

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**PARTICIPACIÓN DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE
RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN EL
APRENDIZAJE AVERSIVO AL OLOR**

TESIS

que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

presenta

Jorge Tovar Díaz

Director de tesis: **Dr. Gabriel Roldán Roldán**

Comité tutorial: **Dra. María Luisa Fanjul de Moles, Dr. Roberto A. Prado Alcalá**

México, D.F., 2011

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Neurobiología Conductual, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina – UNAM, con apoyo del CONACYT (beca número 195310).



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.

Preciso es confesar que los grandes enigmas del Universo, citados por Dubois-Reymond, son actualmente inabordables. Debemos resignarnos al *ignoramus*, y aun al inexorable *ignorabimus* proclamado por el gran fisiólogo alemán. Para la resolución de estos formidables problemas (comienzo de la vida, naturaleza de la sustancia, origen del movimiento, aparición de la conciencia, etc.), parece indudable la insuficiencia radical del espíritu humano. Órgano de acción encaminado a fines prácticos, nuestro cerebro parece haber sido construido no para hallar las últimas razones de las cosas, sino para fijar sus causas próximas y determinar sus relaciones constantes. Y esto, que parece poco, es muchísimo, porque habiéndonos concedido el supremo poder de actuar sobre el mundo, suavizándolo y modificándolo en provecho de la vida, podemos pasarnos muy bien sin el conocimiento de la esencia de las cosas. No creemos demostrada, en buena filosofía, la absoluta imposibilidad de que el hombre se eleve algún día a la concepción del porqué de los fenómenos; pero dada la penuria analítica de nuestros sentidos, que sólo representa registros numéricos de movimientos, y no de todos, sino de unos pocos, para los cuales se hallan tonalizadas las fibras nerviosas; y supuesta la pobreza y limitación de nuestro entendimiento, cuya labor se reduce a combinar y relacionar de mil maneras dicha menguada gama de representaciones del mundo exterior, la Ciencia no tiene más recurso que fijar el orden de sucesión de los fenómenos y determinar las leyes empíricas y derivadas que los rigen. ¡Quién sabe si, a fuerza de siglos, cuando el hombre, superiormente adaptado al medio en que vegeta, haya perfeccionado sus registros óptico y acústico, y el cerebro permita combinaciones ideales más complejas, podrá la Ciencia desentrañar las leyes más generales de la materia, dentro de las cuales, y como caso particular de las mismas, se encerrará quizá el extraordinario fenómeno de la vida y del pensamiento!

Los tónicos de la voluntad: reglas y consejos sobre la investigación científica
Santiago Ramón y Cajal (1852 – 1934)

Dedicatoria

A mis padres, por ocupar sus fuerzas, por perturbar sus vidas, por interrumpir a todas horas sus ocupaciones más serias, por cometer tonterías, por arrebatarse, por angustiarse, por pasar miserias, todo para darme la vida y con ella la oportunidad de ocupar mis fuerzas, de perturbar mi vida, de interrumpir mis ocupaciones más serias, de cometer tonterías, de arrebatarme, de angustiarme, de pasar miserias; la oportunidad de encontrar también, como ellos, el amor.

A Angélica Lorena, por darme las penas y alegrías más intensas. Por abrir mi corazón de par en par al amor ciego, a la pasión y a la locura. Porque con ella viví la paradoja de ser uno mismo, sin dejar de ser dos, y entendí cuan frágil es la vida sin amor.

Agradecimientos

A mi comité tutorial. Dra. María Luisa Fanjul, Dr. Roberto Prado y Dr. Gabriel Roldán. Porque gracias a sus enseñanzas y consejos, pude resolver los problemas más difíciles que me planteó el doctorado. Especialmente a Gabriel, de quien aprendí más de lo que me enseñó.

A los sinodales que revisaron esta tesis. Dra. Robyn Elizabeth Hudson, Dr. Stefan Mihailescu Lucian, Dr. Francisco Pellicer Graham, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y Dr. Gabriel Roldán Roldán. Agradezco sus valiosos comentarios, pues enriquecieron enormemente el resultado final.

A todos aquellos que facilitaron mi tránsito por el arduo camino de la investigación. Especialmente a mis maestros en el laboratorio, quienes dentro de sus enseñanzas incluyeron la más importante, siempre brindar amistad: Angélica Ivania Quiroz Zaldívar, Héctor González Sánchez, Oscar Acosta Rincón, Arturo Roldán Roldán, José Antonio Salas, Hilda Alejandra Sánchez de Jesús, José Felipe Esquivelzeta Rabell. A ustedes debo no solo mi superación intelectual, sino también humana.

A mis amigos del posgrado. Por encontrar el tiempo, entre tanta presión, experimentos, lecturas, cursos, congresos, exámenes, etc., para sonreír y compartir nuestro amor por la investigación científica. Con especial cariño a Rossana Zepeda Hernández y a Leonor Mendoza Vargas, quienes supieron comprenderme y estuvieron a mi lado siempre que necesité su apoyo emocional.

A mis viejos amigos. Por aceptar y perdonar mis largas ausencias, dedicadas al trabajo de laboratorio. Ustedes saben que su cariño, aunque a distancia, ha sido mi cayado en momentos de duda y frustración. Especialmente a Joel Flores Bonilla, quien me permitió andar, paralelamente al doctorado, por su Camino a Ixtlán, plagado de música, plática y literatura, hacia un proyecto de conciencia y compromiso social.

A mi maestro, mis compañeros y amigos del equipo de natación. Gracias por permitirme ser parte del grupo y compartir más que el espacio de entrenamiento. Han sido un ejemplo de perseverancia, ánimo y espíritu deportivo. Gracias por mantenerme “a flote” todo el tiempo que duró mi doctorado, disipando mi cansancio intelectual con su derroche de energía.

A mis hermanos de sangre. Porque gracias a ellos jamás me he sentido solo. Porque me han apoyado incansable e incondicionalmente. Porque a pesar de conocer todos mis defectos y haberme sufrido prácticamente toda su vida, me siguen queriendo más de lo que deberían.

A Maya. Es tanto lo que le debo, que me avergüenza decirlo. Ella sabe por qué.

Finalmente, a quienes siempre tuvieron la razón en el laboratorio: las ratas. Descansen en el paraíso de los inocentes.

Índice	- página -
Resumen	- 6 -
Abstract	- 7 -
Prefacio	- 8 -
Primera parte:	
Participación de los receptores muscarínicos del bulbo olfativo en el aprendizaje aversivo al olor	
Introducción	- 9 -
Justificación del proyecto	- 31 -
Hipótesis general	- 31 -
Objetivo general	- 31 -
Hipótesis específicas	- 31 -
Metodología	- 32 -
Resultados	- 35 -
Discusión	- 44 -
Conclusiones de la primera parte	- 54 -
Segunda parte:	
Evaluación de memorias de corto y de largo plazos en el aprendizaje aversivo al olor: asociación de estímulos con intervalos interestímulos largos y facilitación de la consolidación por evocación de la memoria de corto plazo	
Justificación de la segunda parte	- 57 -
Antecedentes	- 58 -
Metodología	- 59 -
Resultados	- 61 -
Discusión	- 68 -
Conclusiones de la segunda parte	- 79 -
Conclusiones generales	- 80 -
Perspectivas	- 89 -
Bibliografía	- 90 -
Anexo	- 100 -

Resumen

El ser humano refina sus preferencias alimenticias al asociar los sabores de alimentos específicos con sus consecuencias postingestivas. Si la consecuencia de la ingestión es benéfica o perjudicial, se producen preferencias o aversiones, respectivamente, condicionadas por el sabor del alimento. La evaluación sensorial de los alimentos depende en gran parte de la percepción olfativa, lo cual se evidencia en las marcadas distorsiones en la percepción de los sabores que muestran pacientes anósmicos. Estas conductas también las presentan mamíferos inferiores como la rata. El aprendizaje aversivo al olor consiste en el rechazo de un alimento, previamente asociado con envenenamiento, cuyo reconocimiento depende de su olor específico. Es bien sabido que la neurotransmisión colinérgica es esencial para que se lleven a cabo los procesos de aprendizaje y memoria en general, y que la degeneración de los núcleos colinérgicos del cerebro basal anterior se correlaciona con el grado de deterioro cognitivo en patologías como la enfermedad de Alzheimer, en la cual, además, la pérdida de las capacidades olfativas antecede a la aparición clínica de los compromisos cognitivos.

En la primera parte de esta investigación analizamos la participación de los receptores muscarínicos del bulbo olfativo en el aprendizaje aversivo al olor, a través de la administración intracerebral de fármacos antagonistas de los subtipos M1 y M2 en ratas. Encontramos que los receptores muscarínicos M1 del bulbo olfativo son necesarios para la consolidación de la memoria aversiva al olor, pero su activación deber ocurrir en la fase de adquisición del aprendizaje para generar los mecanismos que darán lugar a la consolidación. Además, encontramos que el bloqueo de los receptores M2 puede mejorar el aprendizaje en condiciones subóptimas, al incrementar la liberación de acetilcolina.

En la segunda parte, que se originó a partir de la necesidad de evaluar la memoria de corto plazo en nuestro modelo de aprendizaje, observamos varios hechos contradictorios con la literatura actual sobre el tema. Primero, encontramos que la asociación de estímulos puede ocurrir con intervalos hasta de 60 min, periodo tres veces más largo de lo aceptado, y generar una memoria de corto plazo. Segundo, encontramos que la evocación de la memoria de corto plazo facilita la consolidación de la memoria de largo plazo, de tal manera que, a diferencia de un grupo que solo se prueba en memoria de largo plazo y no muestra aversión, un grupo probado primero en memoria de corto plazo sí muestra aversión en la prueba de largo plazo. Tercero, el efecto de la evocación de la memoria de corto plazo sobre la persistencia de la memoria a largo plazo, también ocurre bajo la administración de escopolamina o pirenzepina, fármacos con efectos amnésicos anterógrados bien conocidos. Por alguna razón no explícita, la evaluación de la memoria de corto plazo en el aprendizaje aversivo al olor fue obviada hasta el presente, y esta omisión llevó a conclusiones erróneas, como que el intervalo interestímulos no superaba los 15 min, o que la escopolamina afectaba la asociación de estímulos, según se había observado en las pruebas de memoria de largo plazo. Nuestros resultados indican que la consolidación es la etapa afectada, si bien depende de las condiciones iniciales del aprendizaje.

Abstract

Animals such as rats and humans refine their food preferences by associating the flavors of specific foods with its postingestive consequences. If the consequence of eating is beneficial a preference is developed, if harmful an aversion. The sensory evaluation of food depends in large part on the olfactory perception; this is evident in anosmic patients which show a marked distortion in the perception of flavors. Odor aversion learning is the rejection of a food, previously associated with poisoning, which recognition depends on its specific odor. It is widely recognized that the cholinergic neurotransmission is involved in the processes of learning and memory in general. In particular, the degeneration of the basal forebrain cholinergic nuclei is correlated with the degree of cognitive impairment in Alzheimer's disease, in which also the loss of olfactory capabilities precedes the clinical appearance of cognitive compromise.

In the first part of this research we look at the participation of the muscarinic receptors of the olfactory bulb in odor aversion learning, through the intracerebral administration of antagonist drugs in rats. We find that the M1 muscarinic receptors of the olfactory bulb are necessary for the consolidation of the aversive memory to the odor, but activation must occur at the stage of acquisition of the learning to generate the mechanisms that will lead to the consolidation. In addition, we find that the blockade of the M2 receptors can improve learning in suboptimal conditions, by increasing the release of acetylcholine.

In the second part of this research, which originated from the need to assess the short-term memory in our learning model, we observed several contradictory facts with the current literature on the subject. First, we find that the association of stimuli occurs with intervals up to 60 min, three times longer than the previously accepted, and generate a short-term memory. Second, we find that short-term memory retrieval facilitates consolidation of long-term odor aversion memory. That is, as opposed to a group only tested in long-term memory that does not show aversion, a group first tested in short-term memory shows aversion in the long-term test. Third, the effect of short-term memory retrieval on the persistence of long-term memory also occurs under the administration of scopolamine or pirenzepine, drugs with well-known anterograde amnesic effects. For some unexplained reason, the assessment of the short-term memory in the odor aversion learning was omitted till present, and this omission led to erroneous conclusions, such as the failure of stimuli association with inter-stimuli intervals exceeding 15 min, or that scopolamine affected the stimuli association, as it has been evidenced using long-term memory tests. Our results indicate that the consolidation is the affected stage, although it depends on the initial conditions of learning.

Prefacio

La intención original de este trabajo fue evaluar la participación de los receptores muscarínicos de acetilcolina (RsMACH) del bulbo olfativo principal (BO) en el aprendizaje aversivo al olor (AAO), a través de la administración intracerebral de antagonistas específicos en ratas de laboratorio. El tema fue elegido debido a la importancia de la transmisión colinérgica para los procesos de aprendizaje y memoria en general. Sin embargo, resultan particularmente relevantes en aquellas enfermedades neurodegenerativas en las que el grado de deterioro cognitivo se correlaciona con el proceso degenerativo de los sistemas colinérgicos del cerebro basal anterior, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer. El AAO nos pareció un modelo interesante pues se sabe que el deterioro de las capacidades olfativas antecede a la aparición clínica de los compromisos cognitivos. Los resultados obtenidos son descritos en la primera parte de esta tesis. Al realizar una serie de grupos control, obtuvimos resultados inesperados que modificaron inevitablemente el curso de la investigación original. Debido a su relevancia para interpretar los datos previos, tanto de mi propia investigación como de la literatura previa, decidimos publicar estos resultados en un artículo independiente que sentara las bases para la posterior publicación del resto de nuestros hallazgos. Específicamente, observamos que la memoria de corto plazo (MCP) se encuentra intacta a pesar del uso de diversas manipulaciones que deterioran el aprendizaje (aumento del intervalo interestímulos, reducción de la intensidad del estímulo incondicionado, administración intracerebral de escopolamina y pirenzepina) y que su evocación facilita la consolidación de la memoria, permitiéndole establecerse como una memoria de largo plazo (MLP). Por razones no explícitas, la evaluación de la MCP en el AAO fue obviada hasta el presente, y esta omisión llevó a la conclusión errónea de que los efectos amnésicos de diversas manipulaciones, incluidos aquellos provocados por fármacos como la escopolamina, se deben a la incapacidad de asociar el estímulo condicionado con el incondicionado, según se había observado en las pruebas de MLP. Con los resultados de nuestro análisis de la MCP, nosotros proponemos, entre otras cosas, que los efectos amnésicos de la escopolamina ocurren primordialmente en la etapa de consolidación de la memoria y no en la de asociación de estímulos, como actualmente se acepta. Este análisis queda comprendido en la segunda parte de la tesis.

PRIMERA PARTE

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS DEL BULBO OLFATIVO EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO AL OLOR

Introducción

Aprendizaje y memoria: conceptos básicos

Desde el momento en que nacemos, e incluso antes, los estímulos sensoriales modifican nuestro sistema nervioso e influyen nuestro comportamiento. Dichas modificaciones se suceden durante todo el curso de nuestra vida y nos permiten aprender, recordar y responder apropiadamente ante situaciones que hemos experimentado anteriormente (Squire, 1987; Bear, 2001; Jerusalinsky y cols, 1997). Es fácil reconocer que podemos adquirir conocimientos y recordar experiencias con características muy variadas, por lo cual se han desarrollado sistemas de clasificación del aprendizaje y la memoria basados en diferentes criterios (Squire, 1987; Bermúdez Rattoni y Prado Alcalá, 2001).

Las clasificaciones de aprendizaje más utilizadas son: a) impronta; b) aprendizaje no asociativo (habitación y sensibilización); y c) aprendizaje asociativo (condicionamiento clásico, también llamado pavloviano en honor a Iván Pavlov – el famoso investigador que lo describió por primera vez – y condicionamiento operante, también llamado instrumental – utilizado y descrito inicialmente por el psicólogo Edward Lee Thorndike).

En cuanto a la clasificación de la memoria, según su contenido, se identifican dos tipos en general: a) explícita (también llamada declarativa), concerniente al conocimiento y recuerdo consciente, por ejemplo de eventos ocurridos. Este tipo de memorias dependen de la integridad del lóbulo temporal, hipocampo y diencéfalo; y b) implícita (no declarativa o de procedimiento), concerniente al conocimiento y recuerdo inconsciente. Este tipo de memorias se clasifican en cuatro tipos: habilidades y hábitos, priming, aprendizajes asociativos y aprendizajes no asociativos. No dependen del lóbulo temporal, sino de estructuras como el cuerpo estriado, la corteza motora, la amígdala, el cerebelo y vías reflejas (Squire y cols, 1993; Bailey y cols, 1996; Albright y cols, 2000; Bermúdez Rattoni y Prado Alcalá, 2001; Barco y cols, 2006).

Según su permanencia temporal, la memoria se clasifica en: a) memoria de corto plazo (MCP), cuya duración varía de unos pocos segundos a unas cuantas horas, y b) memoria de largo plazo (MLP), que puede durar varios días o incluso el resto de la vida del sujeto. Desde el punto de vista de la neurobiología celular se considera suficiente el transcurso de 24 h (Bermúdez Rattóni y Prado Alcalá, 2001; Dudai, 2002). Gracias al proceso de consolidación, que consiste en la activación genética para incrementar la síntesis de proteínas y en el desarrollo de nuevas conexiones sinápticas, la MCP se transforma en MLP (Sutherland y Lehmann, 2011; Bailey y cols, 1996).

Otra forma de clasificación corresponde al sistema sensorial involucrado. De esta manera, tanto en libros como en artículos científicos encontramos los términos: memoria visual, memoria auditiva, memoria gustativa, memoria olfativa, etc.

Algunas definiciones en torno a los procesos de aprendizaje y memoria merecen una breve descripción.

