucleus of amygdala may be organized to provide substrates for associative learning. *Brain Res* **1076**, 78-86.
- Akiyama, K., Ishikawa, M. & Saito, A. 2008 mRNA expression of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (arc) in the amygdala-kindled rats. *Brain Res* **1189**, 236-46.
- Alheid, G. F., Olmos, J. S. & Beltramino, C. A. 1995 Amygdala and Extended Amygdala. In *The Rat Nervous System* (ed. G. Paxinos), pp. 495-578. San Diego, California: Academic Press.

- Alonso-DeFlorida, F. & Delgado, J. M. 1958 Lasting behavioral and EEG changes in cats induced by prolonged stimulation of amygdala. *Am J Physiol* **193**, 223-9.
- Anisman, H. & McIntyre, D. C. 2002 Conceptual, spatial, and cue learning in the Morris water maze in fast or slow kindling rats: attention deficit comorbidity. *J Neurosci* **22**, 7809-17.
- Armijo, J. A., de las Cuevas, I. & Adin, J. 2000 [Ion channels and epilepsy]. *Rev Neurol* **30 Suppl 1**, S25-41.
- Arthur, J. B. 1975 Taste aversion learning is impaired by interpolated amygdaloid stimulation but not by posttraining amygdaloid stimulation. *Behav Biol* **13**, 369-76.
- Bahar, A., Dorfman, N. & Dudai, Y. 2004 Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* **19**, 1115-8.
- Bahar, A., Samuel, A., Hazvi, S. & Dudai, Y. 2003 The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci* **17**, 1527-30.
- Bastrikova, N., Gardner, G. A., Reece, J. M., Jeromin, A. & Dudek, S. M. 2008 Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3123-7.
- Batsell, W. R. & Best, M. R. 1993 One bottle too many? Method of testing determines the detection of overshadowing and retention of taste aversions. *Anim Learn Behav* **21**, 154 –8.
- Batsell, W. R., Jr. & George, J. W. 1996 Unconditioned stimulus intensity and retention interval effects. *Physiol Behav* **60**, 1463-7.

- Bendotti, C., Vezzani, A., Tarizzo, G. & Samanin, R. 1993 Increased expression of GAP-43, somatostatin and neuropeptide Y mRNA in the hippocampus during development of hippocampal kindling in rats. *Eur J Neurosci* **5**, 1312-20.
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmer, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M. & Lindvall, O. 1997 Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10432-7.
- Benowitz, L. I., Apostolides, P. J., Perrone-Bizzozero, N., Finklestein, S. P. & Zwiers, H. 1988 Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J Neurosci* **8**, 339-52.
- Benowitz, L. I. & Routtenberg, A. 1997 GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* **20**, 84-91.
- Berg, M. J., Stryer, L., Tymoczko, J. & Macarulla, J. M. 2008 Composición y estructura de las proteínas. In *Bioquímica* (ed. J. Mark Berg, L. Stryer, J. Tymoczko & J. M. Macarulla), pp. 35. Barcelona: Reverté.
- Berman, D. E. & Dudai, Y. 2001 Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* **291**, 2417-9.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V. & Dudai, Y. 2000 The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* **20**, 7017-23.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. & Dudai, Y. 1998 Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci* **18**, 10037-44.

- Berman, D. E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A. & Dudai, Y. 2003 Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learn Mem* **10**, 16-25.
- Bermudez-Rattoni, F. 2004 Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* **5**, 209-17.
- Bermudez-Rattoni, F., Ramirez-Lugo, L., Gutierrez, R. & Miranda, M. I. 2004 Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cell Mol Neurobiol* **24**, 25-36.
- Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. 1993 A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-9.
- Bramham, C. R. & Messaoudi, E. 2005 BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* **76**, 99-125.
- Brandt, C., Ebert, U. & Loscher, W. 2004 Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res* **62**, 135-56.
- Brown, M. W. & Bashir, Z. I. 2002 Evidence concerning how neurons of the perirhinal cortex may effect familiarity discrimination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **357**, 1083-95.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S. & Laroche, S. 2007 Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist* **13**, 492-505.
- Bussey, T. J., Saksida, L. M. & Murray, E. A. 2006 Perirhinal cortex and feature-ambiguous discriminations. *Learn Mem* **13**, 103-5.
- Cain, D. P., Hargreaves, E. L., Boon, F. & Dennison, Z. 1993 An examination of the relations between hippocampal long-term potentiation, kindling,

- afterdischarge, and place learning in the water maze. *Hippocampus* **3**, 153-63.
- Cammisuli, S., Murphy, M. P., Ikeda-Douglas, C. J., Balkissoon, V., Holsinger, R. M., Head, E., Michael, M., Racine, R. J. & Milgram, N. W. 1997 Effects of extended electrical kindling on exploratory behavior and spatial learning. *Behav Brain Res* **89**, 179-90.
- Carew, T. J. 1996 Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* **16**, 5-8.
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzman, Y. & Escobar, M. L. 2006 Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* **1067**, 250-5.
- Cavazos, J. E., Golarai, G. & Sutula, T. P. 1991 Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* **11**, 2795-803.
- Cavazos, J. E., Zhang, P., Qazi, R. & Sutula, T. P. 2003 Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J Comp Neurol* **458**, 272-92.
- Citri, A. & Malenka, R. C. 2008 Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 18-41.
- Collingridge, G. 1987 Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* **330**, 604-5.
- Coulter, D. A., McIntyre, D. C. & Loscher, W. 2002 Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? *Brain Pathol* **12**, 240-56.
- Covolan, L. & Mello, L. E. 2000 Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* **39**, 133-52.

- Chen, S. & Buckmaster, P. S. 2005 Stereological analysis of forebrain regions in kainate-treated epileptic rats. *Brain Res* **1057**, 141-52.
- Dalby, N. O., Rondouin, G. & Lerner-Natoli, M. 1995 Increase in GAP-43 and GFAP immunoreactivity in the rat hippocampus subsequent to perforant path kindling. *J Neurosci Res* **41**, 613-9.
- Dalton, G. L., Wang, Y. T., Floresco, S. B. & Phillips, A. G. 2007 Disruption of AMPA Receptor Endocytosis Impairs the Extinction, but not Acquisition of Learned Fear. *Neuropsychopharmacology* **33**, 2416-26.
- De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I. & Bermudez-Rattoni, F. 2008 Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci* **28**, 1377-81.
- de la Torre-Vacas, L. & Aguero-Zapata, A. 2006 [The neural bases of taste aversion learning: the formation of acquired hedonic taste representations]. *Rev Neurol* **43**, 25-31.
- De Paola, V., Holtmaat, A., Knott, G., Song, S., Wilbrecht, L., Caroni, P. & Svoboda, K. 2006 Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron* **49**, 861-75.
- Delgado, J. M. R. & Sevillano, M. 1961 Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **13**, 722-33.
- Desmedt, A., Hazvi, S. & Dudai, Y. 2003 Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of the associative process engaged: taste versus context association. *J Neurosci* **23**, 6102-10.

- Dragoin, W., McCleary, G. E. & McCleary, P. 1971 A comparison of two methods of measuring conditioned taste aversion. *Behav Res Methods and Instrumentation* **3**, 309-10.
- Dunn, L. T. & Everitt, B. J. 1988 Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav Neurosci* **102**, 3-23.
- Eisenberg, M., Kobilov, T., Berman, D. E. & Dudai, Y. 2003 Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**, 1102-4.
- El Far, O. & Betz, H. 2002 Synaptophysins: vesicular cation channels? *J Physiol* **539**, 332.
- Elmer, E., Kokaia, M., Kokaia, Z., Ferencz, I. & Lindvall, O. 1996 Delayed kindling development after rapidly recurring seizures: relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Res* **712**, 19-34.
- Escobar, M. L., Alcocer, I. & 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. *Behav Brain Res* **129**, 101-6.
- Escobar, M. L. & Bermúdez-Rattoni, F. 2000 Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* **852**, 208-12.
- Escobar, M. L., Chao, V. & Bermudez-Rattoni, F. 1998 In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res* **779**, 314-9.

- Escobar, M. L., Figueroa-Guzman, Y. & Gomez-Palacio-Schjetnan, A. 2003 In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* **991**, 274-9.
- Feasey-Truger, K. J., Kargl, L. & Bruggencate, G. T. 1993 Differential effects kindling on working and reference spatial memory in the rat. *Neurosci Lett.* **151**, 25-28.
- Ferreira, G., Ferry, B., Meurisse, M. & Levy, F. 2006 Forebrain structures specifically activated by conditioned taste aversion. *Behav Neurosci* **120**, 952-62.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V. & Bermudez-Rattoni, F. 2002 Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci* **16**, 1139-45.
- Ferreira, G., Miranda, M. I., De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C. J. & Bermudez-Rattoni, F. 2005 Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci* **22**, 2596-604.
- Figueroa-Guzman, Y. & Reilly, S. 2008 NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Res* **1210**, 200-3.
- Foster, J. A., Puchowicz, M. J., McIntyre, D. C. & Herkenham, M. 2004 Activin mRNA induced during amygdala kindling shows a spatiotemporal progression that tracks the spread of seizures. *J Comp Neurol* **476**, 91-102.
- Frank, D. A. & Greenberg, M. E. 1994 CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* **79**, 5-8.
- Freeman, F. G. 1980 Development of kindled seizures and circadian rhythms. *Behav Neural Biol* **30**, 231-5.

- Gabella, G. 1995 Autonomic Nervous System. In *The Rat Nervous System* (ed. G. Paxinos), pp. 126-127. San Diego, California: Academic Press.
- Gallo, M., Roldán, G. & Bures, J. 1992 Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* **52**, 91-7.
- García, J., Kimeldorf, D. J. & Koelling, R. A. 1955 Conditioned aversion to saccharine resulting from exposure to gamma radiation. *Science* **122**, 155-155.
- Geinisman, Y., Morrel, F., Toledo-Morrel, L., Persina, I. S. & Van der Zee, E. A. 1998 Comparison of synapse remodeling following hippocampal kindling and long-term potentiation. In *Kindling 5* (ed. C. M.E. & S. L. Moshé), pp. 179-191. New York: Plenum Press.
- Geinisman, Y., Toledo-Morrel, L. & Morrel, F. 1991 Structural synaptic substrates of kindling and long term potentiation. In *Kindling and synaptic plasticity* (ed. F. Morrel), pp. 124-159. Birkhäuser, Boston: Asco Trade Typesetting Ltd.
- Gilbert, T. H., Hannesson, D. K. & Corcoran, M. E. 2000 Hippocampal kindled seizures impair spatial cognition in the Morris water maze. *Epilepsy Res* **38**, 115-25.
- Goddard, G. B., McIntyre, D. C. & Leech, C. K. 1969 A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* **25**, 295-365.
- Goddard, G. V. 1967 Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* **214**, 1020-1.
- Goddard, G. V. & Douglas, R. M. 1975 Does the engram of kindling model the engram of normal long term memory? *Can J Neurol Sci* **2**, 385-94.

- Grote, F. W. & Brown, R. T. 1971 Conditioned taste aversions: two-stimulus tests are more sensitive than one-stimulus tests. *Behav Res Methods and Instrumentation* **3**, 311-12.
- Gu, Y., Gonzalez, M. F., Chin, D. Y. & Deutsch, J. A. 1993 Expression of c-fos in brain subcortical structures in response to nauseant lithium chloride and osmotic pressure in rats. *Neurosci Lett* **157**, 49-52.
- Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., Ramirez-Amaya, V. & Bermudez-Rattoni, F. 1999 Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* **89**, 751-8.
- Gutierrez, H., Miranda, M. I. & Bermudez-Rattoni, F. 1997 Learning impairment and cholinergic deafferentation after cortical nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* **17**, 3796-803.
- Gutiérrez, R., Tellez, L. A. & Bermúdez-Rattoni, F. 2003 Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* **17**, 1556-62.
- Hannesson, D. K. & Corcoran, M. E. 2000 The mnemonic effects of kindling. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 725-51.
- Hannesson, D. K., Howland, J., Pollock, M., Mohapel, P., Wallace, A. E. & Corcoran, M. E. 2001a Dorsal hippocampal kindling produces a selective and enduring disruption of hippocampally mediated behavior. *J Neurosci* **21**, 4443-50.
- Hannesson, D. K., Howland, J. G., Pollock, M., Mohapel, P., Wallace, A. E. & Corcoran, M. E. 2005 Anterior perirhinal cortex kindling produces long-lasting

- effects on anxiety and object recognition memory. *Eur J Neurosci* **21**, 1081-90.
- Hannesson, D. K., Mohapel, P. & Corcoran, M. E. 2001b Dorsal hippocampal kindling selectively impairs spatial learning/short-term memory. *Hippocampus* **11**, 275-86.
- Hawrylak, N., Chang, F. L. & Greenough, W. T. 1993 Astrocytic and synaptic response to kindling in hippocampal subfield CA1. II. Synaptogenesis and astrocytic process increases to in vivo kindling. *Brain Res* **603**, 309-16.
- Hellier, J. L., Patrylo, P. R., Buckmaster, P. S. & Dudek, F. E. 1998 Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **31**, 73-84.
- Hernadi, I., Karadi, Z., Vigh, J., Petyko, Z., Egyed, R., Berta, B. & Lenard, L. 2000 Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res Bull* **53**, 751-8.
- Herry, C. & Garcia, R. 2003 Behavioral and paired-pulse facilitation analyses of long-lasting depression at excitatory synapses in the medial prefrontal cortex in mice. *Behav Brain Res* **146**, 89-96.
- Herry, C. & Mons, N. 2004 Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* **20**, 781-90.
- Hinz, B., Becher, A., Mitter, D., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A. & Ahnert-Hilger, G. 2001 Activity-dependent changes of the presynaptic

- synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol* **80**, 615-9.
- Holahan, M. R., Honegger, K. S., Tabatadze, N. & Routtenberg, A. 2007 GAP-43 gene expression regulates information storage. *Learn Mem* **14**, 407-15.
- Hopkins, K. J., Wang, G. & Schmued, L. C. 2000 Temporal progression of kainic acid induced neuronal and myelin degeneration in the rat forebrain. *Brain Res* **864**, 69-80.
- Houpt, T. A. & Berlin, R. 1999 Rapid, labile, and protein synthesis-independent short-term memory in conditioned taste aversion. *Learn Mem* **6**, 37-46.
- Houpt, T. A., Philopena, J. M., Wessel, T. C., Joh, T. H. & Smith, G. P. 1994 Increased c-fos expression in nucleus of the solitary tract correlated with conditioned taste aversion to sucrose in rats. *Neurosci Lett* **172**, 1-5.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. & Greengard, P. 1985 A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4137-41.
- Joy, R. M. 1985 The effects of neurotoxicants on kindling and kindled seizures. *Fundam Appl Toxicol* **5**, 41-65.
- Kamikubo, Y., Egashira, Y., Tanaka, T., Shinoda, Y., Tominaga-Yoshino, K. & Ogura, A. 2006 Long-lasting synaptic loss after repeated induction of LTD: independence to the means of LTD induction. *Eur J Neurosci* **24**, 1606-16.
- Kellett, J. & Kokkinidis, L. 2004 Extinction deficit and fear reinstatement after electrical stimulation of the amygdala: implications for kindling-associated fear and anxiety. *Neuroscience* **127**, 277-87.

- Kelly, M. E. 1998 The Kindling Model of Temporal Lobe Epilepsy. In *Neuropharmacology Methods in Epilepsy Research* (ed. S. L. Peterson & T. E. Albertson), pp. 41-74. Boca Raton, Florida: CRS Press.
- Kelly, M. E. & McIntyre, D. C. 1994 Hippocampal kindling protects several structures from the neuronal damage resulting from kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res* **634**, 245-56.
- Kemppainen, E. J., Nissinen, J. & Pitkanen, A. 2006 Fear conditioning is impaired in systemic kainic acid and amygdala-stimulation models of epilepsy. *Epilepsia* **47**, 820-9.
- Kesner, R. P., Berman, R. F., Burton, B. & Hankins, W. G. 1975 Effects of electrical stimulation of amygdala upon neophobia and taste aversion. *Behav Biol* **13**, 349-58.
- Khurgel, M. & Ivy, G. O. 1996 Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis. *Epilepsy Res* **26**, 163-75.
- Koh, M. T., Clarke, S. N., Spray, K. J., Thiele, T. E. & Bernstein, I. L. 2003a Conditioned taste aversion memory and c-Fos induction are disrupted in RIIbeta-protein kinase A mutant mice. *Behav Brain Res* **143**, 57-63.
- Koh, M. T., Wilkins, E. E. & Bernstein, I. L. 2003b Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci* **117**, 1416-22.
- Kolb, B. 1995a Plasticity in the Normal Brain. In *Brain Plasticity and Behavior* (ed. B. Kolb), pp. 16-33. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.
- Kolb, B. 1995b Some Basic Concepts, Examples and Biases. In *Brain Plasticity and Behavior* (ed. B. Kolb), pp. 2-15. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

- Kolb, B. & Wishaw, I. Q. 1998 Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol* **49**, 43-64.
- Kwon, B., Goltz, M. & Houpt, T. A. 2008 Expression of AP-1 family transcription factors in the amygdala during conditioned taste aversion learning: role for Fra-2. *Brain Res* **1207**, 128-41.
- Lamprecht, R. & Dudai, Y. 1995 Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl. *Neuroreport* **7**, 289-93.
- Lamprecht, R. & Dudai, Y. 1996 Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem* **3**, 31-41.
- Lamprecht, R. & Dudai, Y. 2000 The Amygdala in Conditioned Taste Aversion: it's there, but where. In *The Amygdala* (ed. J. P. Aggleton), pp. 331-351. Oxford: University Press.
- Lamprecht, R., Hazvi, S. & Dudai, Y. 1997 cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long-but not short-term conditioned taste aversion memory. *J Neurosci* **17**, 8443-50.
- Lasiter, P. S. 1985 Thalamocortical relations in taste aversion learning: II. Involvement of the medial ventrobasal thalamic complex in taste aversion learning. *Behav Neurosci* **99**, 477-95.
- Lasiter, P. S., Deems, D. A. & Glanzman, D. L. 1985 Thalamocortical relations in taste aversion learning: I. Involvement of gustatory thalamocortical projections in taste aversion learning. *Behav Neurosci* **99**, 454-76.
- Leite, J. P., Garcia-Cairasco, N. & Cavalheiro, E. A. 2002 New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* **50**, 93-103.