Aprendizaje

Es el proceso de adquisición de información, ya sea del medio interno o externo y su codificación en el sistema nervioso (Bear, 2001; Squire, 1987; Kandel, 2001; Ambroggi y cols, 1999; Bouton y Moody, 2004). Como ya mencionamos, existen varios tipos de aprendizaje. Por corresponder al modelo utilizado en nuestra investigación, describiré solamente al aprendizaje asociativo. En el aprendizaje asociativo el sujeto relaciona dos estímulos dependiendo de su contigüidad temporal. Se conocen dos tipos generales: el condicionamiento operante y el condicionamiento clásico. En el operante, una conducta inicialmente espontánea del sujeto es seguida de una consecuencia (a nivel de laboratorio provocada por el experimentador) que incrementa o disminuye la probabilidad de repetición de la conducta por parte del sujeto. Existen variantes del modelo general operante, sin embargo su descripción escapa a los objetivos de este trabajo (para una descripción más detallada ver Bermúdez Rattóni y Prado Alcalá, 2001 o Pearce, 1998). En el condicionamiento clásico un estímulo irrelevante para el sujeto es seguido de un estímulo intrínsecamente importante que ocasiona cambios fisiológicos y conductuales por sí mismo. Como consecuencia, la posterior presentación del estímulo irrelevante desencadena la conducta que originalmente solo el segundo estímulo ocasionaba (Bermúdez Rattóni y Prado Alcalá, 2001;

Schreurs y Alkon, 2001; Pearce, 1998). En nuestro modelo, el proceso asociativo sigue la secuencia del condicionamiento clásico. Después de la ingestión de un alimento o bebida con un olor característico se provoca experimentalmente un malestar visceral, de tal manera que el sujeto asocia el olor del alimento con el malestar visceral, y en posteriores ocasiones el sujeto evitará la ingestión. Al estímulo inicial se le llama estímulo condicionado (en este caso el olor), al segundo se le llama estímulo incondicionado (en este caso el malestar) y a la respuesta que inicialmente generó el segundo estímulo y que ahora se desencadena por el primero se le llama respuesta condicionada (el malestar, inferido por el rechazo a la ingestión).

Memoria

Se utilizan como sinónimos los términos *trazo*, *huella o engrama*. Se refiere a los cambios físicos y funcionales (plasticidad) del sistema nervioso que codifican lo aprendido (Squire, 1987; Wolf, 1998; Bear, 2001). Como ya mencionamos, la memoria puede permanecer unas pocas horas (MCP), o días, meses, años, e incluso el resto de la vida (MLP) (Dudai, 2002; Bermúdez Rattoni y Prado Alcalá, 2001; Wolf, 1998; Squire, 1986).

Evocación

Involucra la reactivación de la memoria que yace latente (Cammarota y cols, 2004). Depende de la correspondencia entre las condiciones presentes durante el aprendizaje y las condiciones presentes durante la prueba de evocación. Para el caso del aprendizaje asociativo, la presencia del estímulo condicionado activa la representación del estímulo incondicionado, generando la respuesta condicionada (Bouton y Moody, 2004; Cammarota y cols, 2004).

Ejecución

Es la manifestación conductual de los cambios en el sistema nervioso generados por el aprendizaje (Bouton y Moody, 2004). En el ámbito de la investigación, se usa como indicador para medir el aprendizaje, así como la presencia de la memoria. Debemos tener en cuenta que cuando evaluamos experimentalmente el aprendizaje de un sujeto, evaluamos su ejecución, y lo que hace puede no corresponder exactamente a lo que “sabe” (Bouton y Moody, 2004). Debe quedar clara la diferencia entre la memoria – aquellos cambios físicos que hayan ocurrido en el cerebro como resultado del aprendizaje – y la ejecución – la manifestación de tales cambios en la

conducta del sujeto (Bouton y Moody, 2004). En nuestro diseño experimental, nosotros evaluamos solamente los cambios conductuales como indicadores de los cambios plásticos generados por el aprendizaje.

Temporalidad

En general es aceptado que los procesos de formación de memoria siguen una secuencia lineal (Sutherland y Lehmann, 2011) (ver figura 1):

1. Adquisición y codificación de la información. Corresponde a la transducción sensorial de los estímulos y su codificación en una MCP en el sistema nervioso. Se ha propuesto que para que un estímulo percibido logre generar MCP se requiere la intervención adecuada de los sistemas de atención (Wolf, 1998; Salamon, 2002; Dux y Marois, 2009).
2. Consolidación y almacenamiento de la MLP. Corresponde a una serie de eventos, a nivel celular y de circuitos neuronales, que estabilizan el engrama de la información adquirida, cuya duración varía, de unas cuantas horas a unos pocos días, dependiendo del tipo de aprendizaje. Algunos autores la refieren como “elaboración” de la información (Bailey, 1996; Salamon, 2002; Nader y cols, 2000; Sutherland y Lehmann, 2011).
3. Evocación de la memoria. Corresponde a la reactivación de la memoria, según sea requerida para guiar el comportamiento futuro (Wolf, 1998; Ambrogi y cols, 1999; Salamon, 2002; Cammarota y cols, 2004).

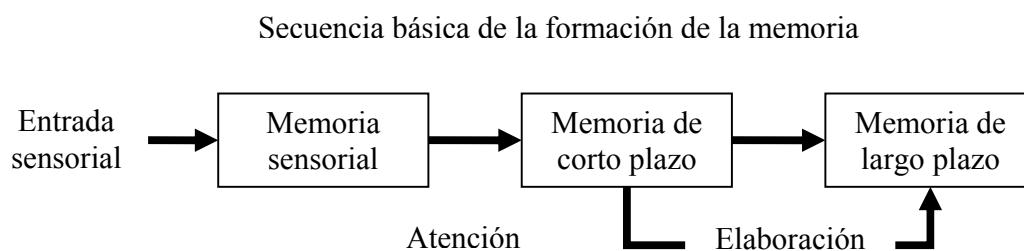


Figura 1. Modelo de formación de memorias de Atkinson y Shiffrin. Tomado de Salamon, 2002.

El procesamiento sensorial es actualizado cada 150 – 700 milisegundos, y debido a ello casi toda codificación sensorial se pierde en fracciones de segundo. Esta memoria sensorial es la más inmediata posterior al estímulo (Wolf, 1998; Kosower, 1972). Una vez que la información entra

al sistema nervioso por medio de los sentidos (auditivo, visual, etc.) es retenida ahí hasta que por medio de los procesos de atención pasan al almacén de MCP (Salamon, 2002). Solo aquellos estímulos que inducen mayor atención pueden pasar a la codificación de MCP (Wolf, 1998). La MCP puede durar desde segundos hasta unas cuantas horas. Para el caso de memorias de tipo declarativo, se menciona un rango de duración de 4 – 6 h contadas a partir del momento de la adquisición de la información (Cammarota y cols, 2004). En un tipo de aprendizaje asociativo conocido como aprendizaje de aversión gustativa, Houpt y Berlin (1999) describieron que la MCP, definida por su independencia de síntesis de proteínas, dura hasta 6 h, con un tiempo de transición a MLP correspondiente a la fase de consolidación de las 4.5 a las 6 h posteriores al condicionamiento. Una vez que la MCP llega a la fase de consolidación, se convierte en MLP, que puede durar días, meses, años, e incluso el resto de la vida (Squire, 1986; Bailey y cols, 1996; Wolf, 1998; Ambroggi y cols, 1999; Albright y cols, 2000; Bear, 2001; Bermúdez Rattoni y Prado Alcalá, 2001). Para diferentes aprendizajes varía el tiempo en que la información pasa de MCP a MLP (Wolf, 1998).

El término consolidación se ha utilizado para referirse a dos fenómenos: el primero se refiere a la cascada de eventos moleculares que modifican la comunicación a nivel sináptico, y dura unas cuantas horas post entrenamiento, conocido como consolidación molecular; el segundo se refiere a la transferencia de información de una región (el hipocampo) a otra (la neocorteza), que constituirá el almacén permanente de la MLP (Litvin y Anokhin, 2000; Nader y cols, 2000). Este concepto también recibe el nombre de teoría de transferencia (Nader y cols, 2000). El tiempo que dura la transferencia puede variar. Se han encontrado evidencias que sugieren que ciertas memorias se transfieren durante dos semanas en roedores, doce semanas en monos y varios años en humanos (Sutherland y Lehmann, 2011; Litvin y Anokin, 2000).

Sustrato anatómico

De acuerdo a la teoría del *proceduralismo*, desarrollada alrededor de los años 1970s por Craik y Lockhart y luego más detallada por Kolers y Roediger en 1984, el almacenaje de la memoria ocurre en las mismas unidades neurales que procesan la información al momento de la adquisición (Crowder, 1993). Esta idea fue originalmente propuesta por Donald Hebb en 1949 y se conoció como *mecanismo de trazo dual*. Hebb propuso que un primer mecanismo de almacenamiento de memoria era la actividad continua o reverberación de las células y ensambles

celulares reclutados en la percepción (correspondiente con el concepto de MCP actual); el segundo mecanismo actuaría, si la actividad reverberante continuaba lo suficiente, generando cambios estructurales en los ensambles y consecuentemente el almacenamiento de la memoria indefinidamente (correspondiente con el concepto actual de consolidación molecular de MLP) (Crowder, 1993).

Posteriormente Larry Squire (1986) sugirió que lo anterior era cierto solo parcialmente. Aceptó que cada característica de un evento es representada en sistemas cerebrales particulares, pero que el evento completo es representado por varios sistemas. Para él, la MCP es una capacidad intrínseca de cada sistema cortical de procesamiento. Squire sostiene que el almacenaje temporal de la información puede ocurrir en cada área cerebral en donde los cambios pueden consolidarse y generar MLP. Albright y cols (2000) concuerdan con la idea de Squire, agregando que las estructuras del lóbulo temporal medio, principalmente hipocampo, dirigen la reorganización y estabilización gradual de las representaciones corticales, quizás vinculando las regiones corticales que separadamente almacenan información para dar coherencia a una representación completa. Después de que cierto tiempo hubiera pasado, el hipocampo ya no sería requerido ni para el almacén ni para la evocación de la memoria declarativa de largo plazo. En este momento la MLP sería totalmente dependiente de la neocorteza. Como vimos en la parte final del punto de temporalidad, el término consolidación se usa para referir dos fenómenos: el de la cascada de eventos moleculares que modifican la comunicación a nivel sináptico y el de la transferencia de la información de una región a otra. Así que desde este punto de vista, el almacén de la información ocurre en varios sitios del sistema nervioso y se corresponde con el punto de vista de Squire. Actualmente es ampliamente aceptada esta teoría que afirma que la memoria explícita involucra a la neocorteza, el lóbulo medio temporal (hipocampo, corteza entorinal, peririnal y parahipocampal) y tálamo medial (núcleos anterior, mediodorsal) aunque algunas partes del sistema límbico pueden participar (Jerusalinsky y cols, 1997; Albright y cols, 2000).

Por su parte, las memorias implícitas dependen más, aparentemente, de la integridad de los núcleos caudado y putamen, de la corteza motora y el cerebelo (Squire y cols, 1993; Bermúdez Rattóni y Prado Alcalá, 2001) y se acepta que todos los sistemas neurales son capaces de almacenar algún tipo de memoria implícita (en las mismas vías sensoriales, motoras y de asociación usadas en el aprendizaje) (Bailey y cols, 1996). Por ejemplo, varios tipos de

aprendizaje motor involucran al cerebelo; aprendizaje de miedo a la amígdala; habituación y sensibilización a las vías sensoriales primarias (Albright y cols, 2000).

Mecanismos celulares y moleculares de la formación de la memoria

Los eventos moleculares que generan MCP típicamente se han descrito como modificaciones post-traduccionales transitorias o no estabilizadas de moléculas preexistentes, principalmente proteínas, que modifican la eficacia de la comunicación sináptica (Morgado Bernal, 2011). El mecanismo más estudiado es el de fosforilación de receptores en la postsinapsis (Bear, 2001; Bailey y cols, 1996). En la formación de MCP encontramos un incremento de la comunicación sináptica debido al aumento de la liberación de neurotransmisor por la neurona presináptica y mayor excitabilidad de la neurona postsináptica (Bailey y cols, 1996).

Algunos de los eventos identificados en la formación de la MLP incluyen activación de programas celulares para la expresión de genes y el subsecuente incremento en la síntesis de proteínas necesarias para los cambios estructurales de las neuronas involucradas:

La cascada de eventos, *grosso modo*, es la siguiente:

1. activación de receptores sinápticos, especialmente de tipo NMDA para glutamato,
2. activación de sistemas de segundos mensajeros, especialmente Ca^{++} y monofosfato de adenosina cíclico (AMPC),
3. activación de enzimas, especialmente cinasas A y C, que fosforilan proteínas con función de factores de transcripción como CREB,
4. CREB a su vez dispara la expresión de genes tempranos como c-fos,
5. c-fos a su vez codifica para proteínas efectoras, mientras que otros genes de expresión temprana codifican más factores de transcripción como las proteínas c-Fos y c-Jun,
6. c-Fos y c-Jun disparan la expresión de genes tardíos que codifican proteínas estructurales y otras moléculas requeridas para modificar la sinapsis.

Como vemos, estos eventos comienzan en la sinapsis, llegan al núcleo de la célula postsináptica y luego regresan a modificar la sinapsis (Bailey y cols, 1996; Litvin y Anokhin, 2000; Barco y cols, 2006).

El establecimiento de la MLP genera nuevas conexiones sinápticas entre las neuronas sensitivas y sus vecinas, “brotes dendríticos”, y también fortalecimiento sináptico evidenciado por cambios

electrofisiológicos duraderos que pueden afectarse por la neurotransmisión glutamatérgica, colinérgica, GABAaérgica, dopaminérgica, diferentes segundos mensajeros y cinasas (Jerusalinsky y cols, 1997). En conjunto, estos eventos corresponden a la consolidación molecular de la memoria.

Aprendizaje alimenticio

Es evidente el hecho de que todos los organismos requerimos del consumo de alimentos para nuestra economía fisiológica. En condiciones naturales, tenemos acceso a diversos alimentos, cuya ingesta puede beneficiarnos o perjudicarnos. Así, para muchas especies la selección de sus alimentos es de gran importancia.

La selección de alimentos está determinada por varios factores: de tipo ecológico (p.ej. la disponibilidad de los alimentos y el costo energético de obtenerlos); predisposiciones innatas (p.ej. en especies como la rata y el humano hay preferencia por lo dulce y aversión por lo amargo, así como una tendencia general de rechazo por alimentos desconocidos [neofobia]); el estado interno del animal (p.ej. crecimiento, gestación, enfermedad, etc., que a su vez determinan variables como la temperatura corporal, niveles hormonales, reservas de lípidos y proteínas); y la experiencia, es decir, **el aprendizaje** (Sclafani, 1995; Kyriazakis y cols, 1999). Kyriazakis y cols (1999) proponen un modelo que relaciona el aprendizaje con el estado interno del animal y el consecuente comportamiento alimenticio (figura 2).

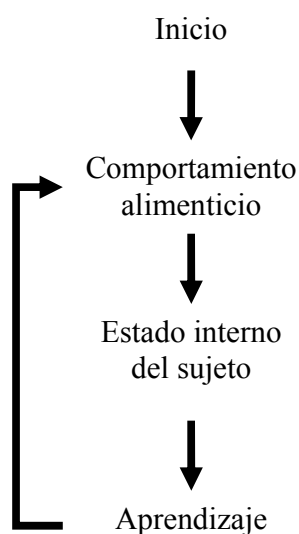


Figura 2. Modelo propuesto por Kyriazakis y cols (1999) relacionando el aprendizaje y el estado interno del animal con su conducta alimenticia. La secuencia propuesta se repetiría tantas veces como fuera requerido en la vida del animal.

El aprendizaje parece ser el mecanismo que permite mayor adaptabilidad ante los cambios temporales y espaciales del ambiente alimenticio (Kyriazakis y cols, 1999); ocurre al asociarse las características organolépticas del alimento (gusto, olor, textura, color) con sus características nutricionales (detectadas posteriormente a su ingestión). Dependiendo de la especie, las características organolépticas pueden ser más o menos efectivas que otras para el condicionamiento. En los mamíferos es más importante el sabor (combinación de olor y gusto) y en las aves el color (Kyriazakis y cols, 1999; Forbes, 2001).

Animales como la rata y el ser humano refinan sus preferencias al asociar los sabores de alimentos específicos con las consecuencias postingestivas (Sclafani, 1995). Si la consecuencia de la ingestión es benéfica (p.ej. saciedad, aporte nutricional) o perjudicial (p.ej. intoxicación, malestar visceral) se producen preferencias o aversiones, respectivamente, condicionadas por el sabor (Sclafani, 1995; Lucas y Sclafani, 1995; Kyriazakis y cols, 1999; Forbes, 2001).

Si bien existen algunas predisposiciones innatas para ciertos sabores, éstas parecen ser pocas y relativamente débiles: en neonatos de rata y humano se ha visto aceptación por lo dulce y lo moderadamente salado; rechazo hacia lo amargo y lo ácido, así como una tendencia general de rechazo hacia sabores desconocidos (neofobia) (Myers y Sclafani, 2006); por otro lado, sujetos adultos demuestran un amplio rango de preferencias y aversiones por una gran variedad de alimentos y sabores, atribuible a los efectos del aprendizaje (Myers y Sclafani, 2006). En ratas es posible convertir un sabor “naturalmente” aversivo (ácido cítrico) en preferido, condicionándolo con un estímulo nutricional positivo (infusión intragástrica de nutrientes como glucosa, caseína, aceite de maíz u otros) (Sclafani, 1995). En cerdos se consigue condicionar un sabor completamente “no palatable” (amargo) con relativa facilidad (Forbes, 2001).

El aprendizaje aversivo alimenticio es un mecanismo adaptativo ampliamente distribuido en el reino animal (desde insectos y nematodos, hasta primates) que previene la ingestión de alimentos (sólidos o líquidos) que en un momento determinado fueron nocivos (Lucas y Sclafani, 1995; Forbes, 2001; Scalera, 2002). Se ha encontrado que hay una relación directa entre el grado de malestar postingestivo y la persistencia del aprendizaje (Kyriazakis y cols, 1999), lo cual no resulta extraño si consideramos la importancia de evitar el consumo de toxinas potencialmente mortales.

Como hemos visto el término “sabor” implica gusto y olor de un alimento y cualquiera de ellos puede condicionarse para generar aprendizaje aversivo (Lucas y Sclafani, 1995; Welzl y cols, 2001; Myers y Sclafani, 2006).

Aprendizaje Aversivo al Olor (AAO)

El papel de los estímulos olfativos es de particular interés, pues son responsables en gran medida de dar a los alimentos sus sabores distintivos y guían el comportamiento de búsqueda y evitación a distancia (Lucas y Sclafani, 1995). La evaluación sensorial de la mayoría de los alimentos depende de la percepción olfativa, lo cual queda evidenciado por las marcadas distorsiones en la percepción de los sabores mostradas en pacientes anósmicos (Yeomans, 2006).