- LePiane, F. G. & Phillips, A. G. 1978 Differential effects of electrical stimulation of amygdala, caudate-putamen or substantia nigra pars compacta on taste aversion and passive avoidance in rats. *Physiol Behav* **21**, 979-85.
- Lerma, J. 2004 [Synaptic physiology of the kainate receptors and its influence in epileptogenesis]. *Neurologia* **19**, 106-16.
- Letty, S., Lerner-Natoli, M. & Rondouin, G. 1995 Differential impairments of spatial memory and social behavior in two models of limbic epilepsy. *Epilepsia* **36**, 973-82.
- Leung, L. S. & Shen, B. 2006 Hippocampal CA1 kindling but not long-term potentiation disrupts spatial memory performance. *Learn Mem* **13**, 18-26.
- Li, S., Reinprecht, I., Fahnestock, M. & Racine, R. J. 2002 Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex and entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* **115**, 1221-1229.
- Majkowski, J. 1986 Kindling: a model for epilepsy and memory. *Acta Neurol Scand Suppl* **109**, 97-108.
- McDonald, A. J. 1998 Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* **55**, 257-332.
- McEachern, J. C. & Shaw, C. A. 1999 The plasticity-pathology continuum: defining a role for the LTP phenomenon. *J Neurosci Res* **58**, 42-61.
- McGaugh, J. L. 2000 Memory-a century of consolidation. *Science* **287**, 248-251.
- McIntyre, D. C., Poulter, M. O. & Gilby, K. 2002 Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res* **50**, 79-92.
- Meador, K. J. 2007 The basic science of memory as it applies to epilepsy. *Epilepsia* **48 Suppl 9**, 23-5.

- Meberg, P. J., Barnes, C. A., McNaughton, B. L. & Routtenberg, A. 1993 Protein kinase C and F1/GAP-43 gene expression in hippocampus inversely related to synaptic enhancement lasting 3 days. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 12050-4.
- Mickley, G. A., Hoxha, Z., Bacik, S., Kenmuir, C. L., Wellman, J. A., Biada, J. M. & DiSorbo, A. 2007 Spontaneous recovery of a conditioned taste aversion differentially alters extinction-induced changes in c-Fos protein expression in rat amygdala and neocortex. *Brain Res* **1152**, 139-57.
- Mikulka, P. J. & Freeman, F. G. 1984 The effect of amygdala-kindled seizures on acquisition of taste and odor aversions. *Physiol Behav* **32**, 967-72.
- Ming, G. L. & Song, H. 2005 Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28**, 223-50.
- Miranda, M. I. & Bermudez-Rattoni, F. 1999 Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6478-82.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L. & Bermudez-Rattoni, F. 2002 Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11417-22.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L. & Bermudez-Rattoni, F. 2003 Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiol Learn Mem* **80**, 211-22.
- Miranda, M. I. & McGaugh, J. L. 2004 Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala. *Learn Mem* **11**, 312-7.

- Miranda, M. I., Ramirez-Lugo, L. & Bermudez-Rattoni, F. 2000 Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* **882**, 230-5.
- Mody, I. & Lieberman, D. 1998 Lasting Prolongation of NMDA Channel Openings After Kindling. In *Kindling 5* (ed. M. E. Corcoran & S. Moshé), pp. 65-73. New York: Plenum Press.
- Moguel-Gonzalez, M., Gomez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M. L. 2008 BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem* **90**, 584-7.
- Mohapel, P. & Corcoran, M. E. 1996 Kindling antagonism: interactions of the amygdala with the piriform, perirhinal, and insular cortices. *Brain Res* **733**, 211-18.
- Mohapel, P., Zhang, X., Gillespie, G. W., Chlan-Fourney, J., Hannesson, D. K., Corley, S. M., Li, X. M. & Corcoran, M. E. 2001 Kindling of claustrum and insular cortex: comparison to perirhinal cortex in the rat. *Eur J Neurosci* **13**, 1501-19.
- Mokin, M., Zheng, Z. & Keifer, J. 2007 Conversion of silent synapses into the active pool by selective GluR1-3 and GluR4 AMPAR trafficking during in vitro classical conditioning. *J Neurophysiol* **98**, 1278-86.
- Morgan, H. D., Watchus, J. A., Milgram, N. W. & Fleming, A. S. 1999 The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behav Brain Res* **99**, 61-73.
- Morimoto, K., Fahnestock, M. & Racine, R. J. 2004 Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* **73**, 1-60.

- Morrel, F. (ed.) 1991 *Kindling and Synaptic Plasticity. The legacy of Graham Goddard*. Kindling and Synaptic Plasticity. Birkhäuser, Boston: Asco Trade Typesetting Ltd.
- Moser, E. I., Krobot, K. A., Moser, M. B. & Morris, R. G. 1998 Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* **281**, 2038-42.
- Moshé, S. L., Sperber, E. F. & Albala, B. J. 1991 Kindling as a Model of Epilepsy in Developing Animals. In *Kindling and Synaptic Plasticity* (ed. F. Morrel), pp. 177-194. Birkhäuser, Boston.
- Nachman, M. & Ashe, J. H. 1973 Learned taste aversions in rats as a function of dosage, concentration, and route of administration of LiCl. *Physiol Behav* **10**, 73-8.
- Nachman, M. & Hartley, P. L. 1975 Role of illness in producing learned taste aversions in rats: a comparison of several rodenticides. *J Comp Physiol Psychol* **89**, 1010-8.
- Navarro, M., Spray, K. J., Cubero, I., Thiele, T. E. & Bernstein, I. L. 2000 cFos induction during conditioned taste aversion expression varies with aversion strength. *Brain Res* **887**, 450-3.
- Nijijima, A. & Yamamoto, T. 1994 The effects of lithium chloride on the activity of the afferent nerve fibers from the abdominal visceral organs in the rat. *Brain Res Bull* **35**, 141-5.
- Nishijo, H. & Norgren, R. 1990 Responses from parabrachial gustatory neurons in behaving rats. *J Neurophysiol* **63**, 707-24.
- Nithianantharajah, J. & Murphy, M. 2008 Auditory specific fear conditioning results in increased levels of synaptophysin in the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* **90**, 36-43.

- Norgen, R. 1995 Gustatory System. In *The Rat Nervous System* (ed. G. Paxinos), pp. 751-771. San Diego, California: Academic Press.
- Paredes, R., Haller, A. E., Manero, M. C., Alvarado, R. & Agmo, A. 1990 Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain Res* **515**, 20-6.
- Paredes, R. G., Muzzi, G., Aguirre, E. & Romero, V. 2000 Can a generalized kindling seizure induce a reward state? *Epilepsy Res* **38**, 249-57.
- Parent, J. M., Janumpalli, S., McNamara, J. O. & Lowenstein, D. H. 1998 Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci Lett.* **247**, 9-12.
- Paxinos, G. 1995 Gustatory System. In *The rat nervous system* (ed. G. Paxinos), pp. Cap 29. San Diego: Academic Press.
- Paxinos, G. & Watson, C. H. 1987 The brain in stereotaxic coordinates. In *Academic Press, New York*.
- Peele, D. B. & Gilbert, M. E. 1992 Functional dissociation of acute and persistent cognitive deficits accompanying amygdala-kindled seizures. *Behav Brain Res* **48**, 65-76.
- Penner, M. R., Pinaud, R. & Robertson, H. A. 2001 Rapid kindling of the hippocampus protects against neural damage resulting from status epilepticus. *Neuroreport* **12**, 453-7.
- Pinel, J. P. & Rovner, L. I. 1978 Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol* **58**, 190-202.
- Pitkanen, A. 2000 Connectivity of the rat amygaloid complex. In *The Amygdala* (ed. J. P. Aggleton), pp. 31-115. Oxford: University Press.