El AAO también es llamado condicionamiento aversivo al olor, aversión condicionada por el olor o aversión olfativa condicionada. El AAO es un aprendizaje asociativo en el cual la pista olfativa que ofrece el alimento es la que reporta la “saliencia” (notoriedad) - que Kalat y Rozin en 1970 definieron como “la tendencia relativa de una sustancia nueva a ser asociada con envenenamiento” (revisado en Martin y Lawrence, 1979).

Debido a la secuencia de presentación de los estímulos, se considera que el AAO es un tipo de condicionamiento clásico. En nuestra investigación utilizamos ratas como sujetos experimentales para estudiar el AAO. El procedimiento general es el siguiente: se les ofrece una bebida con un olor característico que hace las veces de estímulo condicionado (EC); después de beber, se les inyecta por vía intraperitoneal cloruro de litio (LiCl), que hace las veces de estímulo incondicionado (EI); el malestar gastrointestinal ocasionado por el LiCl es la respuesta incondicionada (RI). Al presentar nuevamente el agua con olor (EC), las ratas evitan beberla, lo cual constituye la respuesta condicionada (RC). Podemos entenderlo fácilmente con el siguiente esquema:

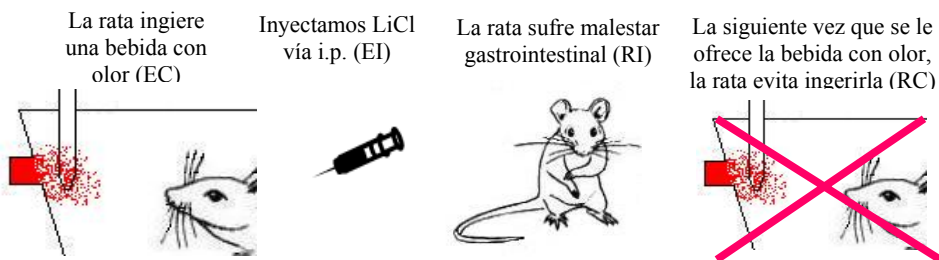


Figura 3. Esquematización del AAO.

Características del AAO como modelo de estudio de la memoria

Identificación de las etapas del proceso mnémico. A nivel conductual, en el AAO pueden identificarse fácilmente la adquisición de información y la evocación (sea MCP o MLP). Con relativa claridad pueden inferirse los periodos de formación de MCP, y de consolidación de MLP. El resultado del condicionamiento se infiere de manera sencilla midiendo el consumo de agua (véase la gráfica 1 en la sección de Resultados, en la que se muestra el efecto típico de evitación de ingesta de la bebida condicionada). Partiendo de su identificación podemos estudiar experimentalmente cada una de las etapas para conocer sus mecanismos particulares.

El AAO solo requiere una sesión de entrenamiento para generarse. Esta característica evita los inconvenientes de los ensayos múltiples, tales como la difícil identificación de las etapas (p.ej. en una curva de aprendizaje de varias sesiones es difícil determinar un momento específico de adquisición de información), la consecuente dificultad para decidir el momento adecuado de una manipulación experimental, y finalmente, la interpretación de los resultados.

Existe una marcada homología en el diseño estructural y funcionamiento del sistema olfativo entre diferentes clases de organismos – incluyendo insectos y mamíferos – que permite extender con cierta seguridad los principios establecidos en el estudio de alguna de ellas a las otras (Davis, 2004)

Por las razones mencionadas, el AAO resulta un modelo muy conveniente para el estudio de la neurobiología de la memoria en general

Vías de integración del AAO

El sistema olfativo principal procesa el estímulo olfativo. A partir de la transducción sensorial en el epitelio olfativo de la cavidad nasal, las neuronas olfativas primarias mandan sus axones a la capa glomerular del bulbo olfativo principal (BO). A partir del BO las neuronas mitrales envían sus axones directamente al tubérculo olfativo, a la corteza piriforme, la corteza entorinal y la amígdala (Ami) (Isaacson, 2010). La información del malestar gástrico, inducido por LiCl, es llevada por el X par craneal (nervio vago) al núcleo del tracto solitario (NTS) y luego al núcleo parabraquial (NPB), el cual se conecta con la amígdala (Ami) y otras estructuras. Debido a la convergencia de información olfativa y visceral, se piensa que es en el núcleo basolateral de la Ami (BLA) donde ocurre la asociación (Ferry y Di Scala, 1997) (figura 4). Sin embargo existe la posibilidad de que otras áreas, como el tálamo ventroposteromedial o el hipotálamo lateral,

también se encarguen de este procesamiento. Se ha considerado que el alertamiento hacia un estímulo condicionado es el resultado de los cambios en los sistemas sensoriales primarios, mientras que el valor hedónico de esa memoria – acercamiento o evitación – involucra a la Ami (Rainecki y cols, 2009; Wilson y Sullivan, 1994). Una teoría alternativa señala que la Ami desempeña una función moduladora en la formación de la memoria, facilitando su almacenaje, y no almacenándola propiamente (Wilson y Sullivan, 1994). Parte de estos conocimientos, principalmente respecto al procesamiento del malestar visceral, se han tomado de experimentos que involucran al gusto y no al olor, o al complejo olor-gusto (sabor).

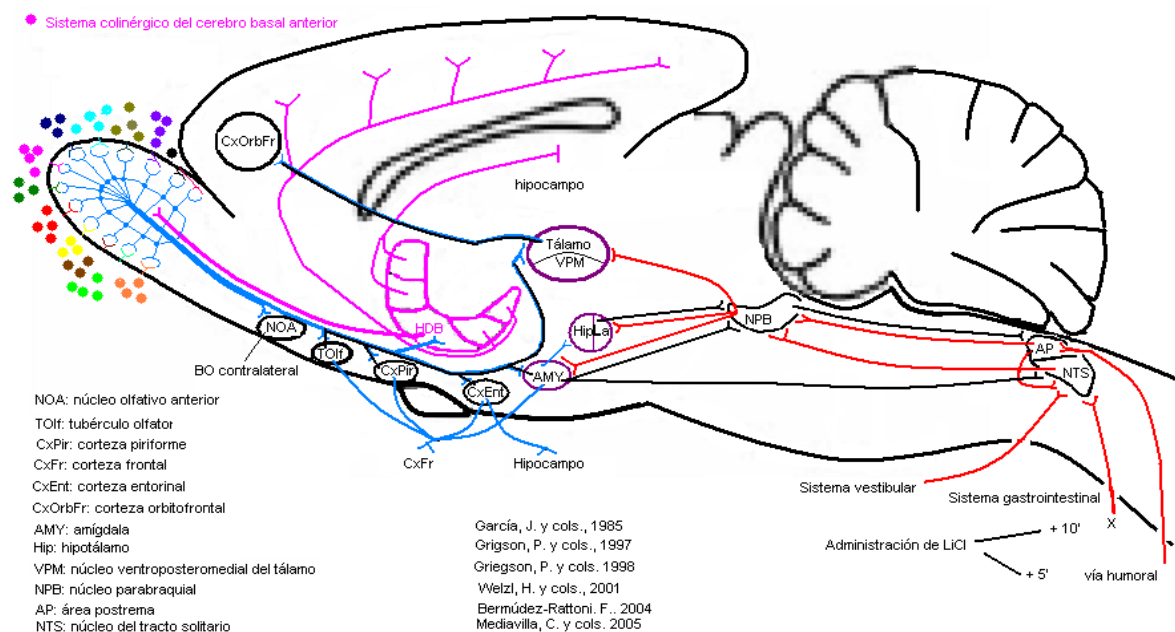


Figura 4. Vías de integración del AAO

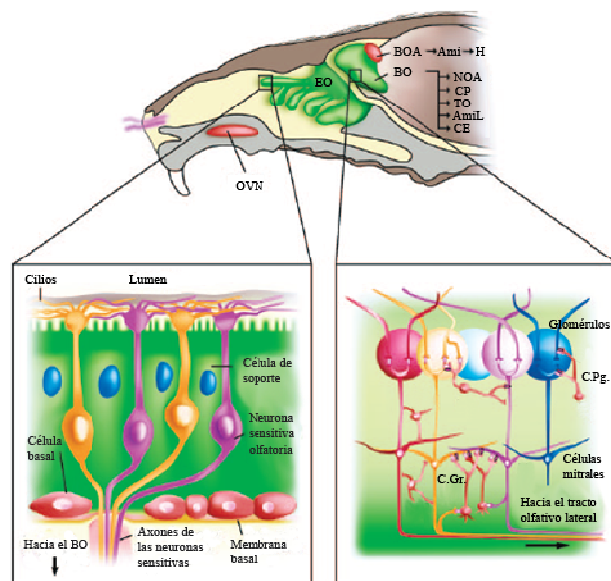
Sistema Olfativo

Los estímulos olfativos pueden ser procesados por dos sistemas separados. El primero es conocido como el sistema olfativo principal; el segundo es conocido como sistema olfativo accesorio o sistema vomeronasal (véase figura 5). Puesto que éste último parece no participar en el AAO lo describiré brevemente. Sus células receptoras se localizan en el órgano vomeronasal y unen principalmente feromonas. La información llega al bulbo olfativo accesorio, cuyas conexiones casi exclusivas con regiones de la Ami que proyectan hacia el hipotálamo sugieren

que las moléculas censadas por éste sistema están involucradas con la fisiología y conducta reproductivas (Kandel, 2001).

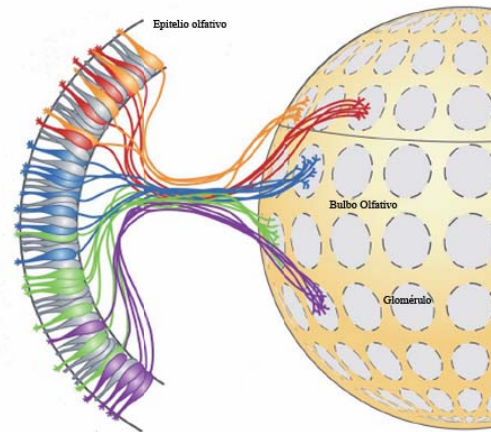
En lo concerniente al sistema principal, podemos ver *grosso modo*, que el epitelio olfativo principal (EO en la figura 5) es el primer sitio de contacto con las moléculas odorantes. Las neuronas sensitivas olfativas (NSO) que unen a las moléculas odorantes generan un potencial de acción que es conducido por el axón hacia regiones morfológicamente discretas del bulbo olfativo principal (BO) conocidas como glomérulos. En este sitio forman sinapsis con las dendritas de las células de proyección Mitrals y en Penacho del BO, quienes al ser excitadas por la liberación de glutamato desde las NSO generan potenciales de acción llevados a través de sus axones a varias regiones de la corteza cerebral. Los axones de las células de proyección hacen relevos en el núcleo olfativo anterior (NOA), en la corteza piriforme, en el tubérculo olfativo (TO), en la Ami lateral (AmiL) y en la corteza entorinal (CE) (Kandel, 2001; Lledo y cols, 2005; Nagao y cols, 2002; Isaacson, 2010).

Figura 5. Sistemas olfativos accesorio y principal. Accesorio: órgano vomeronasal (OVN) y bulbo olfativo accesorio (BOA) en rojo; proyecciones hacia amígdala (Ami) e hipotálamo (H). Principal: epitelio olfativo (EP) y bulbo olfativo principal (BO) en verde; proyecciones hacia núcleo olfativo anterior (NOA), corteza piriforme (CP), tubérculo olfativo (TO), amígdala lateral (AmiL) y corteza entorinal (CE). El código de colores de las NSO indica la expresión del mismo receptor. Se muestran dos tipos de interneuronas del BO: células periglomerulares (C.Pg.) y células granulares (C.Gr.). Modificado de Lledo y cols, 2005.



Todas aquellas NSO que expresan el mismo tipo de receptor, solamente uno de entre aproximadamente 1000 diferentes (Davis, 2004), proyectan sus axones al mismo glomérulo del BO, creando un patrón de convergencia, es decir, un mapa olfativo (Nagao y cols, 2002; Breer, 2003; De María y Ngai, 2010) (ver figura 6).

Figura 6. Patrones de distribución y proyección de las NSO. Las NSO que expresan un tipo de receptor están segregadas espacialmente en el epitelio olfativo y proyectan sus axones a un glomérulo común en el BO. Modificado de DeMaria y Ngai, 2010.



Lo anterior también se observa con cierto solapamiento en la corteza olfativa primaria, o corteza piriforme (Davis, 2004; Isaacson, 2010) (ver figura 7).

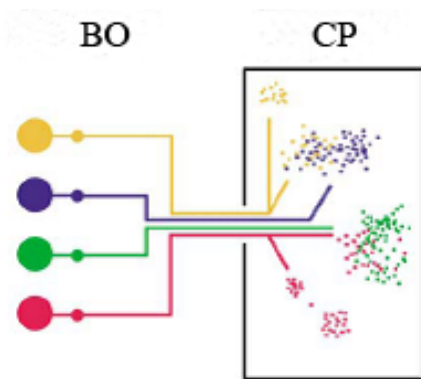


Figura 7. Campos terminales de la CP. Las células de proyección del BO envían sus axones a regiones específicas de la CP, creando un mapa estereotipado del ingreso glomerular. Davis, 2004.

Aprendizaje olfativo

En el sistema olfativo, la experiencia puede modificar los patrones de respuestas neurales hacia olores aprendidos (Fletcher y Wilson, 2002; Wilson y cols, 2004). En ratas adultas, se han demostrado cambios estructurales y funcionales en el bulbo olfativo (BO), en el núcleo olfativo anterior (NOA) y en la corteza piriforme (CP) inducidos por aprendizaje asociativo y por simple habituación, con modificación de la actividad evocada por el olor (Mouly y cols, 1990; Fletcher y Wilson, 2002). Como ejemplo podemos citar el trabajo del grupo de investigación dirigido por Michael Leon, quienes ya entre los años 1987 y 1991, utilizando un paradigma de condicionamiento olfativo con estimulación táctil en ratas no destetadas, demuestran incrementos de captura de 2-deoxiglucosa (2-DG) en la capa glomerular del BO, además de un incremento de

alrededor del 19 % en el número de células de esta misma capa (revisado en Wilson y Sullivan, 1994). También se han descrito cambios por asociación de un olor con choques eléctricos en las patas en ratas jóvenes, mediados por la fosforilación de CREB por MAKP (Okutani y cols, 1999), así como la generación de potenciación de largo plazo mediada por receptores β -adrenérgicos en el BO (Zhang y cols, 2010).

El BO un sitio excelente para el estudio de las relaciones entre plasticidad y aprendizaje pues es bastante accesible para diversas manipulaciones experimentales y se encuentra en relación estrecha con el sistema límbico y estructuras del cerebro basal, que son críticas para el aprendizaje y la memoria. Además de ser el primer relevo de la información proveniente de las NSO, el BO recibe eferentes de numerosas estructuras centrales ascendentes neuromoduladoras, incluyendo colinérgicas (del brazo horizontal de la banda diagonal del Broca), serotoninérgicas (del rafé) y noradrenérgicas (del *locus coeruleus*) (Wilson y Sullivan, 1994). Estos ingresos centrífugos confieren a los circuitos del BO las propiedades integradoras necesarias para el establecimiento de las modificaciones inducidas por aprendizaje (Davis, 2004; Lledo y cols, 2005; Mouly y cols, 1990).

Debido a la gran invasión colinérgica que recibe el BO proveniente de la parte lateral del brazo horizontal de la banda diagonal de Broca (BHBDB) (ver figura 8), y a la bien conocida importancia del sistema colinérgico en procesos de aprendizaje y memoria, el BO es una estructura conveniente para estudiar la influencia de Acetilcolina (ACh) en estos procesos (Linster y cols, 2000; Lucas-Meunier y cols, 2003).

Es interesante observar que el BHBDB recibe aferencias del sistema olfativo, por lo cual la liberación de ACh en el BO es, por lo menos parcialmente, regulada por la estimulación olfativa misma (Linster y cols, 2000).

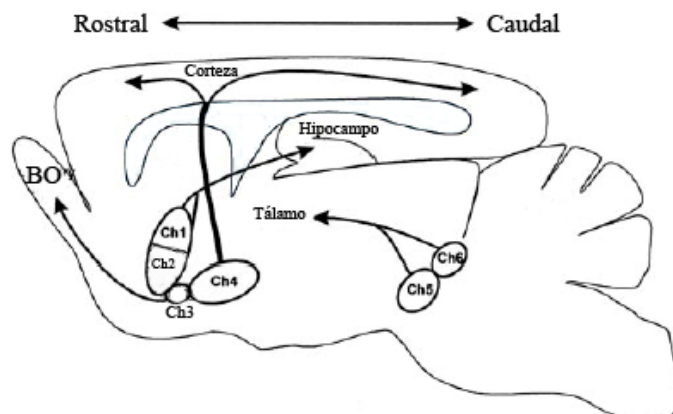


Figura 8. Vías colinérgicas centrales en el cerebro de rata. El BO es invadido por Ch3, que corresponde a la parte lateral del brazo horizontal de la banda diagonal de Broca. Modificado de Lucas-Meunier y cols, 2003.

Bulbo Olfativo (BO)

El BO presenta una organización laminar, con 7 capas concéntricas: capa de nervios olfatorios (CNO), capa glomerular (CG), capa plexiforme externa (CPE), capa mitral (CM), capa plexiforme interna (CPI), capa granular (CG) y zona endodimial (ZE) (Shipley y Ennis, 1996) (figura 9).

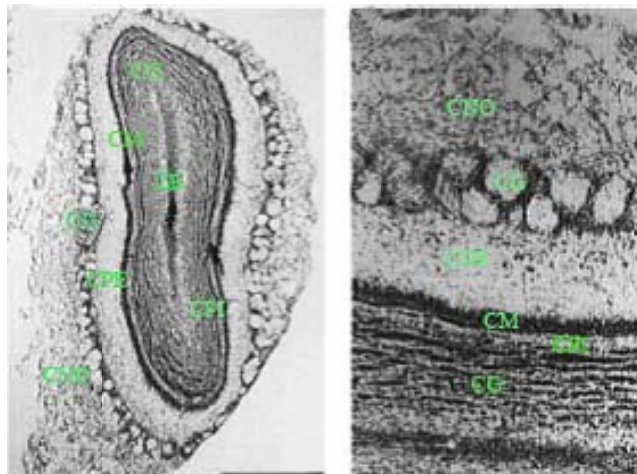


Figura 9. Citoarquitectura del BO. Corte coronal. Barra = 1 mm. Modificado de Shipley y Ennis, 1996.

En el BO, la información se codifica en patrones espaciales de glomérulos activados. Las respuestas débiles a un odorante dado en una unidad glomerular pueden ser suprimidas por respuestas fuertes en otra unidad. Resaltando los campos receptivos de células de proyección individuales y debilitando la actividad de células de proyección vecinas, las neuronas locales (principalmente granulares GABAérgicas, aunque también existen dopaminérgicas) generan la inhibición lateral que controla la calidad y cantidad de transferencia de información desde el BO a áreas corticales superiores (Saghatelian y cols, 2003).

Se piensa que cada glomérulo realiza cómputos que subyacen a la percepción, discriminación y aprendizaje de olores, sin ser solamente un sitio de tránsito de la información olfativa. Las interacciones intra e inter glomerulares que ocurren en el BO sincronizan la actividad de las células de proyección de distintos glomérulos, ofreciendo sitios atractivos de plasticidad subyacente a diferentes formas de aprendizaje olfativo (Davis, 2004).

Acetilcolina (ACh)

La acetilcolina (ACh) fue la primer molécula identificada como neurotransmisor. En 1921, Otto Loewi confirmó la transmisión química del impulso nervioso con su experimento en corazón de rana. La ACh es sintetizada en las terminales de los axones por la enzima colina acetiltransferasa, tomando como sustrato acetil coenzima A (acetilCoA) (del ciclo respiratorio de la mitocondria) y colina (una molécula obtenida de la dieta). ACh es el transmisor empleado por las neuronas motoras de la médula espinal y es liberada en las uniones neuromusculares. En el sistema nervioso autónomo es el transmisor para todas las neuronas preganglionares y para las posganglionares parasimpáticas. Además sirve como neurotransmisor en varias regiones del cerebro. Cuando un potencial de acción excita la terminal colinérgica, una corriente de Ca^{++} entra en ella y la ACh es liberada en la sinapsis, donde interactúa con sus receptores (nicotínicos o muscarínicos); es degradada por la enzima acetilcolinaesterasa, que se ubica en la membrana postsináptica, generando los metabolitos acetato y colina (Kandel, 2001).

Sistemas colinérgicos del Sistema Nervioso Central y su implicación en procesos cognitivos

Los dos grandes sistemas colinérgicos del SNC son: el del cerebro basal anterior, conformado por los núcleos Ch1 (núcleo septal), Ch2 (brazo vertical de la banda diagonal de Broca), Ch3 (brazo horizontal de la banda diagonal de Broca), y Ch4 (*sustantia innominata* y núcleo basal magnocelular preóptico); y el del tallo cerebral, conformado por los núcleos Ch5 (núcleo pediculopontino) y Ch6 (laterodorsal tegmental) (Lucas-Meunier y cols, 2003) (ver figura 8).

El interés en las funciones de los sistemas colinérgicos centrales incrementó enormemente a partir de las demostraciones neuropatológicas de la reducción de marcadores colinérgicos en la corteza cerebral en personas que habían muerto padeciendo la enfermedad de Alzheimer, y de que este decremento correlacionaba con el grado de deterioro cognitivo (Everitt y Robbins, 1997; Gold, 2003). Además de la enfermedad mencionada, en otros desordenes caracterizados por deterioro de la memoria (enfermedad de Parkinson, de Creutzfeldt-Jacob, síndrome de Down, de Korsakoff, etc.) también se ha encontrado degeneración del sistema colinérgico del cerebro basal

anterior (Zola-Morgan y Squire, 1993; Everitt, y Robbins, 1997; Castillo y cols, 1999; Lucas-Meunier y cols, 2003).

Actualmente sabemos que la ACh actúa en varias funciones cognitivas, tales como atención, aprendizaje y memoria. Además participa en procesos de sueño, vigilia y modulación cortical de la información sensitiva (Lucas-Meunier y cols, 2003; Gold, 2003; Klinkenger y cols, 2010). Existe evidencia de que estas acciones son ejercidas controlando la relación señal/ruido del procesamiento sensitivo (Lucas-Meunier y cols, 2003; Everitt y Robbins, 1997). En general, todas las evidencias han llevado a señalar que interferir las funciones colinérgicas impide el aprendizaje y que facilitarlas lo promueve (Gold, 2003). Se ha sugerido que el proceso cognitivo más importante en el que interviene la ACh es la atención (Woolf, 1998; Pepeu y Giovannini, 2004). Lo anterior debido a los resultados en experimentos de microdiálisis (Pepeu y Giovannini, 2004), en adquisición de tareas operativas simples, donde los incrementos de liberación de ACh cortical se limita a los momentos iniciales, cuando la demanda de procesos de atención son altos. La estimulación visual, auditiva, olfativa y táctil incrementa la liberación de ACh en la corteza cerebral correspondiente y en el hipocampo. Así, se ha supuesto que el sistema colinérgico se activa en respuesta a la entrada sensorial de cualquier tipo (Pepeu y Giovannini, 2004).

Receptores colinérgicos

Existen dos tipos de receptores para ACh, los nicotínicos y los muscarínicos.

Los receptores nicotínicos son ionotrópicos. Se ubican tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico. En el SNC se localizan en posición presináptica donde modulan la liberación de neurotransmisor (Lucas-Meunier y cols, 2003). La carencia de antagonistas muy selectivos ha evitado la caracterización precisa de los diferentes subtipos (Lucas-Meunier y cols, 2003).

Los receptores muscarínicos son metabotrópicos. Inicialmente se identificaron en el SNC gracias al uso clínico de la galamina como un agente preanestésico. Entonces, utilizando como parámetro la afinidad de un antagonista llamado pirenzepina, se demostró la existencia de varios subtipos, y se agruparon en dos clases: los tipo M1 con alta afinidad por la pirenzepina, y los tipo M2 con media a baja afinidad. Actualmente se conocen cinco receptores distintos (M1-M5), cuyos genes han sido clonados (m1-m5), y cuatro de ellos (M1-M4) han sido caracterizados

farmacológicamente. Cada uno de ellos se acopla a distintas proteínas G modulando, vía segundos mensajeros, la activación de canales iónicos. Los de la familia M1 (M1, M3 y M5) se localizan principalmente a nivel postsináptico, mientras que los de la familia M2 (M2 y M4) se localizan en la presinapsis como autoreceptores implicados en la retro estimulación (Lucas-Meunier, y cols, 2003). Las rutas de señalización mediadas por proteínas G no están bien caracterizadas y se sabe que hay intercambios entre ellas, lo que hace difícil definir sus mecanismos de acción (Lucas-Meunier y cols, 2003). La farmacología selectiva incluye solamente antagonistas. No existen agonistas específicos para los subtipos particulares (aunque se ha utilizado arecolina como agonista no selectivo). Atropina y escopolamina son antagonistas no selectivos.

Una buena cantidad de datos muestran que el bloqueo con escopolamina induce deterioros en aprendizaje y memoria, mientras que drogas procolinérgicas, especialmente inhibidoras de la acetilcolinesterasa, pueden aminorar tales deterioros (Klinkenberg y cols, 2010; Shipley y Ennis, 1996). La pirenzepina es antagonista selectivo para receptores M1; metocramina, AFDX-116 y galamina son más selectivos para M2 (Lucas-Meunier y cols, 2003). Diversos trabajos en los que se han utilizado dichos antagonistas – en paradigmas no olfativos – han generado el consenso de que el bloqueo de M1 se relaciona con deterioro cognitivo, en tanto que el bloqueo de M2 induce mejoría, incluyendo la atenuación de los efectos provocados por bloqueo de M1, probablemente por incremento de la liberación de ACh (Hasselmo y Sarter, 2011; Quirion y cols, 1995; Shipley y Ennis, 1996).

A pesar de lo mencionado, todavía se considera que no existen drogas altamente selectivas, por lo cual sigue siendo difícil la interpretación de las funciones individuales (Wess, 2004). La generación de cepas de ratones carentes de los genes (knockout) que codifican para los distintos mAChR, en general indican lo mismo que los estudios farmacológicos, que los ratones carentes de m1 presentan deterioros cognitivos severos y por lo tanto se sostiene que realiza funciones críticas para el aprendizaje y memoria. Aquellos carentes de m2 muestran resultados contradictorios, pues a pesar de la información obtenida por medios farmacológicos, en estos ratones se observa deterioro del aprendizaje en pruebas de evitación pasiva, en memoria de trabajo medida en el laberinto circular de Barnes y en prueba de retraso alternado en laberinto T (Wess, 2004).

Etapas del aprendizaje y Acetilcolina

Respecto a las etapas del aprendizaje en las que interviene la ACh, existen demostraciones de que es esencial para la adquisición una nueva tarea y para su consolidación, pero no para su evocación. En el paradigma de condicionamiento aversivo al sabor, la administración de tetrodotoxina en el núcleo basal magnocelular (Ch4) previo a la adquisición de los estímulos impide la aversión, mientras que la administración previa a la evocación no tiene efectos (Miranda y Bermúdez Rattoni, 1999). Jerusalinsky y cols (1997) encuentran que la administración de escopolamina vía sistémica, o directamente en la Ami, en el septo medial o en el hipocampo, poco tiempo después del entrenamiento – una vez que ha pasado la etapa de adquisición y comenzado la consolidación – causa amnesia en el paradigma de evitación pasiva (step-down inhibitory avoidance). Sus resultados lo llevan a argumentar que la neurotransmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos es necesaria para la consolidación.

Por otro lado, existen trabajos en los que la MLP para una tarea de discriminación espacial requiere de tres horas para volverse resistente a los efectos amnésicos de la administración de escopolamina (Wolf, 1998), implicando cierta participación colinérgica durante ese tiempo.

Como vimos al inicio de este apartado, Miranda y Bermúdez Rattoni (1999) concluyen que la transmisión colinérgica no es necesaria para la evocación del condicionamiento aversivo gustativo. Sin embargo, Woolf (1998) refiere varios trabajos que contradicen los resultados de Miranda. Menciona un trabajo en humanos, en el que la administración sistémica de escopolamina interfiere la evocación de objetos en un paradigma de libre evocación (revisado en Wolf, 1998). Menciona también estudios en animales con resultados de interferencia de la evocación ocasionada por administración de escopolamina así como por lesión del cerebro basal anterior (revisado en Wolf, 1998). Usando abejas como sujetos experimentales, Cano-Lozano y Gauthier (1998) en el paradigma de condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de la probóscide (consiste en la estimulación de las antenas con esencia de vainilla seguida de estimulación con una gota de agua azucarada a la misma antena, lo cual provoca la extensión de la probóscide; entonces se le permite a la abeja tomar del agua azucarada por tres segundos; en subsecuentes presentaciones de la esencia sola, la abeja que aprendió extenderá la probóscide), demuestran que la administración intracraneal de escopolamina, así como de atropina (ambos bloqueadores de todos los subtipos de receptores muscarínicos) diez minutos antes de la prueba

de evocación induce su deterioro; en las mismas condiciones experimentales, el antagonismo selectivo de receptores M1 con pirenzepina no bloquea la evocación (Cano-Lozano y Gauthier, 1998).

Con base en la información revisada, no podemos concluir que la participación de la transmisión colinérgica se limite a la etapa de adquisición de la información, como algunos autores han sugerido, aunque parece que su papel en la consolidación o en la evocación puede limitarse a algunas regiones cerebrales.

Aprendizaje olfativo, Bulbo olfativo y Acetilcolina

A pesar de que los estudios a nivel conductual han revelado la importancia de las eferencias colinérgicas en la memoria olfativa, los sitios y mecanismos de acción siguen sin estar bien definidos. En la mayoría de estudios farmacológicos se han utilizado agonistas colinérgicos no selectivos (ACh), agonistas muscarínicos generales (arecolina) y antagonistas muscarínicos generales (escopolamina, atropina) (Everitt y Robbins, 1997, Castillo y cols, 1999, Wess, 2004). Los estudios de aprendizaje olfativo que incluyen agentes colinérgicos se han realizado principalmente en modelos de contexto social y/o reproductivo (Anglade y cols, 1999; Lévy y cols, 1997) que sabemos requieren mayormente del procesamiento del sistema olfativo accesorio. Un estudio relevante, debido a la semejanza con nuestro acercamiento farmacológico es el de Ravel y cols (1994), quienes administran escopolamina intrabulbar, y encuentran deterioro de memoria de corto plazo, en una tarea de pareo retrasado (delayed matching) con olores.

Respecto al funcionamiento a nivel celular, se ha visto que tanto la estimulación eléctrica de las fibras colinérgicas que inervan al BO, como la aplicación directa de ACh en el BO *in vivo*, arrojan resultados contradictorios, unas veces con incremento y otras con decremento de la actividad de disparo de las células mitrales y de células periglomerulares (Ravel y cols, 1990). *In vitro*, Castillo y cols (1999) demostraron un efecto dual de la activación muscarínica por carbacol (agonista colinérgico, 50 – 100 μ M) sobre las interneuronas granulares, con hiperpolarización y consecuente disminución de su frecuencia de disparo basal, pero con aumento de la liberación de GABA en las sinapsis dendrodendríticas recíprocas que contactan con las dendritas secundarias de las células mitrales. Adicionalmente encontraron que la activación de receptores nicotínicos despolariza a las células mitrales y periglomerulares aumentando su frecuencia de disparo

(Castillo y cols, 1999). Evidencias más recientes indican que concentraciones menores de carbacol (2 μ M) aumentan la frecuencia de disparo de las células granulares y la inhibición de células mitrales durante la estimulación fásica lenta (similar a la actividad generada durante la conducta de olfateo), a través de receptores M1, así como disminución de la hiperpolarización posterior a la descarga granular (Pressler y cols, 2007). Es posible que los efectos principales de la transmisión colinérgica muscarínica, mediada por receptores M1, incluyan aumento de la excitabilidad y regulación de la adaptabilidad de las células granulares ante estimulación sostenida, con la consecuente inhibición de la actividad de las células mitrales.

A pesar de la información respecto a la modulación sináptica colinérgica en el BO, aún se desconoce el significado funcional para los mecanismos de formación de la memoria. En la tabla 1 es posible observar que en todas las capas del BO existen receptores tanto nicotínicos como muscarínicos (excepto en la capa mitral), lo cual complica, como varios autores han observado, la interpretación de los efectos de la ACh sobre el procesamiento de información y el establecimiento de la memoria.

Tabla 1. Receptores muscarínicos y nicotínicos en las diferentes capas del BO					
Receptor	Glomerular	Plexiforme externa	Mitral	Plexiforme interna	Granular
M1	--	++	--	++	--
M2	++	++	--	++	++
M3	--	++	--	++	--
M4	--	++	--	++	--
Nicotínicos	++	++	--	--	--

Modificado de Shipley y Ennis, 1996.

Justificación del proyecto

Como vemos, ha sido difícil definir las funciones específicas de cada subtipo de receptor muscarínico en el BO. Gran parte de la información proviene de modalidades sensoriales no olfativas y aquella obtenida en modelos olfativos principalmente se ha realizado *in vitro*. Para nosotros, la relevancia de la transmisión colinérgica para los procesos de aprendizaje y memoria queda manifiesta en patologías como el Alzheimer, en donde el deterioro de dichos procesos va de la mano con el daño a los sistemas colinérgicos. Adicionalmente, las disfunciones olfativas que anteceden al deterioro cognitivo en dicha enfermedad, y a la sintomatología motora en otras patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, nos motivaron a estudiar a nivel conductual los efectos de la transmisión muscarínica en un modelo olfativo de aprendizaje. El modelo de AAO nos parece adecuado por la relativa facilidad con la que se diferencian las etapas del aprendizaje y de la formación de la memoria. Elegimos el BO debido a que es el primer relevo central de la información olfativa y a que recibe eferencias directas de los núcleos colinérgicos del cerebro basal anterior.

Hipótesis general

Los receptores muscarínicos del BO son necesarios para el aprendizaje y formación de la memoria del AAO.

Objetivo general

Describir el efecto conductual del antagonismo selectivo de los tipos de receptores muscarínicos (M1 y M2) del BO durante el AAO.

Hipótesis específicas para M1:

- Su bloqueo antes de la adquisición de la información impide el AAO.
- Su bloqueo entre estímulos no afecta el AAO.
- Su bloqueo en la fase de consolidación no afecta la formación de la memoria del AAO.

- Su bloqueo no afecta la evocación de la memoria del AAO.

Hipótesis específicas para M2:

- Su bloqueo antes de la adquisición de la información facilita el AAO.
- Su bloqueo entre estímulos no afecta el AAO.
- Su bloqueo en la fase de consolidación no afecta la formación de la memoria del AAO.
- Su bloqueo no afecta la evocación de la memoria del AAO.

Metodología.

Sujetos

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un peso de 250-300 g, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina-UNAM. Se mantuvieron dos ratas por cada caja en el bioterio del laboratorio, con agua y alimento *ad libitum* (Rodent Laboratory Chow, Purina, México) y un ciclo luz/oscuridad de 12/12 h. Se formaron grupos independientes para cada grupo experimental.

Implante quirúrgico de cánulas cerebrales

Se practicó una cirugía estereotáxica para implante craneal de cánulas guía – para posterior inyección intracerebral – de acero inoxidable calibre 23 g (diámetro externo 0.6 mm). La región blanco fue la porción central del BO (1.5 mm lateral a la sutura sagital, 6.7 mm anterior a Bregma y 4 mm ventral a la superficie craneal) (Paxinos, 1998).

El procedimiento se realizó bajo anestesia general con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal. Se preparó la zona (rasurado, lavado, embrocado). Se colocó al sujeto en el marco estereotáxico y se administró lidocaína como anestésico local por vía subcutánea. Se incidió piel y músculos de la cabeza por línea media con bisturí. Los tejidos blandos fueron separados del hueso y se marcaron los puntos exactos según las coordenadas ya mencionadas. Se practicaron los trépanos correspondientes para el implante bilateral de las cánulas guías más un trépano adicional para colocar un tornillo que sirvió de ancla al implante. Se colocaron las cánulas con el aparato estereotáxico y una vez en el lugar adecuado se fijaron con acrílico dental al tornillo ancla. Se suturó la incisión y se limpiaron los restos de sangre. Se aplicó una sola dosis de antibiótico (penicilina-estreptomicina) para prevenir infecciones. Se

mantuvieron tapadas las cánulas con un estilete. Se les dio una semana de recuperación antes de iniciar los experimentos.