- Portillo, W., Basañez, E. & Paredes, R. G. 2003 Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Research* **96**, 10-14.
- Price, J. L., Russisken, F. T. & Amaral, D. G. 1987 The limbic region. II: The amygdaloid complex. . In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. (ed. B. T. Hokfelt & L. W. Swanson), pp. 279-381. Amsterdam: Elsevier.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O. & Williams, S. M. 2001 Plasticity of Mature Synapses and Circuits. In *Neuroscience* (ed. D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara & S. M. Williams): Sinauer Associates, Inc.
- Racine, R. J. 1972a Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**, 269-79.
- Racine, R. J. 1972b Modification of seizure activity by electrical stimulation: II motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**, 281-94.
- Ramakers, G. M. J., Heinen, K., Gispen, W.-H. & de Graan, P. N. E. 2000 Long Term Depression in the CA1 Field Is Associated with a Transient Decrease in Pre- and Postsynaptic PKC Substrate Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 28682-28687.
- Reibel, S., Benmaamar, R., Le, B. T., Larmet, Y., Kalra, S. P., Marescaux, C. & Depaulis, A. 2003 Neuropeptide Y delays hippocampal kindling in the rat. *Hippocampus* **13**, 557-60.
- Reibel, S., Larmet, Y., Carnahan, J., Marescaux, C. & Depaulis, A. 2000 Endogenous control of hippocampal epileptogenesis: a molecular cascade

- involving brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y. *Epilepsia* **41 Suppl 6**, S127-33.
- Reilly, S. 1999 The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res Bull* **48**, 239-54.
- Reilly, S. & Bornovalova, M. A. 2005 Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 1067-88.
- Rekart, J. L., Meiri, K. & Routtenberg, A. 2005 Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* **15**, 1-7.
- Rescorla, R. A. 1996 Preservation of Pavlovian association through extinction. *Q J Exp Psychol* **49B**, 245-58.
- Robinson, G. B., McNeill, A. H. & Reed, G. D. 1993 Comparison of the short-lasting effects of perforant path kindling on radial maze learning. *Behav Neurosci* **107**, 988-95.
- Rodríguez-Moreno, A. 2003 [Kainate receptors. Their function in the regulation of GABAergic synaptic transmission in the hippocampus]. *Rev Neurol* **36**, 852-9.
- Roldán, G. & Bures, J. 1994 Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* **153**, 1-26.
- Rosas, J. M. & Bouton, M. E. 1996 Spontaneous recovery after extinction of a conditioned taste aversion. *Anim Learn Behav* **24**, 341-348.
- Rosen, J. B., Hamerman, E., Sitcoske, M., Glowa, J. R. & Schulkin, J. 1996 Hyperexcitability: exaggerated fear-potentiated startle produced by partial kindling. *Behav Neurosci* **110**, 43-50.

- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S., Lamprecht, R. & Dudai, Y. 1997 NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* **17**, 5129-35.
- Rosenblum, K., Meiri, N. & Dudai, Y. 1993 Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* **59**, 49-56.
- Routtenberg, A., Cantallops, I., Zaffuto, S., Serrano, P. & Namgung, U. 2000 Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7657-62.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez De Armentia, M. & Power, J. 2003 The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* **83**, 803-34.
- Sakai, N. & Yamamoto, T. 1997 Conditioned taste aversion and c-fos expression in the rat brainstem after administration of various USs. *Neuroreport* **8**, 2215-20.
- Sarkisian, M. R., Tandon, P., Liu, Z., Yang, Y., Hori, A., Holmes, G. L. & Stafstrom, C. E. 1997 Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia* **38**, 1157-66.
- Scott, B. W. & Burnham, W. M. 2006 Kindled seizures enhance young neuron survival in the adult rat dentate gyrus. *Acta Neuropathol (Berl)* **111**, 364-71.
- Scott, B. W., Wang, S., Burnham, W. M., De Boni, U. & Wojtowicz, J. M. 1998 Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett* **248**, 73-6.
- Schafe, G. E., Seeley, R. J. & Bernstein, I. L. 1995a Forebrain contribution to the induction of a cellular correlate of conditioned taste aversion in the nucleus of the solitary tract. *J Neurosci* **15**, 6789-96.

- Schafe, G. E., Sollars, S. I. & Bernstein, I. L. 1995b The CS-US interval and taste aversion learning: a brief look. *Behav Neurosci* **109**, 799-802.
- Scharfman, H. E. 2002 Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist* **8**, 154-73.
- Schubert, M., Siegmund, H., Pape, H. C. & Albrecht, D. 2005 Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus. *Learn Mem* **12**, 520-6.
- Schwob, J. E., Fuller, T., Price, J. L. & Olney, J. W. 1980 Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* **5**, 991-1014.
- Sewards, T. V. & Sewards, M. A. 2001 Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* **25**, 395-407.
- Sitcoske O'Shea, M., Rosen, J. B., Post, R. M. & Weiss, S. R. 2000 Specific amygdaloid nuclei are involved in suppression or propagation of epileptiform activity during transition stage between oral automatisms and generalized clonic seizures. *Brain Res* **873**, 1-17.
- Skene, J. H. 1989 Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* **12**, 127-56.
- Skene, J. H., Jacobson, R. D., Snipes, G. J., McGuire, C. B., Norden, J. J. & Freeman, J. A. 1986 A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* **233**, 783-6.
- Smith, D. V., John, S. J. & Boughter, J. D. 2000 Neuronal cell types and taste quality coding. *Physiol Behav* **69**, 77-85.
- Smith, P. D., McLean, K. J., Murphy, M. A., Turnley, A. M. & Cook, M. J. 2005 Seizures, not hippocampal neuronal death, provoke neurogenesis in a

- mouse rapid electrical amygdala kindling model of seizures. *Neuroscience* **136**, 405-15.
- Soule, J., Messaoudi, E. & Bramham, C. R. 2006 Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans* **34**, 600-4.
- Spray, K. J. & Bernstein, I. L. 2004 Afferent and efferent connections of the parvicellular subdivision of iNTS: defining a circuit involved in taste aversion learning. *Behav Brain Res* **154**, 85-97.
- St Andre, J., Albanos, K. & Reilly, S. 2007 C-fos expression in the rat brain following lithium chloride-induced illness. *Brain Res* **1135**, 122-8.
- Stroemer, R. P., Kent, T. A. & Hulsebosch, C. E. 1995 Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* **26**, 2135-44.
- Sutula, T., He, X. X., Cavazos, J. & Scott, G. 1988 Synaptic reorganization in the hippocampus by induced abnormal functional activity. *Science* **239**, 1147-1150.
- Sutula, T. P. 2004 Seizure-induced plasticity and adverse long-term effects of early-life seizures. *Ann Neurol* **56**, 164-5; author reply 165-6.
- Sweatt, J. D. 2003 Rodent Behavioral Learning and Memory Models. In *Mechanism of Memory* (ed. J. D. Sweatt), pp. 29-59. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Teskey, C. G., Hutchinson, J. E. & Kolb, B. 2001 Cortical layer III pyramidal dendritic morphology normalizes within 3 weeks after kindling and dissociated from kindling-induced potentiation. *Brain Res* **911**, 125-33.

- Teskey, G. C., Hutchinson, J. E. & Kolb, B. 1999 Sex differences in cortical plasticity and behavior following anterior cortical kindling in rats. *Cereb Cortex* **9**, 675-82.
- Tokita, K., Karadi, Z., Shimura, T. & Yamamoto, T. 2004 Centrifugal inputs modulate taste aversion learning associated parabrachial neuronal activities. *J Neurophysiol* **92**, 265-79.
- Tooyama, I., Bellier, J. P., Park, M., Minnasch, P., Uemura, S., Hisano, T., Iwami, M., Aimi, Y., Yasuhara, O. & Kimura, H. 2002 Morphologic study of neuronal death, glial activation, and progenitor cell division in the hippocampus of rat models of epilepsy. *Epilepsia* **43 Suppl 9**, 39-43.
- Touzani, K. & Sclafani, A. 2002 Lateral hypothalamic lesions impair flavour-nutrient and flavour-toxin trace learning in rats. *Eur J Neurosci* **16**, 2425-33.
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E. & Svoboda, K. 2002 Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* **420**, 788-94.
- Tucci, S., Rada, P. & Hernandez, L. 1998 Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Res* **813**, 44-9.
- Tuunanen, J. & Pitkanen, A. 2000 Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Res* **39**, 171-6.
- Ullian, E. M., Christopherson, K. S. & Barres, B. A. 2004 Role for glia in synaptogenesis. *Glia* **47**, 209-16.
- Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D. & Benfenati, F. 2004 Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* **26**, 445-53.

- Van der Zee, C. E., Rashid, K., Le, K., Moore, K. A., Stanisz, J., Diamond, J., Racine, R. J. & Fahnstock, M. 1995 Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J Neurosci* **15**, 5316-23.
- Vessal, M., Dugani, C. B., Solomon, D. A., Burnham, W. M. & Ivy, G. O. 2004 Astrocytic proliferation in the piriform cortex of amygdala-kindled subjects: a quantitative study in partial versus fully kindled brains. *Brain Res* **1022**, 47-53.
- Weiss, S., Cataltepe, O. & Cole, A. J. 1996 Anatomical studies of DNA fragmentation in rat brain after systemic kainate administration. *Neuroscience* **74**, 541-51.
- Weiss, S. R. B., Li, H., Sitcoske-O'Shea, M. & Post, R. M. 2000 Amygdala plasticity: the neurobiological implications of kindling. In *The Amygdala* (ed. J. P. Aggleton), pp. 155-194. Oxford: University Press.
- Wiedenmann, B. & Franke, W. W. 1985 Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**, 1017-28.
- Wig, G. S., Barnes, S. J. & Pinel, J. P. 2002 Conditioning of a flavor aversion in rats by amygdala kindling. *Behav Neurosci* **116**, 347-50.
- Yamamoto, T. 1993 Neural mechanisms of taste aversion learning. *Neurosci Res* **16**, 181-5.
- Yamamoto, T. 2006 Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol* **69**, 243-55.
- Yamamoto, T. 2007 Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem Senses* **32**, 105-9.

- Yamamoto, T. & Fujimoto, Y. 1991 Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res Bull* **27**, 403-6.
- Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T. & Yasoshima, Y. 1998 Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol* **76**, 325-48.
- Yamamoto, T., Sako, N., Sakai, N. & Iwafune, A. 1997 Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neurosci Lett* **226**, 127-30.
- Yamamoto, T. & Sawa, K. 2000 Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats. *Brain Res* **866**, 144-51.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Azuma, S., Bai, W. Z. & Wakisaka, S. 1992 C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride. *Neuroreport* **3**, 1049-52.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y. & Sakai, N. 1994 Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* **65**, 123-37.
- Yasoshima, Y., Morimoto, T. & Yamamoto, T. 2000 Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Res* **869**, 15-24.
- Yasoshima, Y., Shimura, T. & Yamamoto, T. 1995 Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats. *Neuroreport* **6**, 2424-2428.

- Yasoshima, 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.
- Yasoshima, Y., Yamamoto, T. & Kobayashi, K. 2005 Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion. *Chem Senses* **30 Suppl 1**, i158-9.
- Yeh, G. C., Bonhaus, D. W., Nadler, J. V. & McNamara, J. O. 1989 N-methyl-D-aspartate receptor plasticity in kindling: quantitative and qualitative alterations in the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8157-60.
- Yin, S., Guan, Z., Tang, Y., Zhao, J., Hong, J. & Zhang, W. 2005 Abnormal expression of epilepsy-related gene ERG1/NSF in the spontaneous recurrent seizure rats with spatial learning memory deficits induced by kainic acid. *Brain Res* **1053**, 195-202.

ANEXO

KINDLING INCREASES AVERSION TO SACCHARIN IN TASTE AVERSION LEARNING

L. LÓPEZ-VELÁZQUEZ, E. AGUIRRE
AND R. G. PAREDES*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro. C.P. 76001, Mexico

Abstract—Kindling is a model in which an initially subconvulsive electrical stimulation of certain brain areas eventually develops a generalized seizure that produces behavioral and long term neuronal changes. In the present study we evaluated if kindling can modify conditioning taste aversion (CTA). In this paradigm animals acquire aversion to saccharin when it is presented as the conditioned stimulus (CS) followed by an injection of lithium chloride (LiCl) that induces a gastric irritation as the unconditioned stimulus (US). Male Wistar rats were implanted with bipolar electrodes aimed at the right amygdala (AMG) or at the right insular cortex (IC). The animals were stimulated daily until they reached stages 2–4 (intermediate) or until kindling was fully established (three consecutive stage 5 seizures). At least two weeks after kindling stimulation had ceased the animals were deprived of water for 24 h and given 10-min drinking sessions twice a day for 4 days. On day 5 (morning session) tap water was replaced by saccharin solution (0.1%), 20 min later the animals were injected with LiCl (7.5 ml/kg i.p., 0.2 M) to induce gastric malaise or taste aversion. After three more days of baseline consumption, water was substituted by a fresh 0.1% saccharin solution to test the aversion. AMG-kindling delayed the extinction of CTA. Animals with kindling in the IC had a higher retention than the sham kindling group; that is, they drank significantly less saccharin solution than the other groups. The results of the present experiment show that local modification of brain function induced by kindling stimulation can prolong the aversive effects of CTA. © 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: kindling, conditioned taste aversion, amygdala, insular cortex, learning and memory.

Kindling is a model in which an electrical subconvulsive stimulation is administered daily in certain brain areas and eventually develops generalized seizures that produce behavioral and long term neuronal changes (Goddard et al., 1969; Goddard and Douglas, 1975). Several studies have demonstrated that kindling can induce behavioral changes. Previously we showed that male rats that did not display sexual behavior, despite being tested on repeated occasions with sexually receptive females, started mating

after kindling was established in the medial preoptic area (Paredes et al., 1990). These males continued to display sexual behavior even 8 months after kindling stimulation had ceased (Portillo et al., 2003). These studies clearly show that kindling produces long term behavioral changes probably associated with the specific brain area stimulated. Other groups have also reported behavioral changes after kindling including modifications in anxiety (Adamec and Young, 2000) and maternal behavior (Morgan et al., 1999). Several studies have assessed the effects of kindling like stimulation upon learning (see (Hannesson and Corcoran, 2000) for a review). In general, these studies have described alterations in learning and memory (Gilbert et al., 2000; Hannesson et al., 2001, 2005; Anisman and McIntyre, 2002). However, the effects of kindling upon learning could be different depending upon the interval between the last seizure and behavioral training. For example it has been shown that when longer periods (7 weeks) are used between kindling stimulation and the behavioral task no impairment of cognitive function is observed (Cammissuli et al., 1997; Leung and Shen, 2006).

The conditioned taste aversion (CTA) paradigm consists of the presentation of a novel flavor (usually saccharin) followed by gastric malaise (usually induced by injection of lithium chloride; LiCl) that produces in the animal a subsequent aversion to the taste. This is a suitable model of learning and memory to study neural plasticity. It requires only one presentation or pairing of the stimuli to establish conditioning. Another important aspect is that the brain areas that participate in CTA have been clearly identified. Several studies have demonstrated the importance of the insular cortex (IC) in the acquisition and storage of CTA (Bermúdez-Rattoni and McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni and Yamamoto, 1998; Gutiérrez et al., 2003). Different groups have shown that the basolateral amygdala (BLA) plays a role in the formation of CTA (Yasoshima et al., 1995; Miranda et al., 2002) whereas the central amygdala (cAMG) is involved in the recognition of the meaning of the conditioned stimulus (CS) (Yasoshima et al., 1995). There is also evidence indicating that the cAMG is important in the acquisition of CTA (Bahar et al., 2003). Likewise, Lamprecht et al. (1997) demonstrated that inhibition of protein synthesis and blockade of the transcription factor cAMP-response element-binding protein (CREB) in cAMG blocked consolidation of CTA memory.

Most of the studies that have assessed the effects of kindling stimulation upon CTA have reported an impairment of the task. In these studies the stimulation was given immediately after training or between the CS and the unconditioned stimulus (US) evaluating only short term ef-

*Corresponding author. Tel: +52-442-2381060; fax: +52-422-2381046. E-mail address: rparedes@servidor.unam.mx (R. Paredes).

Abbreviations: AD, afterdischarge; AMG, amygdala; AP, anteroposterior; BLA, basolateral amygdala; cAMG, central amygdala; CREB, cAMP-response element-binding protein; CS, conditioned stimulus; CTA, conditioned taste aversion; DV, dorsoventral; IC, insular cortex; LiCl, lithium chloride; US, unconditioned stimulus.

fects of kindling stimulation associated with seizure induced alterations (Mikulka and Freeman, 1984; Peele and Gilbert, 1992). As well, these studies have evaluated only one day of the extinction curve. If kindling stimulation does indeed produce long term brain function modification, one way to examine these changes would be to induce kindling and assess behavioral changes several days later including the extinction curve. This would give more emphasis to the long term changes induced by kindling stimulation. The aim of the present study was to evaluate if long term effects of kindling (19 days after the last stimulation) could modify acquisition or extinction of CTA. For that purpose different groups of animals were stimulated daily until they reach stages 2–4 (intermediate) or until kindling was fully established (three consecutive stage 5 seizures) in either the cAMG or IC. Sham-stimulated animals in the cAMG and IC were also included. Two weeks after kindling was established animals were trained for CTA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Male Wistar rats from a local colony, weighing 250–300 g, were maintained in single cages with an *ad libitum* feeding schedule under a 12-h light/dark cycle; the temperature was kept within the range of 19–21 °C. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering during experimental procedures according to the Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para Salud of the Mexican Health Ministry and the Institute Animal Care Committee that follows National Institutes of Health (NIH, USA) guidelines.

Surgery

The rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (95 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) injected intraperitoneally. They were surgically implanted with a bipolar stainless steel insulated electrode at the right cAMG, or the right IC. The following coordinates based on the atlas of Paxinos and Watson (1987) were used: cAMG: anteroposterior (AP) –2.5 mm from bregma; 4.25 mm lateral to the midline; dorsoventral (DV), –8.0 mm from dura madre. IC: AP+1.2 mm from bregma; 5.5 mm lateral to the midline, DV, –5.5 mm from dura mater. Three stainless steel anchor screws were placed in the skull. The rats were returned to their home cage for a 1 week recovery period.

Procedure

After recovery, kindling procedure was initiated. Rats were individually transferred to the kindling room and were attached to a cable connected to a custom-built constant-current generator. On day 1 the afterdischarge (AD) threshold was determined for each rat. The stimulation consisted of a 1-s train of 60-Hz biphasic square-wave pulses of 1 ms duration. Initiating at 100 μ A the stimuli were given in 50 μ A increments until an AD was observed. The duration of the AD was determined from electroencephalographic recordings. The animals were subsequently stimulated twice a day at this threshold. The behavioral progression of kindling induced seizures was scored according to Racine's standard classification (Racine, 1972): stage 1, mouth and facial movements; stage 2, stage 1 and head nodding; stage 3, stage 2 and unilateral forelimb clonus followed by contralateral clonus; stage 4, stage 3 and rearing; stage 5, stage 4 and loss of postural control and falling. The animals were stimulated until they reach stages 2–4 (intermediate) or until kindling was fully established (three

consecutive stage 5 seizures). Sham-stimulated animals were treated identically, but without any electrical stimulation. In this way a total of six groups were formed: sham, intermediate (stages 2–4) and fully kindled animals in the IC, and similar groups in the amygdala (AMG). At least two weeks after kindling was established CTA was initiated. The animals were deprived of water for 24 h and given 10 min drinking twice a day for 4 days. On session 1 (acquisition day, morning of day 5) tap water was replaced by saccharin solution (0.1%), 20 min later the animals were injected with LiCl (7.5 ml/kg i.p., 0.2 M) to induce gastric malaise or taste aversion. In sessions 2, 3 and 4 water was given in the morning and afternoon sessions to obtain baseline consumption. In the morning of session 5 the water given in the morning was substituted by a freshly 0.1% saccharin solution to test the aversion (session 5) and extinction (sessions 6–9). The pairing between the CS (saccharin) and the US (LiCl) occurred at least 19 days after the last kindling seizure while testing (presentation of the CS) was done at least 23 days after.