Condicionamiento

Los sujetos fueron entrenados en el siguiente esquema de AAO:

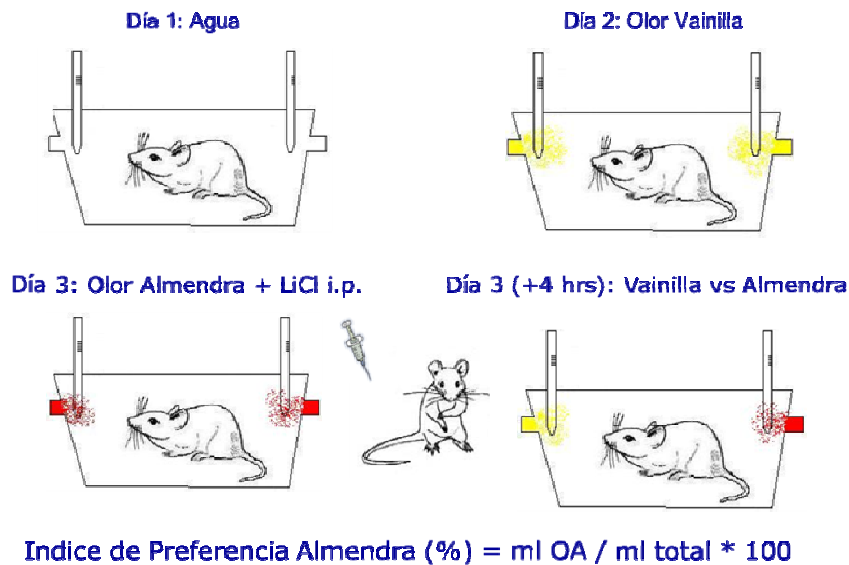


Figura 11. Modelo de AAO utilizado en el laboratorio.

Los experimentos se iniciaron siempre entre las 12:00 y 14:00 h, en la fase de luz. Durante los cinco días siguientes se permitió la ingestión de agua en la caja de experimentación durante 10 min. Todos los días se midió la ingestión de agua de cada pipeta por separado.

Primer día: se ofreció agua sola. Este día los sujetos conocen la caja de experimentación y aprenden a beber de las pipetas.

Día dos: se ofreció agua durante 10 min en presencia de olor de fresa (esencia comercial). A este olor le llamaremos seguro, pues no representará peligro para el sujeto.

Día tres: se ofreció agua durante 10 min en presencia del olor de naranja (esencia comercial) y al terminar se administró LiCl por vía intraperitoneal (i.p.) para provocar malestar visceral. A este olor lo llamaremos olor aversivo pues su presencia es asociada con malestar gastrointestinal.

Este día se realizó la administración intracerebral de los diferentes antagonistas elegidos (escopolamina como antagonista general, pirenzepina para receptores M1, galamina para M2) en

el caso de la adquisición (antes del estímulo olfativo o antes del LiCl), y de la consolidación (después de ambos estímulos). A través de una bomba de inyección, se administró el fármaco respectivo diluido en un volumen de 1 µl de solución salina 0.9 % en un tiempo de un minuto. Se esperó un minuto adicional antes de retirar la cánula de inyección, para permitir la difusión en el tejido cerebral.

Día cuatro: solo se les dio agua y se les permitió descansar en su caja hogar.

Día cinco: se realizó la prueba de evocación, que consistió en una prueba de elección libre entre el olor seguro y el aversivo. Cuando se requirió para analizar el efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos durante la evocación, diez minutos antes de la prueba se administraron los fármacos pertinentes. Se permitió a las ratas beber durante 10 min y posteriormente se obtuvo el índice de preferencia (I.P.) para el olor aversivo. El I.P. se calculó dividiendo el consumo de agua de la pipeta con olor aversivo, entre el consumo total y multiplicándolo por 100. Es decir: $I.P. = \text{ml olor aversivo} / (\text{ml olor aversivo} + \text{ml olor seguro}) \times 100$.

Análisis estadístico

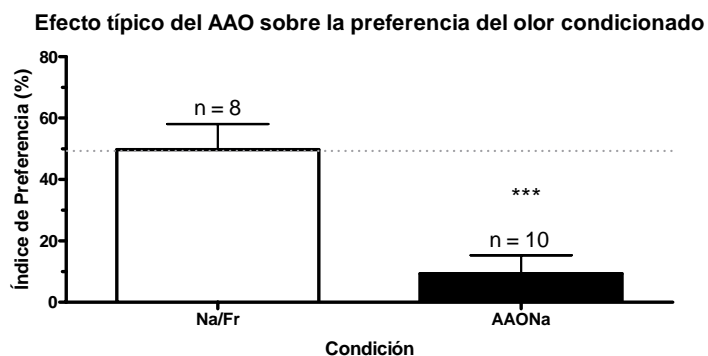
Una vez obtenido el I.P. del olor aversivo de cada sujeto, se promediaron como grupo y se ingresaron al programa Graph Pad Prisma (versión 4) para su análisis estadístico y generación de gráficos. Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnet, que compara todos los grupos contra el grupo control. Cuando fue necesario, se utilizaron pruebas de t de Student. Las gráficas muestran media y error estándar.

Resultados

Control de preferencia natural por dos olores seguros y efecto típico del AAO sobre el olor condicionado

Experimento 1. El AAO reduce significativamente la ingestión del olor condicionado.

El primer experimento consistió en demostrar el efecto típico del AAO. En la gráfica 1 podemos ver la reducción de consumo de agua en presencia de un olor, por su asociación previa con malestar gastrointestinal. En la barra marcada como Na/Fr (naranja vs fresa), se muestra una preferencia prácticamente del 50 % (49 %) para el olor de naranja, cuando no se condicionó (se administró salina 0.9 % en lugar de LiCl). El resto (51 %) es la preferencia de consumo del olor fresa (barra no mostrada). Los porcentajes de consumo de cada olor, prácticamente idénticos cuando no hay condicionamiento, indican que los olores elegidos son ideales para realizar el AAO, pues instintivamente no hay preferencia ni aversión por ninguno. En la barra marcada como AAONa se presentan los valores de un grupo de ratas a las cuales después de beber agua con olor de naranja, se les administró LiCl 0.15 M, 2 % del peso de cada rata, vía i.p. Al asociarse el olor de naranja con el malestar gastrointestinal ocasionado por el LiCl, el I.P. disminuye a menos del 10 %.



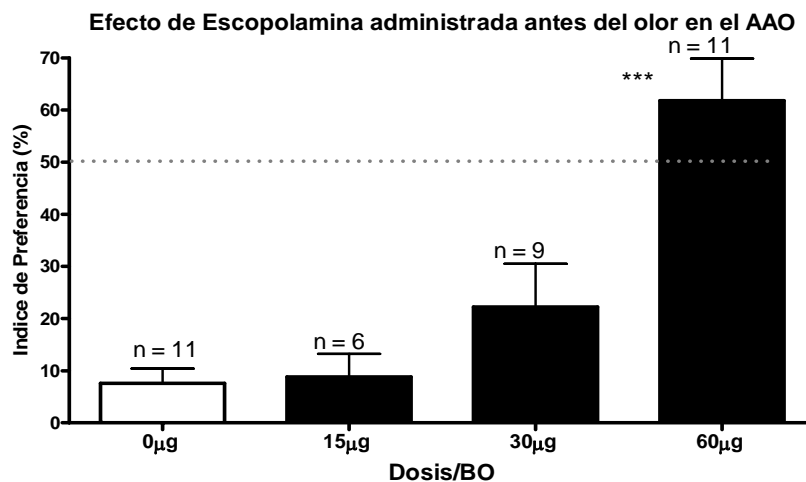
Gráfica 1. Efecto del AAO sobre la preferencia del olor naranja. Prueba de t, con diferencia significativa (** $p < 0.001$). Se grafica media \pm E.E. La línea punteada indica la media (cerca del 50 %) de preferencia por la naranja sin condicionamiento.

Bloqueo de receptores muscarínicos en la etapa de adquisición

Bloqueo general con escopolamina

Experimento 2. El bloqueo de los receptores muscarínicos del BO con escopolamina previo a la presentación de los estímulos, evita el AAO.

Nuestra aproximación inicial consistió en la administración de escopolamina, antagonista muscarínico general, para comprobar que en el BO el procesamiento del AAO depende de esta vía de transmisión. Se escogió administrar antes de la presentación de estímulos ya que es el momento en el que sistemáticamente se han encontrado efectos amnésicos en otros modelos de aprendizaje. Construimos una curva dosis respuesta con tres dosis diferentes administradas en el BO 10 min antes de la presentación del estímulo olfativo. Se inyectaron 15, 30 o 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bilateralmente en el BO a grupos independientes. Se analizó el I.P. de la prueba de evocación con una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Dunnet, para comparar las diferentes dosis contra la dosis control, donde solo se administró el vehículo. La dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{BO}$ redujo significativamente la aversión al olor condicionado produciendo un I.P. de 62 %, estadísticamente diferente al control ($p < 0.001$), y comparable al I.P. de 50 % del grupo sin condicionamiento. El resto de los grupos no mostró diferencia respecto al control. Gráfica 2.



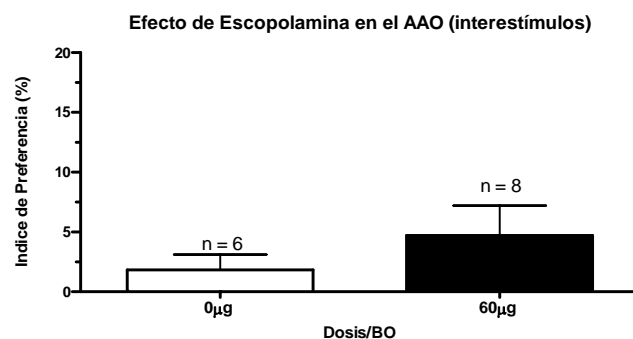
Gráfica 2. Efecto de varias dosis de escopolamina administradas 10 min antes del estímulo olfativo. Se realizó ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet, comparando contra el control (0 μg). Se grafica media \pm E.E. La línea punteada indica el 50 % de preferencia obtenida en el caso de un grupo sin condicionar.

Cabe mencionar que en el grupo control (0 µg/1 µl/BO bilateral) la administración del vehículo (solución salina 0.9 %) no afectó el resultado del AAO (I.P. de 7.6 %), mostrando una aversión prácticamente idéntica al AAO típico mostrado en la gráfica 1 (barra AAONa, I.P. de 9.3 %; prueba de t, $p>0.05$).

Con esta aproximación inicial comprobamos, en concordancia con reportes previos sobre otros modelos de aprendizaje y en otras estructuras, que en el AAO el bloqueo muscarínico con escopolamina de los receptores del BO evita el condicionamiento.

Experimento 3. El bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina después del estímulo olfativo y antes del malestar visceral no afecta al AAO.

Una vez comprobado el efecto amnésico de la escopolamina administrada antes del estímulo olfativo, inyectamos la dosis efectiva (60 µg) después del estímulo olfativo, pero antes de la inyección de LiCl, para analizar la participación muscarínica en la adquisición de la información del malestar visceral y de la asociación de los estímulos. El I.P. fue de 5 %, sin diferencia estadística con una prueba de t ($p>0.05$) respecto al I.P. del grupo control, que mostró un I.P. de 2 % (gráfica 3).



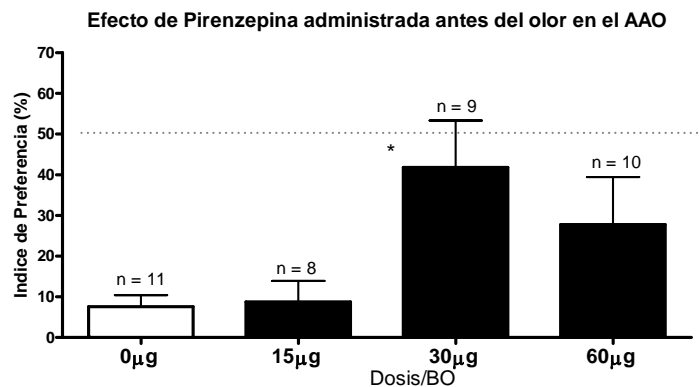
Gráfica 3. Efecto de escopolamina administrada después del estímulo olfativo pero antes del LiCl. Prueba de t, sin diferencia ($p>0.05$). Se grafica media \pm E.E.

Bloqueo selectivo de receptores M1 con pirenzepina

Experimento 4. El bloqueo selectivo de receptores M1 del BO con pirenzepina previo a la presentación de los estímulos, evita el AAO.

Una vez comprobado con escopolamina que el bloqueo de receptores muscarínicos del BO afecta al AAO, iniciamos el bloqueo selectivo de receptores M1. Probamos varias dosis de pirenzepina

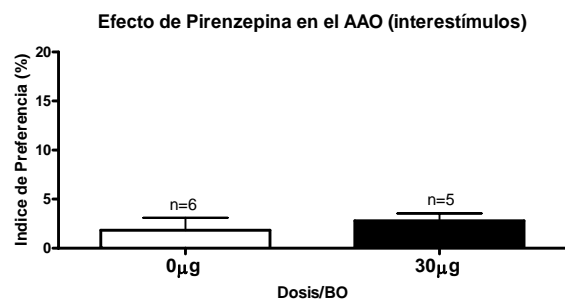
administradas en el BO. Al igual que en los experimentos con escopolamina, inyectamos la pirenzepina 10 min antes de la presentación del estímulo olfativo. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet, para comparar todos los grupos experimentales contra el grupo control. Con una dosis de 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{BO}$ hubo reducción significativa ($p < 0.05$) de la aversión respecto al grupo control, llegando a un I.P. de 42 %, similar al obtenido en un grupo sin condicionar (50 %) y al obtenido con 60 μg de escopolamina (62 %). El efecto se revirtió con dosis mayores (gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto de varias dosis de pirenzepina administradas antes del estímulo olfativo. ANOVA de una vía seguida de Dunnet, con diferencia en la dosis de 30 μg ($p < 0.05$) respecto al control. Se grafica media \pm E.E. La línea punteada indica el 50 % de preferencia de un grupo sin condicionar.

Experimento 5. El bloqueo selectivo de los receptores M1 con pirenzepina después del estímulo olfativo y antes del malestar visceral no afecta al AAO.

En este experimento administramos la dosis efectiva de pirenzepina después del estímulo olfativo y antes del LiCl. Al igual que en el caso de escopolamina, no se encontró efecto significativo (prueba de t, $p > 0.05$), pues el I.P. fue de 3 %, prácticamente idéntico al grupo control (2 %) (gráfica 5).

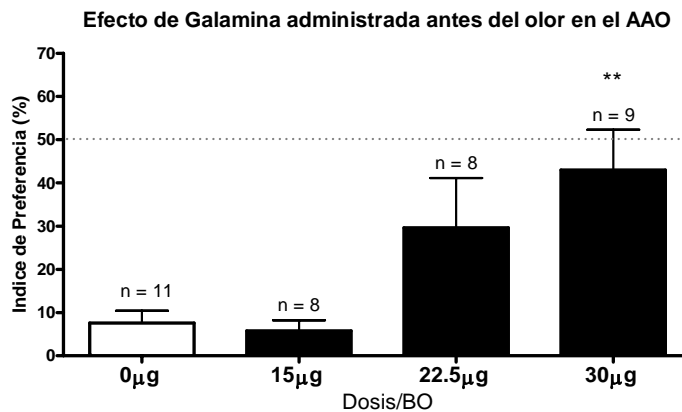


Gráfica 5. Efecto de pirenzepina administrada después del estímulo olfativo pero antes del LiCl. Prueba de t sin diferencias ($p > 0.05$). Se grafican media \pm E.E.

Bloqueo selectivo de receptores M2 con galamina

Experimento 6. El bloqueo selectivo de receptores M2 del BO con galamina previo a la presentación de los estímulos, evita el AAO, por aumento de liberación de ACh.

Procedimos a analizar el efecto del bloqueo de receptores M2 con galamina. Recordemos que la hipótesis de trabajo cambia en este caso, pues al ser predominantemente autoreceptores presinápticos, esperamos aumento de liberación de ACh en las terminales sinápticas y mejoría del aprendizaje. Se construyó una curva dosis respuesta con varias dosis de galamina administradas en el BO. La inyección se realizó 10 min antes de la presentación del estímulo olfativo. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet. Con una dosis de 30 μg encontramos efecto significativo respecto al control ($p < 0.01$), con aumento del I.P. a 43 %, prácticamente idéntico al obtenido con 30 μg de pirenzepina (42 %) y similar al obtenido con 60 μg de escopolamina (60 %) y al del grupo sin condicionamiento (50 %).



Gráfica 6. Efecto de varias dosis de galamina administradas antes del estímulo olfativo. ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet, con diferencias en el grupo de 30 μg respecto al control ($p < 0.01$). Se grafica media \pm E.E. La línea punteada indica el 50 % de preferencia de un grupo sin condicionar.

Este resultado salió de las predicciones pues no esperábamos pérdida de la aversión. Sin embargo, hemos de mencionar que a diferencia del efecto con las dosis efectivas de escopolamina y pirenzepina, con las dosis de 22.5 y 30 μg galamina se produjeron efectos secundarios compatibles con aumento de ACh, similares a los producidos por bloqueadores de la enzima acetilcolinesterasa (hipersalivación, contracción de la musculatura facial, desorientación, diarrea,

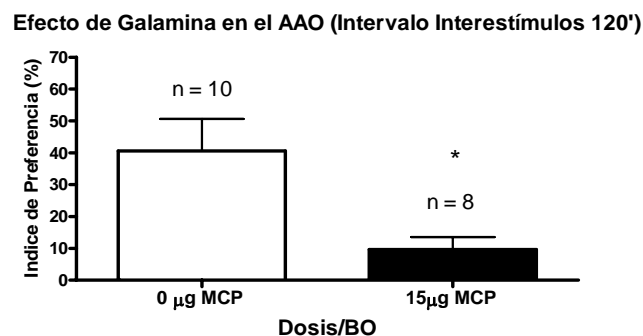
etc.). No conocemos el mecanismo exacto a través del cual el aumento de los niveles de ACh en el BO afectó el AAO, ni podemos explicar el efecto sistémico de nuestra administración local, sin embargo, se sabe que la administración sistémica o directa de nicotina en la arteria carótida interna en ratas, produce vasodilatación de los vasos sanguíneos del BO con el consiguiente aumento del flujo sanguíneo (Shiba y cols, 2006). Es posible que el aumento del flujo permitiera la interacción de la ACh del BO con otras estructuras y vías de neurotransmisión del cerebro. Por otro lado, se sabe que la administración sistémica de inhibidores de la enzima que degrada ACh (acetilcolinesterasa), produce convulsiones y depleción de norepinefrina en el BO (El-Etri y cols, 1999). Así mismo, la aplicación local de ACh en el BO aumenta la liberación de norepinefrina (El-Etri y cols, 1999). También se sabe que la aplicación de agonistas colinérgicos, como carbacol u oxotremorina, en el septo hipocampal, afecta el aprendizaje de tareas espaciales en el laberinto radial (Bunce y cols, 2004). A pesar de que experimentalmente se ha probado la mejoría de la actividad hipocampal por aplicación de colinomiméticos en ratas viejas o cognitivamente comprometidas, se ha sugerido que en ratas jóvenes transforma la actividad normal teta del hipocampo en una actividad epileptiforme, lo cual llevaría al deterioro cognitivo (Wallenstein y Hasselmo, 1997). Adicionalmente Gais y Born (2004) mostraron que la administración de fisostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, durante el sueño de ondas lentas en humanos deteriora la consolidación de la memoria. Es posible que una combinación de estos procesos pudiera afectar la formación de la memoria en nuestro modelo.