Histology

At the end of the experiment the rats were killed and perfused using standard procedures. The brains were removed from the cranium and were placed in 30% sucrose/PBS solution for cryoprotection. Brains were frozen and cut in the coronal plane at 35 μ m sections. Later they were mounted and stained with Cresyl Violet for histological verification of electrode placements.

Statistical analysis

The number of stimuli and the number of AD to produce stage 5 were analyzed with a *t*-test. AD duration was analyzed by a 2 (group) \times 9 (sessions) ANOVA for repeated measures of the session factor. These parameters were analyzed only for the two groups (cAMG and IC) stimulated until stage 5. Effects of kindling on CTA were analyzed by a 2 (place of implantation: cAMG and IC) \times 3 (kindling stage: sham, intermediate kindling and full kindling) \times 9 (CTA sessions) ANOVA for repeated measures on the session factor. In case of significant effects, comparisons were done by Fisher post hoc test.

RESULTS

Kindling

No significant differences in the number of AD needed to reach stage 5 were found between cAMG and IC fully kindled animals (cAMG 8.8 ± 3.32 vs. IC 7.5 ± 1.53 ; $t_{(17)} = 0.36$). Significant effects were observed in the duration of the AD [group ($F_{(1, 18)} = 48.69$, $P < 0.0001$), number of AD ($F_{(9, 18)} = 22.79$, $P < 0.0001$) and interaction ($F_{(9, 18)} = 9.97$, $P < 0.0001$)]. As can be seen in Fig. 1, the AD duration in the cAMG group was significantly longer than that seen in the group stimulated in the IC.

Kindling and CTA

The ANOVA revealed a significant effect of kindling stage ($F_{(2, 51)} = 8.22$, $P = 0.01$), session ($F_{(8, 51)} = 147.70$, $P < 0.01$) and interaction ($F_{(16, 51)} = 11.57$, $P = 0.034$). The post hoc test showed significant differences between the sham group and animals with full kindling in the cAMG (AMG-kindling) during sessions 6, 7, 8 and 9 ($P < 0.01$). The animals kindling in the cAMG drank significantly less saccharin than animals with sham kindling, prolonging the extinction of CTA. Rats with intermediate kindling (stages

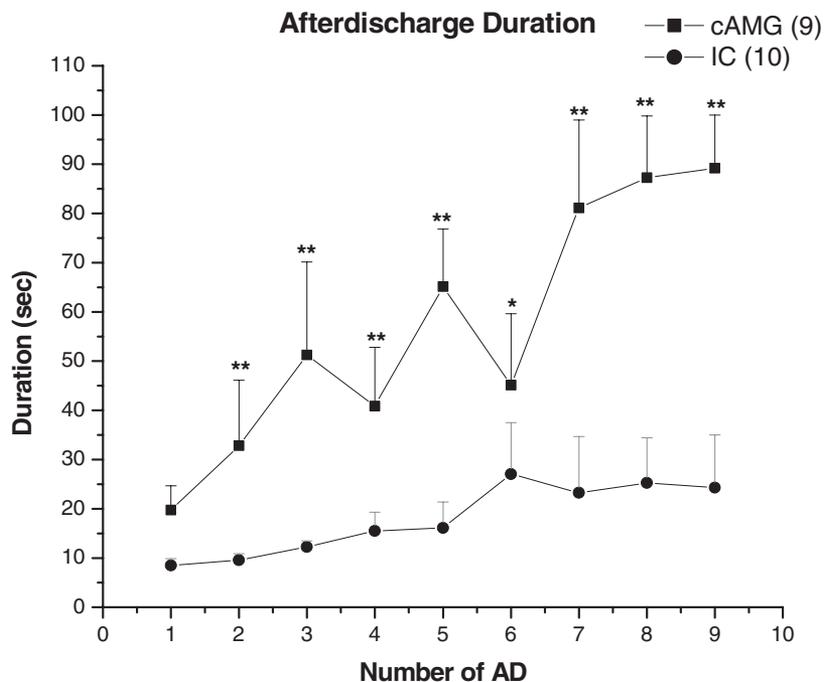


Fig. 1. AD duration in cAMG and IC groups. Data represent the mean \pm standard error. * Different from IC $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2–4) in the cAMG also drank less saccharin than sham-stimulated subjects in session 6 ($P < 0.01$); see Fig. 2. Full

and intermediate kindled animals in the IC drank significantly less saccharin than animals with sham kindling in IC

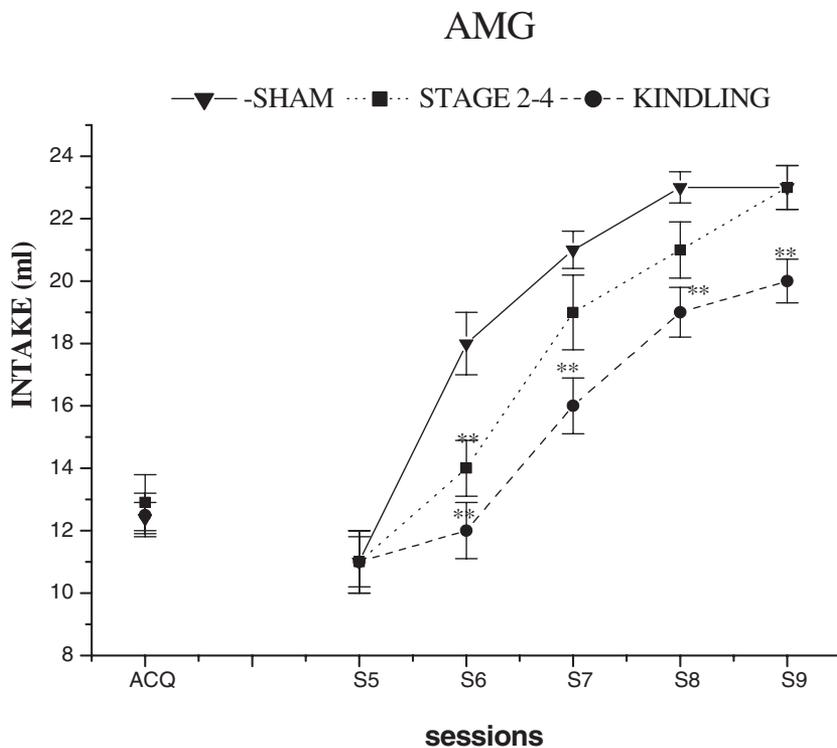


Fig. 2. Saccharin intake in the different groups with kindling in the cAMG. Animals were deprived of water for 24 h and given 10 min drinking session twice a day for 4 days. On session 1 (acquisition, morning of day 5) saccharin (0.1%) and LiCl were paired. After three more days (sessions 2, 3 and 4) of baseline consumption, water was replaced by saccharin (session 5) to test aversion and extinction (sessions 6–9). Sham ($n=8$), intermediate ($n=9$) and full kindling ($n=9$). * Different from the sham group $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

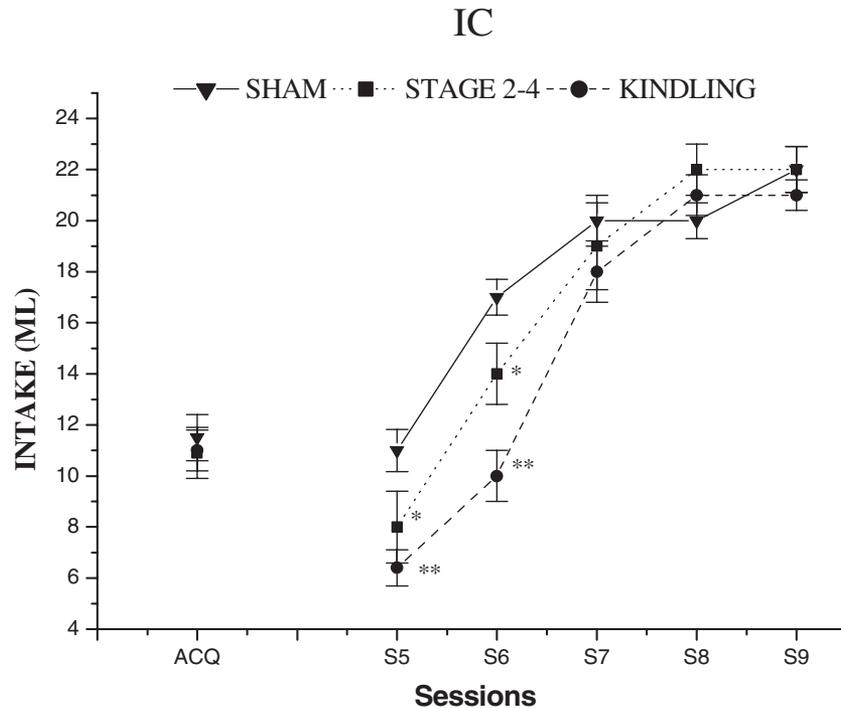


Fig. 3. Saccharin intake in different groups with kindling in IC. See legend of Fig. 2 for details. Sham ($n=8$), intermediate ($n=9$) and full kindling ($n=10$). * Different from the sham group $P<0.05$; ** $P<0.01$.