El resultado de este experimento nos sugirió modificar el modelo del AAO para analizar más a fondo los efectos de la galamina. Al ser un modelo de aprendizaje muy robusto, en el que con un solo ensayo se adquiere una fuerte aversión, era difícil demostrar mejorías con el bloqueo de M2, por lo cual decidimos ampliar el intervalo entre la presentación del olor y la inyección de LiCl para debilitar su asociación. Con este nuevo diseño inyectamos galamina entre los estímulos para probar si el aumento de liberación de ACh en el BO facilitaba el aprendizaje. Durante las pruebas piloto para determinar el intervalo adecuado, tuvimos resultados sumamente interesantes y no reportados previamente, que finalmente alcanzaron independencia y parte de ellos han sido publicados. Específicamente, encontramos que los estímulos pueden asociarse con intervalos tres veces mayores (hasta 60 min) que el actualmente aceptado (15 min), como revela la evaluación de la MCP. Sin embargo, por alguna razón desconocida, la aversión no se revela al evaluarse la prueba de MLP. En la segunda parte de esta tesis detallaré los resultados de estos experimentos,

pero para nuestro siguiente experimento decidimos probar la MCP para demostrar la asociación de estímulos.

Experimento 7. El bloqueo selectivo de receptores M2 del BO con galamina entre los estímulos en un diseño de AAO de asociación débil con intervalo interestímulos de 120 min, mejora la aversión.

Determinamos que con 60 min de intervalo entre los estímulos, estos aún se asocian para producir AAO, pero con 90 min ya no, así que decidimos el siguiente diseño experimental: dar la bebida con olor durante 10 min, esperar 60 min y administrar galamina a dosis de 15 μ g, esperar 60 min más e inyectar LiCl. Utilizamos 15 μ g porque con dosis mayores habíamos observado efectos secundarios no deseables. Esperamos 4 h a partir de la presentación del olor para probar la MCP. Como vemos en la gráfica 7, la galamina redujo el I.P. a cerca de 10 %, efecto significativo respecto al grupo control (prueba de t, $p < 0.05$).



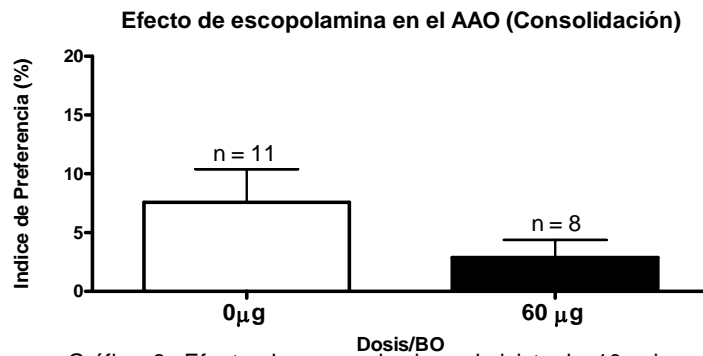
Gráfica 7. Efecto de galamina administrada 60 min después del estímulo olfativo y 60 min antes del LiCl. Prueba t, * $p < 0.05$. Se grafica media \pm E.E.

Bloqueo de receptores muscarínicos en la etapa de consolidación

Bloqueo general con escopolamina

Experimento 8. El bloqueo general de receptores muscarínicos con escopolamina no afecta la consolidación del AAO.

Para determinar si el bloqueo general de los receptores muscarínicos después de adquirir la información afecta su consolidación, se inyectó 60 µg de escopolamina 10 min después de la administración del LiCl. En la gráfica 8 se muestra que el I.P. del grupo tratado (3 %) no fue diferente del I.P. del grupo control (8 %) (prueba de t, $p > 0.05$).



Gráfica 8. Efecto de escopolamina administrada 10 min después del LiCl. Prueba de t, sin diferencias. Se grafica media \pm E.E.

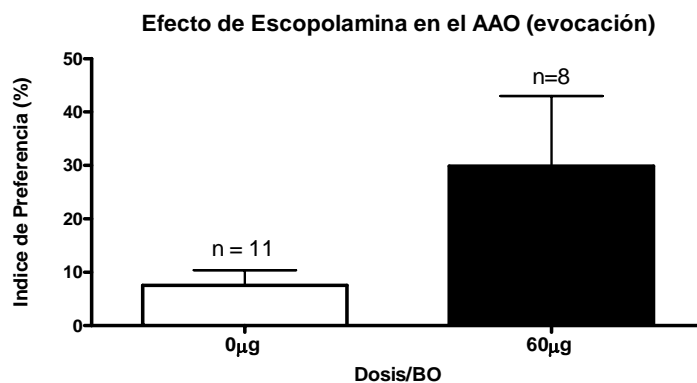
En contra de nuestra hipótesis y de reportes previos (Jerusalinsky y cols, 1997; Wolf, 1998), no encontramos afectada la fase de consolidación por la administración de escopolamina, por lo cual decidimos no probar más fármacos en esta etapa.

Bloqueo de receptores muscarínicos en la etapa de evocación

Bloqueo general con escopolamina

Experimento 9. El bloqueo general de receptores muscarínicos con escopolamina no afecta la evocación del AAO.

Se administró escopolamina a dosis de 60 µg/µl/BO 10 min antes de la prueba de evocación. A pesar de observarse una tendencia a disminuir la aversión, el resultado no fue significativo estadísticamente (prueba de t, $p > 0.05$) (gráfica 9).

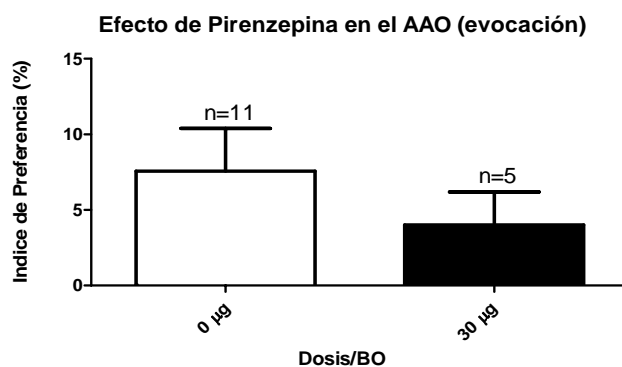


Gráfica 9. Efecto de Escopolamina administrada 10 min antes de la evocación. Se realizó prueba de t, sin resultado significativo ($p>0.05$). Se grafica media \pm E.E.

Bloqueo selectivo de receptores M1 con pirenzepina

Experimento 10. El bloqueo selectivo de receptores M1 con pirenzepina no afecta la evocación del AAO

Debido a la tendencia observada con la administración de escopolamina, decidimos probar el efecto de 30 µg de pirenzepina en la evocación. En la gráfica 10 se observa que no hubo diferencia respecto al control (prueba de t, $p>0.05$) y que, contrario a la tendencia con escopolamina, el I.P. se mantuvo reducido.



Gráfica 10. Efecto de pirenzepina administrada 10 min antes de la evocación. Prueba de t, sin diferencias significativas ($p>0.05$). Se grafica media \pm E.E.

Discusión

Son dos los hallazgos principales de esta parte de nuestra investigación: el primero es que la neurotransmisión colinérgica del BO mediada por receptores muscarínicos, principalmente M1, es necesaria para la fase de adquisición, pero no para la consolidación ni para la evocación de la memoria (aunque esta interpretación será comentada sobre la base de evidencias adicionales en la segunda parte), en el modelo de AAO; el segundo es que el bloqueo de receptores M2 facilita el aprendizaje en un modelo de AAO de asociación débil generado por el aumento del intervalo interestímulos.

Los receptores muscarínicos del BO participan en la adquisición del AAO, pero no en su consolidación ni en su evocación.

Nuestros resultados concuerdan con las descripciones de la literatura general sobre la participación de los receptores muscarínicos en procesos de aprendizaje y memoria (para una revisión reciente, ver Hasselmo y Sarter, 2011). Una buena cantidad de estudios, incluyendo algunos en el condicionamiento de aversión gustativa, modelo similar al AAO, demuestran que el bloqueo muscarínico con escopolamina deteriora el aprendizaje, pero no afecta la evocación de aquellas memorias previamente almacenadas (Hasselmo, 2006; Lucas-Meunier y cols, 2003; Berman y Dudai, 2001; Miranda y Bermúdez Rattoni, 1999; Naor y Dudai, 1996; Orsetti y cols, 1996; Inglis y cols, 1994; Shipley y Ennis, 1996).

En el condicionamiento de aversión gustativa se ha demostrado que diversas manipulaciones antagonistas de la actividad colinérgica previas al estímulo gustativo impiden el aprendizaje, pero no tienen efecto cuando se realizan posteriormente. Así, la inactivación de Ch4 (núcleo colinérgico que inerva a la corteza insular) con tetrodotoxina previa a la estimulación gustativa impide la aversión, mientras que la inactivación previa a la evocación no afecta este proceso (Miranda y Bermúdez Rattoni, 1999). De igual forma, la administración local de escopolamina (30µg) en corteza insular previa al estímulo gustativo impide la aversión mientras que la misma dosis administrada en el intervalo interestímulos (después del estímulo gustativo, pero antes del estímulo aversivo) o antes de la evocación no tiene ningún efecto (Naor y Dudai, 1996). El mismo patrón amnésico de escopolamina encontramos en el AAO. El bloqueo general de receptores muscarínicos del BO con 60 µg/BO de escopolamina previo a la presentación de los

estímulos disminuyó la aversión al olor condicionado, aumentando el I.P. a 62 %, valor estadísticamente igual al del control sin condicionamiento de 50 % (experimento 2). Este efecto no se produjo con la administración posterior al estímulo olfativo (experimento 3).

Debido a que el deterioro del aprendizaje se limita a la administración de los fármacos previa a la presentación del olor, lo primero que debemos descartar es un efecto sobre la capacidad de procesamiento sensorial. Ya que sabemos que una de las funciones de la ACh es incrementar el contraste de la señal olfativa por activación de las interneuronas GABAérgicas del BO, refinando la discriminación de diferentes odorantes (Saghatelyan y cols, 2003; Davis, 2004), sería fácil suponer que los sujetos fueron incapaces de procesar adecuadamente el estímulo olfativo. Nosotros pensamos que no fue el caso por dos razones: primero, en nuestros experimentos de evocación, en los cuales administramos escopolamina o pirenzepina a las dosis efectivas en la adquisición (60 y 30 μg respectivamente), no se afectó el desempeño de los sujetos, por lo cual concluimos que fueron capaces de discriminar entre el olor seguro y el olor condicionado; segundo, investigaciones previas indican que los animales son capaces de discriminar entre varios estímulos olfativos con administración sistémica de escopolamina o daño a las vías colinérgicas del BO previos a la tarea. Por ejemplo, Lévy y cols (1997) observaron que la administración sistémica de escopolamina en ovejas no afectaba el rechazo de alimento contaminado con heces de perro. Por su parte, Wirth y cols (2000) lesionaron las vías colinérgicas que inervan al BO con IgG-saporina y probaron la discriminación entre olor de avellana y de vainilla, sin observar deterioro. En una tarea de igualdad retrasada a la muestra (delayed matching to sample) olfativa, Ravel y cols (1994), encontraron que la administración de escopolamina en el BO afecta la MCP sin deteriorar el reconocimiento entre los olores cineol e isoamil acetato. Se sabe que las ratas no pueden discriminar entre etil-esteres que difieren solo en un carbón, pero discriminan bien entre dos etil-esteres que difieren en 4 carbonos y un etil-ester y olor de menta, y que el condicionamiento aversivo de un etil-ester incrementa la discriminación hacia otro ester diferente solo en un carbón (Fletcher y Wilson, 2002). La administración de escopolamina previa al aprendizaje asociativo impide la discriminación entre esterres diferentes solo en un carbón, mientras que no la impide entre dos esterres que difieren en 4 carbonos o entre un ester y otra molécula (olor de menta) (Wilson y Fletcher, 2004). Por estas razones, pensamos que en nuestros experimentos el efecto de los fármacos no impidió la discriminación de los olores utilizados.

Diferentes autores han señalado la importancia de la liberación de ACh en los procesos específicos de alertamiento y atención ante la estimulación sensorial. Con especial interés debemos señalar que la estimulación táctil, visual, auditiva y olfativa incrementa la liberación de ACh en las cortezas sensoriales respectivas, así como en el hipocampo (Pepeu y Giovannini, 2004; Fournier y cols, 2004; Miranda y cols, 2000; Orsetti y cols, 1996; Inglis y Fibiger, 1995; Shimura y cols, 1995; Inglis y cols, 1994). Específicamente, en el condicionamiento de aversión gustativa se ha demostrado por microdiálisis que la estimulación gustativa incrementa la liberación de ACh en la corteza insular de forma inversamente proporcional al grado de novedad del estímulo, es decir, a mayor familiaridad del sujeto con el estímulo (más presentaciones) menor liberación de ACh (Miranda y cols, 2000; ver figura 12). Inclusive se ha demostrado que el condicionamiento con un sabor familiar es menos efectivo (no disminuye significativamente el consumo del sabor condicionado en exposiciones subsecuentes) que con un sabor nuevo (Berman y Dudai, 2001), lo cual sugiere que la elevación de ACh es necesaria para el aprendizaje.

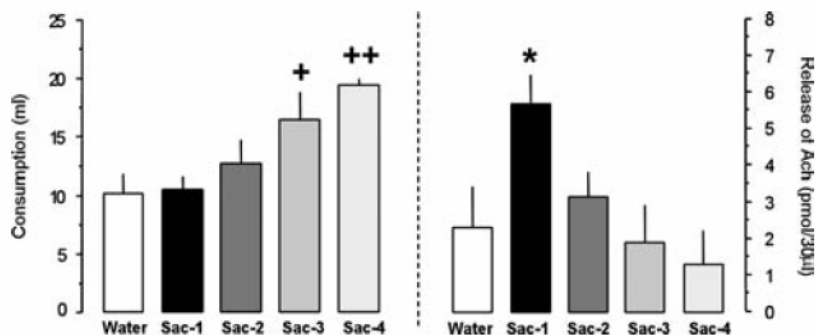


Figura 12. En el lado izquierdo se muestra el consumo de agua en ml durante la presentación de agua (estímulo conocido) o una solución de sacarina (estímulo nuevo Sac-1 y luego conocido en Sac2-Sac4) en varias ocasiones. Del lado derecho se muestra la liberación correspondiente a cada presentación del sabor de ACh en corteza insular medida por microdiálisis. Se observa que la liberación disminuye conforme el estímulo se vuelve conocido. Tomado de Miranda y cols, 2000.

Es de suponer que el mismo patrón de liberación de ACh sucede en el BO ante la presentación de un estímulo olfativo nuevo. De hecho, existe una conexión directa del BO al núcleo colinérgico que lo inerva (Ch3), de tal manera que la liberación de ACh en el BO es, por lo menos parcialmente, regulada por la estimulación olfativa misma (Linster y cols, 2000). De tal manera, suponemos que en nuestros experimentos el bloqueo de receptores muscarínicos con escopolamina o pirenzepina previa a la estimulación olfativa, anticipa y evita el efecto

colinérgico del alertamiento y la atención necesarios para desencadenar el aprendizaje y la subsecuente memoria.

En el BO, los receptores M1 median la adquisición del AAO.

Los efectos amnésicos de pirenzepina (bloqueo selectivo de receptores muscarínicos M1) siguieron el mismo patrón observado con escopolamina, donde la administración previa al estímulo olfativo pero no después, de 30 μ g, aumentó el I.P. a 42 %, (experimentos 4 y 5), muy cercano al 50 % del grupo sin condicionamiento. La magnitud del efecto logrado con pirenzepina respecto al bloqueo general con escopolamina (I.P. 62 %) nos hace pensar que los receptores M1 son los principales mediadores durante la etapa de adquisición de la información olfativa.

En acuerdo con nuestro resultado, está reportado que el bloqueo de receptores M1 con pirenzepina disminuye la inducción de potenciación de largo plazo (mecanismo celular propuesto como subyacente a la generación de memoria) en el circuito amígdala basolateral-corteza insular, y conductualmente evita la aversión, en el condicionamiento de aversión gustativa (Escobar y cols, 1998; Escobar y Bermúdez Rattoni, 2000), sin afectar la evocación en sujetos condicionados previamente. Por su parte, el bloqueo de los presinápticos tipo M2 con AF DX-116 incrementa la liberación de ACh en la corteza insular, pero no tiene efecto sobre la potenciación de largo plazo ni afecta la adquisición (Ramírez-Lugo y cols, 2003).

Estudios *in vitro* sobre la participación de los receptores M1 y M2 en el BO confirman efectos similares a los reportados en corteza insular. Pressler y cols (2007) muestran que la aplicación de carbacol (agonista colinérgico, 2 μ M) durante la estimulación fásica lenta (2.5 Hz) de células granulares del BO aumenta su frecuencia de disparo y el tiempo que permanecen en estado cuasidespolarizado (hasta 2 min), y por consiguiente aumenta la inhibición de células mitrales. Así mismo, el bloqueo selectivo de receptores M1 con pirenzepina (10 μ M), pero no de receptores M2 con AF-DX 116, bloquea el efecto inducido por carbacol. Pressler y cols sugieren que la excitabilidad sostenida de las células granulares mediada por los receptores M1 podría contribuir a la generación de la MCP olfativa, sugerencia que a la luz de nuestros resultados cobra relevancia. En 2008, Inoue y Strowbridge amplían las evidencias de Pressler y cols, coincidiendo en que la estimulación de receptores muscarínicos con carbacol mantiene la excitabilidad de las células granulares solo bajo estimulación oscilatoria subumbral lenta (5 Hz), similar al patrón natural oscilatorio de 2-5 Hz del BO generado durante la conducta de olfateo.