(IC-Sham) in sessions 5 and 6, see Fig. 3. Animals with IC-kindling drank significantly less saccharin in session 5 than AMG-kindling animals ($P<0.01$). There were not significant differences during acquisition day ($P>0.05$) between all groups, that is to say, all animals drank the same amount of saccharine before receiving the LiCl injection.

DISCUSSION

The results of the present study show that kindling stimulation enhances the aversion produced during conditioning. Partial and fully kindled animals in the cAMG or IC-kindling groups consumed less saccharin with respect to the sham-stimulated groups. It is also clear that the effects upon learning were stronger in animals that reached stage 5 than in the groups stimulated to produced intermediate kindling (stages 2–4). In the first days of measurement of the aversive strength, the IC-kindling consumed less saccharin than the sham and cAMG-kindling. These results agree with previous studies showing that the IC is important in the acquisition and storage of long term aversive motivated tasks such as CTA (Bermúdez-Rattoni and McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni and Yamamoto, 1998; Bahar et al., 2003; Gutiérrez et al., 2003). For example, it has been shown that blockade of NMDA and muscarinic receptors in the IC interrupt CTA (Naor and Cudai, 1996; Berman et al., 2000; Berman and Dudai, 2001). Berman and Dudai (2001) have described that when the CS in CTA is unfamiliar (when presented for the first time), formation of long term CTA memory depends on muscarinic and β -adrenergic receptors, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and protein synthesis in the IC. Extinction of CTA memory

(when the CS is already familiar and is presented for the second time) depends on protein synthesis and β -adrenergic receptors in the IC, but not on muscarinic receptors.

In the present study the aversive effects on saccharin consumption lasted longer in cAMG-kindling. Lamprecht and coworkers (1997) showed that the cAMG is essential for the formation of CTA. They observed that inhibition of protein synthesis and blockade of the expression of the transcription factor CREB in this nucleus blocked the consolidation of CTA memory. Bahar and coworkers (2003) found that local inhibition of protein synthesis or blockade of β -adrenergic receptors in the cAMG prevent acquisition but not extinction of CTA. A similar intervention, inhibition of protein synthesis or blockade of β -adrenergic receptors in the BLA prevents extinction but not acquisition. These authors conclude that cAMG is fundamental for acquisition and the BLA for extinction of CTA. Our data suggest that cAMG kindling strengthens the acquired CTA when the animals are tested several days after the last kindling stimulation. Further studies need to address the effects of this kind of stimulation in the BLA upon CTA. It is interesting to note that induction of long term potentiation in the Bla-IC projection previous to CTA training enhances the retention of the task. That is, the group stimulated in the BLA drank less saccharin during extinction trials than the control groups (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000). Moreover it has also been shown that microinfusion of BDNF in the IC before conditioning enhances the retention of CTA (Castillo et al., 2006).

The results of the present experiment clearly show that kindling stimulation increases the aversive effect of LiCl. These effects are not due to an effect of kindling per se on

saccharine consumption, for example reduced consumption of a novel flavor, because all groups consumed the same amount of saccharine on the acquisition day. Groups stimulated until intermediate kindling or full kindling required more sessions than the control group to return to baseline levels. In a previous study, animals with kindling in the BLA were stimulated after the presentation of a solution with a particular flavor. After several stimulations, the animals drank significantly less of the conditioned flavor. When a preference test was performed at the end of the experiment the rats consumed significantly less of the flavor paired with kindling stimulation suggesting that the animals were able to learn and remember the CS (Wig et al., 2002). Our results are at variance with previous studies showing that stimulation or kindling stimulation interferes with CTA. Different studies have shown that low intensity, subseizure threshold, brain stimulation can interfere with CTA. When this kind of stimulation was given during the period of drinking saccharin and the animals were tested two days after pairing saccharin with LiCl, the group stimulated in the AMG did not display aversion (LePiane and Phillips, 1978). Similar results were observed when this type of stimulation was given at different intervals after the injection of the US (in this case apomorphine). The groups stimulated in the AMG 1 min, 30 min or 3 h after the US showed an attenuation or absence of the development of taste aversion. The groups stimulated 12 h after the US or immediately after the drinking period and the controls displayed a clear CTA. The authors suggest that subseizure AMG stimulation produced a time dependent disruption in the development of taste aversion if the stimulation is administered after the US due to a disruptive effect upon the taste–illness association (Kesner et al., 1975). The disruptive effects of the subthreshold stimulation appear to be specific to the AMG, because stimulation of other brain regions like the caudate-putamen, substantia nigra pars compacta (LePiane and Phillips, 1978) or the medial forebrain bundle (Ralph and Balagura, 1974) did not interfere with conditioning. Electroconvulsive shocks applied at different intervals at the end of the saccharin-drinking period prevent the animals from acquiring CTA (Arthur, 1975).

Kindling stimulation also interferes with CTA. In a study by Mikulka and Freeman (1984) animals were stimulated until kindling was established. Then subjects were trained for CTA; the control group was not stimulated further, a second group was given a kindling stimulus 15 min after ingestion of saccharin and a third group was stimulated 15 min after LiCl injection. Groups 2 and 3 did not differ from each other but drank significantly more (i.e. had a weaker aversion) than the control group. This result indicates that kindling induced seizures occurring within the CS–US interval and after the US disrupted the establishment of taste aversion (Mikulka and Freeman, 1984). The unilateral or bilateral kindling stimulation of the AMG around the time of pairing between the CS and US disrupted the flavor aversion with bilateral stimulation producing the greater effects eliminating conditioning (Peele and Gilbert, 1992). These results clearly indicate that subseizure stimulation, kindling stimulation or an electroconvulsive shock applied between

the CS and the US or shortly after the US interferes with CTA. It has been suggested that the interval between the last seizure and the behavioral test is a key factor in determining if learning would be affected by kindling (Hannesson and Corcoran, 2000; Majak and Pitkanen, 2004). For example, a kindling stimulus interfered with water maze performance when the animals were stimulated during training. If the same animals were tested after a longer interval their performance was similar to the control groups (Cain et al., 1993; Leung and Shen, 2006). The present experiment was designed to observe the long term effects of kindling stimulation upon this learning task. We first established kindling and 19 days later the animals were trained for CTA, a time frame ideal to observe sprouting after kindling (Adams et al., 2002; Li et al., 2002). In this case conditioning was enhanced and the animals showed a strong and prolonged aversion. It is clear then, that the effects of kindling upon learning could be different depending upon if we evaluate the short term effects, where a deficit of the task might be observed, or whether we analyze the long term effects of kindling where a facilitation of behavior (Morgan et al., 1999; Portillo et al., 2003) including learning (present study) could be produced.

Behavioral evidence indicates that experimental extinction does not reflect unlearning of the original trace, but rather a relearning process, in which the new association of the CS with the absence (Rescorla, 1996) of the original reinforcer comes to control behavior. Following the same argument we cannot dissociate whether kindling is strengthening CTA (prolonging retention of the association originally learned) or whether kindling is blocking the extinction or the ability to learn new information. Only new studies could address this question. What is clear, however, is that kindling can indeed modify CTA.

Another question is what are the mechanisms by which kindling induces behavioral changes in CTA. Several mechanisms underlying kindling have been proposed including: long-term potentiation (McEarchen and Shaw, 1996; Adamec, 1999) neurogenesis (Scott et al., 1998, 2000), increase in dendritic spine density (Teskey et al., 2001), mossy fiber sprouting of the hippocampus and synaptogenesis (Elmer et al., 1996; Teskey et al., 2001; Li et al., 2002). These substrates of kindling reveal a phenomenon that exemplifies the remarkable capacity of the brain to change its basic structure and function, which is neuronal plasticity (Scharfman, 2002). We suggest that neuroplasticity in specific brain regions may be mediated specifically by kindling-induced long term neuronal modifications that produce changes in behavior.