Los autores proponen que la actividad sostenida de las células granulares es mediada *in vivo* por las eferencias colinérgicas centrales que se activan en el proceso de atención olfativa y sirve para coordinar la actividad de subpoblaciones neurales en el BO y la salida de información de las células mitrales. Tanto Pressler como Inoue muestran evidencias de que la actividad persistente de las células granulares ocurre por corrientes catiónicas dependientes de Ca^{++} de bajo umbral (Pressler y cols, 2007; Inoue y Strowbridge, 2008).

El mantenimiento de la información olfativa, así como la asociación con el estímulo aversivo son independientes de la actividad muscarínica del BO en el AAO.

Con respecto a la falta de efectos del bloqueo de receptores muscarínicos del BO durante el intervalo interestímulo en el AAO, existen reportes de efectos similares en el aprendizaje de aversión gustativa. La administración de escopolamina (30 μg) en corteza insular previa al estímulo gustativo impide la generación de la aversión mientras que la misma dosis administrada en el intervalo interestímulo no tiene ningún efecto (Naor y Dudai, 1996). Es posible que una vez que la estimulación sensorial incrementa la liberación de ACh en la corteza correspondiente (en este caso el BO), la activación de los receptores muscarínicos permita la codificación de la información o de la “señal de almacenamiento” para instruir a los circuitos necesarios para la codificación a largo plazo, como Naor y Dudai (1996) sugieren. Los posibles mecanismos o “señales de almacenamiento” pueden ser los descritos por Pressler y cols (2007) y por Inoue y Strowbridge (2008), en donde la hiperexcitabilidad de las células granulares del BO, con la consecuente inhibición de células mitrales, se mantiene hasta por dos minutos. Otra posibilidad es que en el BO exista un mecanismo de tipo potenciación de largo plazo dependiente de M1, parecido al encontrado por Ramírez Lugo y cols (2003) en la corteza insular, el cual se ve afectado por la administración de pirenzepina antes del entrenamiento, con el correlato de disminución de la aversión en el modelo de aversión gustativa. En el hipocampo de rata se ha descrito la existencia de una potenciación largo plazo dependiente de receptores muscarínicos inducida por carbacol (0.5 μM), la cual se presenta lentamente, pero se mantiene largo tiempo, (Auerbach y Segal, 1996; Segal y Auerbach, 1997; Li y cols, 2007). El mantenimiento de este tipo de potenciación parece ser independiente de la actividad muscarínica, pues se mantiene más de 30 min después de que el carbacol es removido del medio (Segal y Auerbach, 1997). Procesos parecidos podrían actuar a nivel de sinapsis dendrodendríticas entre interneuronas granulares y

mitrales del BO. Recientemente Gao y Strowbridge (2009) mostraron un tipo de potenciación de largo plazo, de casi media hora de duración, en las sinapsis excitadoras provenientes de la corteza piriforme hacia las dendritas de las células granulares del BO, dependiente de receptores NMDA a glutamato, por estimulación en la frecuencia beta/gama (20 Hz) similar a la generada por la corteza piriforme in vivo y promovida por la estimulación olfativa. Este mecanismo podría mantener el procesamiento de la información olfativa entre el BO y la corteza piriforme, de tal manera que los receptores muscarínicos del BO serían innecesarios para asociar el estímulo aversivo o para consolidar la memoria. Otro mecanismo que podría explicar nuestro resultado es a través de la liberación de norepinefrina en el BO por heteroreceptores muscarínicos presinápticos de terminales adrenérgicas (El-Etri y cols, 1999) y la inducción de potenciación de largo plazo en sinapsis dendrodendríticas de neuronas granulares y mitrales, de forma similar a la descrita en estudios *in vitro* por Zhang y cols (2010).

Por otro lado, parece que la actividad colinérgica sostenida no es necesaria para la codificación del estímulo doloroso ni para la asociación de estímulos, como también ocurre en el condicionamiento de aversión gustativa (Berman y Dudai, 2001; Gutiérrez y cols, 2003). Es probable que estos eventos ocurran independientemente de receptores muscarínicos en el BO, o que sucedan en estructuras como la Ami (Jerusalinsky y cols, 1997; Desgranges y cols, 2008) o la corteza piriforme posterior (Rainecki y cols, 2009), en donde se han reportado cambios a consecuencia de diferentes modelos de aprendizaje de aversión olfativa, incluyendo al LiCl como estímulo incondicionado. Se ha sugerido que la actividad del BO indica la relevancia del estímulo y la Ami o la corteza piriforme posterior podrían codificar su valor hedónico (Rainecki y cols, 2009).

El bloqueo de receptores M2 previo a la estimulación olfativa deteriora el aprendizaje del AAO a través de mecanismos inespecíficos.

En el caso de galamina (bloqueo de receptores muscarínicos M2) se observó pérdida significativa de la aversión con 30 µg administrados antes del estímulo olfativo (I.P. 43 %, gráfica 6). Sin embargo, a partir de la dosis de 22.5 µg aparecieron severos efectos colaterales, como hipersalivación, contracciones de la musculatura facial, temblores generalizados, desorientación, etc., por lo cual no pudimos atribuir un efecto específico de los receptores M2 sobre los procesos cognitivos. No conocemos el mecanismo exacto a través del cual el aumento de los niveles de

ACh en el BO afectó el AAO, ni podemos explicar los signos sistémicos de nuestra administración local, sin embargo, se sabe que la administración sistémica o directa de nicotina en la arteria carótida interna en ratas, produce vasodilatación de los vasos sanguíneos del BO con el consiguiente aumento del flujo sanguíneo (Shiba y cols, 2006). Es posible que los altos niveles de ACh producidos por la galamina, activaran a los receptores nicotínicos, aumentando el flujo sanguíneo y permitiendo la interacción de la ACh del BO con otras estructuras y vías de neurotransmisión del cerebro. Por otro lado, se sabe que la administración sistémica de inhibidores de la enzima que degrada ACh (acetilcolinesterasa), produce convulsiones y depleción de norepinefrina en el BO (El-Etri y cols, 1999). Así mismo, la aplicación local de ACh en el BO aumenta la liberación de norepinefrina (El-Etri y cols, 1999). También se sabe que la aplicación de agonistas colinérgicos, como el carbacol o la oxotremorina, en el septo hipocampal afecta el aprendizaje de tareas espaciales en el laberinto radial (Bunce y cols, 2004). A pesar de que experimentalmente se ha probado la mejoría de la actividad hipocampal por aplicación de colinomiméticos en ratas viejas o cognitivamente comprometidas, se ha sugerido que en ratas jóvenes transforma la actividad normal teta del hipocampo en una actividad epileptiforme, lo cual llevaría al deterioro cognitivo (Wallenstein y Hasselmo, 1997). Adicionalmente Gais y Born (2004) mostraron que la administración de fisostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, durante el sueño de ondas lentas en humanos deteriora la consolidación de memorias declarativas. Estos mecanismos nos parecen los mejores candidatos para explicar el efecto deletéreo del antagonismo de M2, sin embargo, existen evidencias de la localización de estos receptores en interneuronas dopaminérgicas y GABAérgicas inervadas por las neuronas sensitivas olfatorias (Crespo y cols, 2000). Los autores sugieren que la activación de M2 podría facilitar, a través de circuitos dopaminérgicos, la fuerza del ingreso sensorial hacia las neuronas mitrales y la transmisión de la señal del BO hacia centros superiores, de tal manera que su bloqueo produciría los efectos contrarios.

El bloqueo de receptores M2 durante el intervalo interestímulos facilita el aprendizaje en un modelo de AAO de asociación débil (intervalo interestímulos de 120 min).

La administración de galamina entre los estímulos, mejoró el aprendizaje en el diseño de AAO con intervalo interestímulos de 120 min (gráfica 7). Creemos que este efecto se explica por el mantenimiento alto de los niveles de ACh, de tal manera que la información olfativa se mantuvo

suficiente tiempo para ser asociada con el malestar gastrointestinal. Es posible que la liberación de ACh por la estimulación olfativa decayera para el momento de la aplicación de galamina (60 min, Shimura y cols, 1995), de tal manera que una segunda liberación provocada por el fármaco fuera la responsable de permitir el aprendizaje asociativo. En acuerdo con nuestra explicación, se sabe que el bloqueo de receptores M2 con diversos fármacos aumenta los niveles de ACh en varias regiones del cerebro y mejora la memoria. La administración sistémica de AF DX-116 (antagonista M2) después del entrenamiento en un laberinto radial mejora la memoria (Packard y cols, 1990) y administrado por microdiálisis en la corteza prefrontal de ratones incrementa los niveles de ACh (Douglas y cols, 2001; Douglas y cols, 2002). La administración vía sistémica de BIBN-99, otro antagonista M2, aumenta la liberación de ACh en hipocampo en ratas viejas con deterioro cognitivo (24 – 25 meses), así como en jóvenes (3 – 6 meses) tratadas con escopolamina para inducirles amnesia (Quirión y cols, 1995) y revierte el deterioro cognitivo (evaluado por tiempo de resolución de laberinto acuático de Morris) al nivel de sujetos control. Debido a que se ha demostrado que drogas colinomiméticas inhiben la liberación de glutamato a través receptores M2 se piensa que la mejoría cognitiva lograda con BIBN-99 podría deberse a la facilitación de liberación de glutamato (Quirión y cols, 1995). Aunque el mecanismo exacto no se conoce, se sabe que en hipocampo M2 es presináptico en las terminales axónicas de la vía perforante (glutamatérgica) y de la vía asociativa (aquí en células GABAérgicas), sugiriendo una función moduladora de la liberación de glutamato (o GABA) (Rouse y cols, 1999). Usando ratas anestesiadas, Li y cols (2007) mostraron que el bloqueo de receptores presinápticos M2 con metoctramina administrada vía intraventricular mejora la excitabilidad del circuito CA3-CA1, cuya persistencia aparentemente es independiente de receptores nicotínicos y NMDA a glutamato, pero se ve impedida por el bloqueo de receptores M1 y M3 con telenzepina o 4-DAMP (Li y cols, 2007). Los autores proponen que el bloqueo de los autoreceptores M2 promueve la liberación endógena de ACh y la consecuente activación de los postsinápticos (M1) que a su vez desencadenaría los mecanismos necesarios para la mejoría sináptica a través de la producción de IP₃ y subsecuente liberación de Ca⁺⁺ desde depósitos intracelulares. Sin embargo no excluyen la posibilidad de que sus observaciones se deban al bloqueo de heteroreceptores M2 localizados en terminales glutamatérgicas, llevando al aumento de liberación de glutamato y la actividad de receptores no NMDA (Li y cols, 2007). La administración intraventricular de metoctramina (2 µg) también mejora el desempeño de ratas en una tarea de no correspondencia

de lugar con retraso (delay non-matching to position task), tarea útil para evaluar memoria de corto plazo (Aura y cols, 1997). Las ratas cometen menos errores en los tiempos más largos de retraso usados, lo cual indica mejora de aprendizaje y memoria de corto plazo (Aura y cols, 1997). Una explicación más sencilla correspondería con la evidencia comentada en el apartado anterior, en la que la activación de receptores M2 podría facilitar, a través de circuitos dopaminérgicos, la fuerza del ingreso sensorial hacia las neuronas mitrales y la transmisión de la señal del BO hacia centros superiores (Crespo y cols, 2000).

Los receptores muscarínicos del BO no participan en la consolidación del AAO.

El bloqueo en la fase de consolidación (inmediatamente después del estímulo incondicionado) con escopolamina no produjo efectos significativos sobre el AAO. Este resultado sugiere que los receptores muscarínicos del BO no son necesarios para la fase de consolidación, sin embargo, haremos consideraciones adicionales en la segunda parte de esta tesis. En la literatura existen reportes sobre su participación en los procesos de consolidación, en otras estructuras. Se ha descrito que la administración de escopolamina vía sistémica, o directamente en la Ami, en el septo medial o en el hipocampo, poco tiempo después del entrenamiento causa amnesia en el paradigma de evitación pasiva (step-down inhibitory avoidance) (Jerusalinsky y cols, 1997), lo cual sugiere que la neurotransmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos es necesaria para la consolidación. La participación de la Ami en la consolidación del AAO también está descrita. La administración de anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) en la Ami previa al condicionamiento afecta la formación de la memoria, pero no tiene efecto cuando se administra inmediatamente después del entrenamiento (Desgranges y cols, 2008). Sin embargo, en este trabajo se evaluó la MCP del AAO (4 h después de la adquisición), mostrándose intacta, mientras que la MLP (3 días después de la adquisición) estaba deteriorada, por lo cual los autores sugieren que la Ami es importante para la consolidación de la memoria. Es muy probable que la participación de ACh durante la consolidación involucre primordialmente a la Ami, que se considera una estructura moduladora de la memoria. Nuestros resultados concuerdan con los reportes que niegan la participación de ACh en la consolidación, en los que se refieren a estructuras corticales sensitivas primarias, tales como la corteza insular, cuya participación en los aprendizajes asociativos es más parecida a la correspondiente participación del BO en el AAO. Otra estructura viable, en la que la transmisión colinérgica podría modular la consolidación del

AAO es la corteza piriforme posterior, en donde se han reportado cambios como consecuencia de diferentes modelos de aprendizaje de aversión olfativa, incluyendo al LiCl como estímulo incondicionado (Rainecki y cols, 2009).

El bloqueo con escopolamina o con pirenzepina no afectó la evocación del AAO.

La administración de escopolamina (60 µg) o pirenzepina (30 µg) en el BO no afectó la evocación del AAO, lo cual sugiere que los receptores muscarínicos, especialmente los M1, de esta estructura no participan en la evocación. Nuestros resultados son similares a los reportados para el aprendizaje de aversión gustativa, en los que la administración de escopolamina (30µg) en corteza insular previa a la evocación no tiene ningún efecto (Naor y Dudai, 1996). Sin embargo, existen demostraciones del aumento en la liberación de ACh durante la evocación de estímulos previamente condicionados, ya sea por asociación positiva (Inglis y cols, 1994) o negativa (Shimura y cols, 1995; Acquis y cols, 1996). En este sentido Inglis y cols (1994; 1995) proponen que existe un componente de liberación de ACh relacionado a la evocación de experiencias previas, que promueve la liberación de ACh en corteza frontal, aunque no en hipocampo. Cabe aclarar que esta liberación no se demuestra en la corteza sensorial primaria correspondiente, lo cual sugiere papeles diferenciales de estructuras durante la evocación. Por su parte, Shimura y cols (1995) encuentran que el incremento de la liberación de ACh en la corteza insular durante la estimulación con un sabor previamente condicionado, es del doble respecto al aumento con un sabor nuevo (ver figura 13). Tal incremento podría señalar la relevancia del estímulo cuando representa un peligro conocido. Esta evidencia plantea la posibilidad de que las dosis de escopolamina y pirenzepina utilizadas en nuestros experimentos no hayan sido suficientes para antagonizar las cantidades extras de ACh liberadas durante la evocación. Otra posibilidad es que en esta etapa la ACh medie sus efectos a través de receptores nicotínicos y no muscarínicos (Gauthier, 2010; Rezayof y cols, 2008).

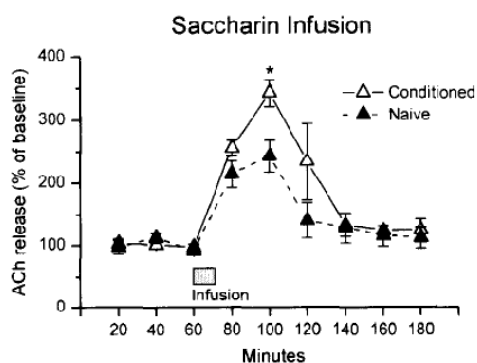


Figura 13. Incremento en la liberación de ACh en la corteza insular como resultado de la infusión oral de un estímulo gustativo. Se muestra un mayor incremento cuando los animales ya fueron condicionados aversivamente al sabor. Tomado de Shimura y cols, 1995.

Conclusiones

En esta primera parte de nuestra investigación, los resultados mostraron que en el AAO los receptores muscarínicos, especialmente M1, del BO participan en la adquisición de la información olfativa, pero no en la adquisición del malestar visceral ni en la asociación de estímulos, ni tampoco en la consolidación de la memoria o en su evocación. Apoyados en evidencias previas que muestran que la administración sistémica, o la inyección directa en el BO, de escopolamina afecta la MCP pero no la discriminación de los olores (Wilson y Fletcher, 2004; Wirth y cols, 2000; Lévy y cols, 1997; Ravel y cols, 1994;), así como en nuestros resultados en los que la administración de escopolamina o pirenzepina previa a la evocación no afectan la discriminación de los olores en el AAO, concluimos que el procesamiento sensorial no se vio afectado. La interpretación más plausible es que los receptores muscarínicos M1, por un mecanismo de hiperexcitabilidad sostenida de interneuronas granulares por corrientes catiónicas dependientes de Ca^{++} , regulan el funcionamiento de redes neurales a nivel de las sinapsis recíprocas dendrodentríticas con las neuronas mitrales, lo cual permite la formación de MCP del olor. Una vez que la ACh liberada al BO produce los efectos necesarios para generar el AAO a través de sus receptores muscarínicos, los procesos que mantienen la codificación de la información parecen independientes de la actividad muscarínica del BO, pues la administración posterior a la estimulación olfativa de los diferentes antagonistas empleados no tiene efectos sobre la asociación de estímulos, ni sobre la consolidación ni la evocación de la memoria.

Tomados en conjunto, los resultados de nuestra investigación respecto al papel de los receptores muscarínicos del BO en el AAO concuerdan con los estudios de Ramírez-Lugo y cols (2003), Escobar y Bermúdez Rattoni (2000), Miranda y cols (2000), Miranda y Bermúdez Rattoni (1999), Escobar y cols (1998) y Naor y Dudai (1996) en el condicionamiento de aversión gustativa.