Acknowledgments—This research was supported by CONACyT V40286 M and DGAPA IN204206. We thank Francisco Camacho, Leonor Casanova, Omar González, Ma. de Lourdes Lara, Martín García, Dorothy Pless and Pilar Galarza for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Adamec R, Young B (2000) Neuroplasticity in specific limbic system circuits may mediate specific kindling induced changes in animal

- affect-implications for understanding anxiety associated with epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 24:705–723.
- Adamec RE (1999) Evidence that limbic neural plasticity in the right hemisphere mediates partial kindling induced increases in anxiety-like behavior: effects of low frequency stimulation (quenching?) on long term potentiation of amygdala efferents and behavior following kindling. *Brain Res* 839:133–152.
- Adams B, Vaccarella L, Fahnestock M, Racine RJ (2002) The cholinergic system modulates kindling and kindling-induced mossy fiber sprouting. *Synapse* 44:132–138.
- Anisman H, McIntyre DC (2002) Conceptual, spatial, and cue learning in the Morris water maze in fast or slow kindling rats: attention deficit comorbidity. *J Neurosci* 22:7809–7817.
- Arthur JB (1975) Taste aversion learning is impaired by interpolated amygdaloid stimulation but not by posttraining amygdaloid stimulation. *Behav Biol* 13:369–376.
- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci* 17:1527–1530.
- Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2417–2419.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20:7017–7023.
- Bermúdez-Rattoni F, McGaugh JL (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res* 549:165–170.
- Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T (1998) Neuroanatomy of CTA: lesion studies. In: *Conditioned taste aversion. Memory of a special kind.* (Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T, eds), pp 28–44. New York: Oxford Science Publications.
- Cain DP, Hargreaves EL, Boon F, Dennison Z (1993) An examination of the relations between hippocampal long-term potentiation, kindling, afterdischarge, and place learning in the water maze. *Hippocampus* 3:153–163.
- Cammisuli S, Murphy MP, Ikeda-Douglas CJ, Balkissoon V, Holsinger RM, Head E, Michael M, Racine RJ, Milgram NW (1997) Effects of extended electrical kindling on exploratory behavior and spatial learning. *Behav Brain Res* 89:179–190.
- Castillo DV, Figueroa-Guzman Y, Escobar ML (2006) Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 1067:250–255.
- Elmer E, Kokaia M, Kokaia Z, Ferencz I, Lindvall O (1996) Delayed kindling development after rapidly recurring seizures: relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Res* 712:19–34.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 852:208–212.
- Gilbert TH, Hannesson DK, Corcoran ME (2000) Hippocampal kindled seizures impair spatial cognition in the Morris water maze. *Epilepsy Res* 38:115–125.
- Goddard GB, Douglas RM (1975) Does the engram of kindling model the engram of normal long term memory. *Can J Neurol Sci* 2:385–394.
- Goddard GB, McIntyre DC, Leech CK (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25:295–365.
- Gutiérrez R, Tellez LA, Bermúdez-Rattoni F (2003) Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* 17:1556–1562.
- Hannesson DK, Corcoran ME (2000) The mnemonic effects of kindling. *Neurosci Behav Rev* 24:725–751.
- Hannesson DK, Howland JG, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME (2005) Anterior perirhinal cortex kindling produces long-lasting effects on anxiety and object recognition memory. *Eur J Neurosci* 21:1081–1090.
- Hannesson DK, Mohapel P, Corcoran ME (2001) Dorsal hippocampal kindling selectively impairs spatial learning/short-term memory. *Hippocampus* 11:275–286.
- Kesner RP, Berman RF, Burton B, Hankins WG (1975) Effects of electrical stimulation of amygdala upon neophobia and taste aversion. *Behav Biol* 13:349–358.
- Lamprecht R, Hazvi S, Dudai Y (1997) cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long-but not short-term conditioned taste aversion memory. *J Neurosci* 17:8443–8450.
- LePiane FG, Phillips AG (1978) Differential effects of electrical stimulation of amygdala, caudate-putamen or substantia nigra pars compacta on taste aversion and passive avoidance in rats. *Physiol Behav* 21:979–985.
- Leung LS, Shen B (2006) Hippocampal CA1 kindling but not long-term potentiation disrupts spatial memory performance. *Learn Mem* 13:18–26.
- Li S, Reinprecht I, Fahnestock M, Racine RJ (2002) Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex and entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* 115:1221–1229.
- Majak K, Pitkanen A (2004) Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. *Epilepsy Behav* 5 (Suppl 1): S35–S44.
- McEarchen JC, Shaw C (1996) An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity pathology continuum model. *Brain Res Rev* 22:51–92.
- Mikulka PJ, Freeman FG (1984) The effect of amygdala-kindled seizures on acquisition of taste and odor aversions. *Physiol Behav* 32:967–972.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 20:99:11417–11422.
- Morgan HD, Watchus JA, Milgram NW, Fleming AS (1999) The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behav Brain Res* 99:61–73.
- Naor C, Dudai Y (1996) Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 79:61–67.
- Paredes R, Haller AE, Manero MC, Alvarado R, Agmo A (1990) Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain Res* 515:20–26.
- Paxinos G, Watson CH (1987) *The brain in stereotaxic coordinates.* New York: Academic Press.
- Peele DB, Gilbert ME (1992) Functional dissociation of acute and persistent cognitive deficits accompanying amygdala-kindled seizures. *Behav Brain Res* 48:65–76.
- Portillo W, Basañez E, Paredes RG (2003) Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Res* 96:10–14.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation: II motor seizure. *Electroencephalogr Neurophysiol* 32:281–294.
- Ralph TL, Balagura S (1974) Effect of intracranial electrical stimulation on the primary learned aversion to LiCl and the generalized aversion to NaCl. *J Comp Physiol Psychol* 86:664–669.
- Rescorla RA (1996) Preservation of pavlovian association through extinction. *J Exp Psychol* 49B:245–258.
- Scott BW, Wang S, Burnham WM, De Boni U, Wojtowicz JM (1998) Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett* 248:73–76.
- Scott BW, Wojtowicz JM, Burnham WM (2000) Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp Neurol* 165:231–236.

Scharfman HE (2002) Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist* 8:154–173.

Teskey CG, Hutchinson JE, Kolb B (2001) Cortical layer III pyramidal dendritic morphology normalized within 3 weeks after kindling and dissociated from kindling-induced potentiation. *Brain Res* 911:125–133.

Wig GS, Barnes SJ, Pinel JP (2002) Conditioning of a flavor aversion in rats by amygdala kindling. *Behav Neurosci* 116:347–350.

Yasoshima Y, Shimura T, Yamamoto T (1995) Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats. *Neuroreport* 6:2424–2428.

(Accepted 29 September 2006)
(Available online 29 November 2006)

Abstract

Kindling is associated with several behavioral and neuronal changes which occur in absence of neuronal damage. This differs from the status epilepticus model induced by kainic acid, since this model is characterized by the presence of neuronal damage. The first aim of the present study was to evaluate if kindling facilitates or blocks conditioning taste aversion (CTA), 28 days after the last stage 5 of kindling. The second aim was to study if there is a relation between the modifications in CTA provoked by kindling and expression levels of GAP-43 and synaptophysin (Syp). A third aim was to evaluate if the kainic acid model, interferes with CTA. For the first aim, we used male Wistar rats. They were stimulated until kindling was established. Twenty eight days after the last stage 5 seizures, the rats were trained for CTA. For the second aim, other group of kindled animals, were trained in CTA, 28 days after the last stage 5 seizure, and their brains processed for immunohistochemistry against GAP-43 and Syp. For the third aim, male Wistar rats were injected with kainic acid to induce status epilepticus. After kainic acid treatment the rats were trained for CTA. The results show that the kindled animals in insular cortex (IC) and central amygdala (cAMG), have a strong taste aversion. GAP-43 and Syp immunoreactivity, in cAMG and IC of kindled animals that were trained in CTA was lower than that of sham animals. Animals treated with kainic acid, showed deficits during CTA. These results suggest that kindling in IC and cAMG facilitate taste aversion learning.

El kindling está asociado a diversos cambios conductuales y neuronales, estos últimos ocurren en ausencia de daño neuronal, lo cual difiere del modelo que induce estatus epilepticus por ácido kaínico, ya que este último modelo se caracteriza por la presencia de daño neuronal. Un primer objetivo fue evaluar si el kindling favorece o interrumpe el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), 28 días después de la última fase 5 del kindling. Un segundo objetivo fue estudiar si hay una relación entre los cambios en el CAS provocados por el kindling y los cambios en el nivel de expresión de las proteínas GAP-43 y Sinaptofisina (Syp). Un tercer objetivo fue evaluar si el modelo del ácido kaínico, interfiere con el CAS. Para el primer objetivo, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, a las cuales se les estableció kindling completo. Posteriormente, 28 días después de la última crisis fase 5, las ratas fueron entrenadas en el CAS. Para el segundo objetivo, otro grupo de animales se les desarrollo kindling completo y 28 días después de la última crisis fase 5, las ratas fueron entrenadas en el CAS y luego los cerebros de estas ratas fueron procesados para la inmunohistoquímica contra GAP-43 y Syp. Para el tercer objetivo, ratas macho de la cepa Wistar fueron inyectadas con ácido kaínico para inducirles estatus epilepticus. Después del tratamiento con ácido kaínico fueron entrenadas en el CAS. Los resultados mostraron que los sujetos con kindling de la corteza insular (CI) y de la amígdala central (AMGc) tienen una fuerte aversión al sabor. La AMGc y CI, de los animales con kindling y entrenados en el CAS, mostraron una menor inmunoreactividad a GAP-43 y Syp con respecto a los sujetos falsamente estimulados. Los sujetos tratados con ácido kaínico, presentaron deficiencias en el aprendizaje aversivo. Nuestros datos sugieren que el kindling en CI y AMGc está facilitando el aprendizaje aversivo.