En el AAO, las principales funciones de los receptores muscarínicos a ACh del BO son: la codificación de una MCP para el olor, mediada por receptores M1, relacionada con el incremento de liberación de ACh en el BO durante la olfacción atenta del estímulo nuevo, lo cual puede facilitar la codificación de la información o dar la “señal de almacenamiento” para instruir a los circuitos necesarios para la codificación a largo plazo, como previamente se ha sugerido (Naor y Dudai, 1996; Raineiki y cols, 2009). Los receptores muscarínicos del BO no son necesarios para

la codificación del estímulo doloroso ni para la asociación de estímulos, tal como se ha sugerido respecto a su papel en la corteza insular en el condicionamiento de aversión gustativa (Berman y Dudai, 2001; Gutiérrez y cols, 2003), ni para la evocación del aprendizaje.

Con respecto a nuestras hipótesis, concluimos lo siguiente:

Hipótesis general.

Los receptores muscarínicos del BO son necesarios para el aprendizaje y formación de la memoria del AAO.

Confirmamos que la neurotransmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos del BO es necesaria para el aprendizaje y formación de la memoria del AAO.

Hipótesis específicas para M1:

- Su bloqueo antes de la adquisición de la información impide el AAO.
- Su bloqueo entre estímulos no afecta el AAO.
- Su bloqueo en la fase de consolidación no afecta la formación de la memoria del AAO.
- Su bloqueo no afecta la evocación de la memoria del AAO.

El bloqueo de receptores muscarínicos M1 del BO con la administración directa de pirenzepina (30 µg/µl/BO) antes de la adquisición del estímulo olfativo evita el AAO. Específicamente, sugerimos que se evita la formación de MCP del olor, sin deteriorar la percepción.

El bloqueo de receptores muscarínicos M1 del BO con la administración directa de pirenzepina (30 µg/µl/BO) entre los estímulos, después de los estímulos o previa a la evocación no evita la asociación, la consolidación, ni la evocación del AAO.

Hipótesis específicas para M2:

- Su bloqueo antes de la adquisición de la información facilita el AAO.

- Su bloqueo entre no afecta el AAO.
- Su bloqueo en la fase de consolidación no afecta la formación de la memoria del AAO.
- Su bloqueo no afecta la evocación de la memoria del AAO.

El bloqueo de receptores muscarínicos M2 del BO con la administración directa de galamina (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{BO}$) antes de la adquisición del estímulo olfativo evita el AAO al aumentar la liberación de ACh, lo cual activa mecanismos no específicos sobre los procesos de memoria.

El bloqueo de receptores muscarínicos M2 del BO con la administración directa de galamina (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{BO}$) entre los estímulos en un diseño modificado de AAO con intervalos interestímulos largos (120 min) facilita el AAO.

Debido a que no tuvimos oportunidad de probar el efecto del bloqueo de receptores M2 en la consolidación ni en la evocación, no podemos concluir a este respecto.

SEGUNDA PARTE

EVALUACIÓN DE MEMORIAS DE CORTO Y DE LARGO PLAZOS EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO AL OLOR: ASOCIACIÓN DE ESTÍMULOS CON INTERVALOS INTERESTÍMULOS LARGOS Y FACILITACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN POR EVOCACIÓN DE LA MCP

Justificación de la segunda parte

Durante nuestra investigación sobre la participación de los receptores muscarínicos del BO en el AAO encontramos que el bloqueo de los receptores M2 por administración de galamina (22.5 – 30 µg) directamente al BO aumentó la liberación de ACh, inferencia basada en los signos observados (hipersalivación, contracciones de la musculatura facial, temblores generalizados, diarrea, desorientación) y en los reportes que indican que el bloqueo de estos receptores incrementa la liberación de ACh en diversas regiones cerebrales (Ramírez-Lugo y cols, 2003; Douglas y cols, 2002; Douglas y cols, 2001) y mejora la memoria (Packard y cols, 1990; Quirión y cols, 1995; Aura y cols, 1997). Por estas razones, decidimos probar si el antagonismo de receptores M2 con galamina administrada en el BO podría mejorar la asociación de estímulos por incremento de la liberación de ACh. Para analizar esta hipótesis modificamos el modelo de AAO, prolongando el intervalo interestímulos para disminuir la capacidad de asociación del olor con el malestar visceral.

Durante la búsqueda del intervalo idóneo para eliminar la asociación de estímulos, surgieron resultados imprevistos que nos llevaron a un análisis más extenso del modelo de AAO. Encontramos que la asociación de estímulos ocurrió a intervalos tres veces más largos (hasta 60 min) de lo que tradicionalmente se ha aceptado (<15 min). Este resultado apareció durante la evaluación de la MCP, mientras que en la evaluación de MLP fue igual a lo reportado previamente, usando grupos independientes. De tal manera que cuando se presenta el olor por 10 min durante el consumo de agua, se administra el LiCl 60 min después, y 4 h más tarde se prueba la memoria, hay aversión estadísticamente igual a la que se logra con un intervalo de 5 min. Por el contrario, cuando en el mismo diseño se prueba la memoria 48 h después del

condicionamiento, solo hay aversión con intervalos interestímulos menores que 15 min. Debido a la relevancia de estos resultados para la interpretación del AAO, así como del aprendizaje y la memoria en general, se completó un estudio paramétrico sobre las condiciones en que ocurre este fenómeno y se publicó por separado (Tovar-Díaz y cols. *Physiol Behav* 2011; 103(2):144-7).

Adicionalmente, encontramos que los grupos condicionados con intervalos interestímulos de 5 – 60 min que fueron probados previamente en MCP, seguían teniendo aversión en la MLP, efecto que hemos descrito como “facilitación de la consolidación por reactivación de la MCP”. Aún más, al repetir algunos de los experimentos clave de la primera parte para corroborar el efecto amnésico de escopolamina y pirenzepina, fuimos sorprendidos al encontrar que la evocación de MCP previene los efectos amnésicos de la escopolamina y la pirenzepina administradas antes del condicionamiento, pues hubo aversión tanto en MCP como en MLP.

Antecedentes

El AAO ocurre cuando el olor de un alimento se asocia con las consecuencias nocivas derivadas de su ingestión, tales como náusea, vómito o malestar gastrointestinal. El sujeto así condicionado evitará consumir nuevamente el alimento nocivo al reconocerlo por su olor. Debido a la secuencia en que se presentan los estímulos, se considera que el AAO es un tipo de condicionamiento clásico.

Uno de los factores que afectan a todo condicionamiento clásico es el intervalo interestímulos, el cual se refiere al tiempo que transcurre entre la percepción de los estímulos que serán asociados. Como regla general, cuanto mayor sea el intervalo, más débil será la asociación de los estímulos (Bermúdez Rattoni y Prado Alcalá, 2001). En el caso del AAO se ha descrito que el intervalo interestímulos debe ser menor a 15 min para que el olor se asocie con el malestar gastrointestinal, pues a intervalos mayores no se observa aversión (Hankins y cols, 1973; Palmerino y cols, 1980; Ferry y cols, 1995; Ferry y cols, 1996; Ferry y Di Scala, 1997; Ferry y cols, 2006; Chapuis et al, 2007).

Sin embargo, hemos de mencionar que las conclusiones sobre la asociación de estímulos en el AAO se han basado en pruebas realizadas 48 h después del condicionamiento, por lo cual han evaluado solamente la MLP. Puede ocurrir que un aprendizaje genere MCP, un tipo de memoria que a las pocas horas se pierde, sin consolidarse en MLP (Bailey y cols, 1996; Salamon 2002;

Bouton y Moody 2004). Por lo tanto, una evaluación realizada 48 h después del condicionamiento sólo detecta la carencia de MLP, dejando abierta la posibilidad de que la asociación haya ocurrido y formado MCP que no se consolidó en MLP. La forma más estricta de saber si la asociación ocurrió, es evaluando la MCP. Como se mencionó, los estudios sobre la tolerancia de asociación a intervalos largos en el AAO solo han mostrado la MLP sin ocuparse de la MCP.

De tal manera, decidimos buscar el intervalo máximo de asociación de estímulos del AAO evaluando la MCP.

Metodología

Sujetos

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 300 g, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina-UNAM. Se mantuvieron dos ratas por cada caja en el bioterio del laboratorio con agua y alimento *ad libitum* (Rodent Laboratory Chow, Purina, México) y un ciclo luz/oscuridad de 12/12 h.

Caja de condicionamiento

Se utilizó una caja de forma rectangular (largo 50 x ancho 40 x alto 18 cm), de polimetilmetacrilato (Plexiglas). En las paredes de los extremos se perforaron sendos agujeros de 2 cm de diámetro, a 10 cm de alto del piso de la caja. En posición paralela a la parte interna de las paredes perforadas se instaló una pipeta graduada, con capacidad para 35 ml. La boca de la pipeta quedó a la altura del agujero perforado y a 1.5 cm de la pared, de tal forma que al beber, la nariz de la rata quedara cerca del agujero.

Estímulos

Como estímulos olfativos se usaron esencias artificiales líquidas de vainilla y almendra (McCormick, D.F., México). Para presentar los estímulos olfativos se usaron tapas de plástico, de 3 cm de diámetro X 1.5 cm de alto, en cuyo interior se colocó un fondo de papel filtro sobre el cual se aplicó la esencia correspondiente. Como agente inductor de malestar gastrointestinal se

utilizó cloruro de litio (LiCl) (Sigma-Aldrich, Toluca, México) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.15 M.

Condicionamiento

Todos los experimentos iniciaron entre las 13:00 h y las 15:00 h, siguiendo el mismo método. Después de tres días de adaptación a las condiciones del bioterio del laboratorio, las ratas fueron privadas de agua durante un día completo. A partir de este momento, las ratas solo recibieron agua durante 10 min en la caja de condicionamiento y 10 min más en su caja hogar cuatro horas después. Las ratas se pesaron todos los días antes de recibir agua en la caja de condicionamiento.

Día 1: se les permitió beber agua durante 10 min y luego se les regresó a su caja hogar. Este día los sujetos conocen la caja de experimentación y aprenden a beber de las pipetas.

Día 2: se colocaron las tapas con papel filtro en ambos agujeros de la caja de condicionamiento, a las cuales se aplicaron 0.15 ml de esencia de vainilla, cinco min antes de meter a la rata. Se permitió a la rata beber durante 10 min y luego se le regresó a su caja hogar.

Día 3: se colocaron las tapas con papel filtro en ambos agujeros de la caja de condicionamiento, a las cuales se aplicaron 0.15 ml de esencia de almendra, cinco min antes de meter a la rata. Se permitió a la rata beber durante 10 min. Se esperó el intervalo necesario: 5, 15, 30, 60, 90 o 120 min, según el grupo experimental, para inyectar LiCl por vía i.p. Se inyectó un volumen correspondiente al 2 % del peso corporal de la rata. Un grupo control fue inyectado con solución salina 0.9 %. Después de la inyección se regresó a la rata a su caja hogar.

Cuatro horas después del periodo de bebida en la caja de condicionamiento, se realizó la prueba de MCP. Se preparó la caja de condicionamiento con olor de vainilla de un lado y con olor de almendra del otro. Se les permitió beber nuevamente durante 10 min, eligiendo libremente entre ambas pipetas. Se midió el volumen bebido en cada lado. Se obtuvo el índice de preferencia (I.P.) del olor condicionado (almendra) de la siguiente manera: $\text{ml bebidos de olor almendra} / (\text{ml bebidos de olor almendra} + \text{ml bebidos de olor vainilla}) * 100$.

Día 4: solo se les dio agua y se les permitió descansar en su caja hogar.

Día 5: se realizó la prueba de MLP de forma similar a la MCP. Se obtuvo el I.P. para el olor condicionado.

Análisis estadístico

Una vez obtenido el I.P. para el olor condicionado de cada sujeto, se promediaron como grupo y se ingresaron al programa Graph Pad Prisma versión 4 (San Diego, CA, USA) para análisis estadístico y generación de gráficos. Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnett, que compara todos los grupos contra el grupo control. Se graficaron las medias y errores estándar para cada grupo. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como criterio de diferencia significativa.

Resultados

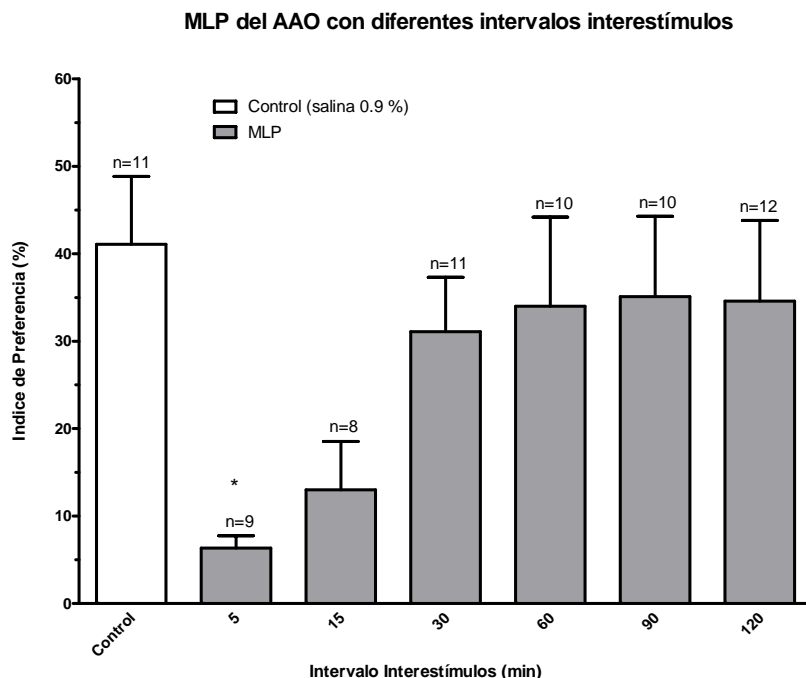
No hay aversión natural por los olores empleados.

El primer experimento se realizó como grupo control para demostrar que no hay aversión natural por alguno de los olores empleados. Se administró solución salina 0.9 % después del olor de almendra. Del consumo total, las ratas consumieron cerca del 42 % del olor de almendra (gráfica 11, barra blanca) y cerca del 58 % del olor de vainilla (no se muestra). Estadísticamente no hay diferencia significativa que indique aversión por alguno de los olores (prueba de t, $p > 0.05$). Este resultado concuerda con datos de trabajos previos (Ferry y cols, 1996; Ferry y Di Scala, 1997) y demuestra la conveniencia de emplear estos olores en el AAO, pues no hay predisposición natural que influya en el condicionamiento. El I.P. de almendra se usó para comparar a los grupos experimentales.

Experimento 11. No hay memoria aversiva de largo plazo al olor cuando el intervalo interestímulos supera los 15 minutos.

El objetivo de esta serie experimental fue comprobar que nuestro diseño experimental produce resultados similares a los que refiere la literatura cuando se evalúa la MLP del AAO. Se administró LiCl (0.15 M, 2 % del peso corporal) esperando 5, 15, 30, 60, 90 o 120 min, según el grupo experimental, después de la sesión de bebida con olor de almendra. 48 h después de la sesión de bebida se evaluó la MLP. Las pruebas estadísticas señalan, en concordancia con resultados de otros investigadores (Palmerino y cols, 1980; Ferry y cols, 1996; Chapuis y cols, 2007), que con un intervalo de 5 min se logra una aversión clara (prueba de ANOVA, seguida de Dunnett contra el control, $p < 0.05$), con un intervalo de 15 min solo aversión moderada, no

diferente estadísticamente respecto al control ($p > 0.05$), y con 30, 60, 90 y 120 min no hay aversión ($p > 0.05$) (gráfica 11, barras grises).

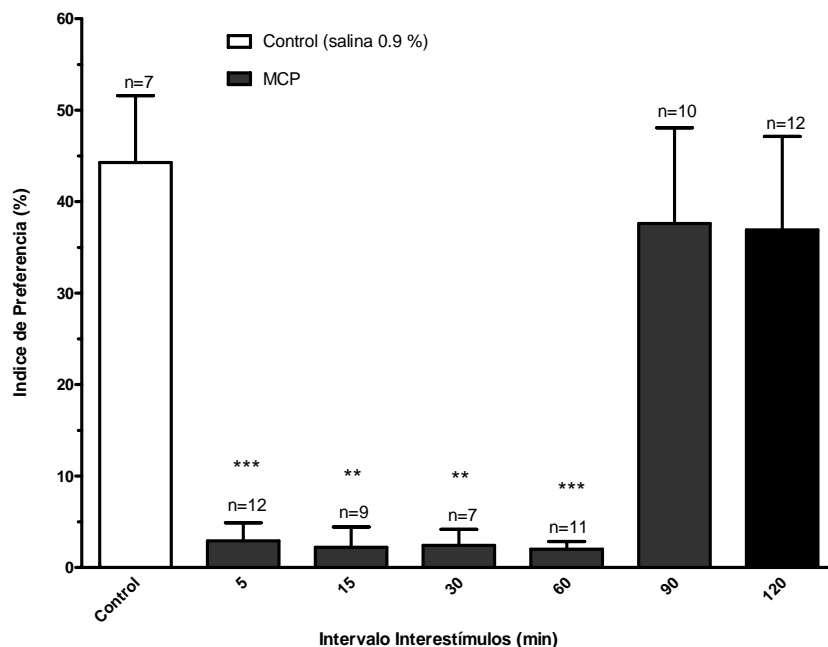


Gráfica 11. Evaluación de MCP del AAO (48 h después del olor) con diferentes intervalos interestímulo. Se permitió a las ratas beber agua en presencia de olor de almendra durante 10 min. Se administró LiCl después de 5, 15, 30, 60, 90 o 120 min (0.15 M, 2 % del peso corporal) por vía i.p. Prueba de ANOVA seguida de Dunnett, * $p < 0.05$. Se grafica media \pm EE.

Experimento 12. La presencia de memoria aversiva de corto plazo al olor indica asociación de estímulos aún con intervalos interestímulo de 60 minutos.

El objetivo de esta serie experimental fue hacer una evaluación estricta de la capacidad de asociación de los estímulos con diferentes intervalos interestímulo, a través de la evaluación de MCP del AAO. Se administró LiCl (0.15 M, 2 % del peso corporal) esperando 5, 15, 30, 60, 90 o 120 min, según el grupo experimental, después de la sesión de bebida con olor de almendra. Cuatro horas después de la sesión de bebida se evaluó la MCP. Los resultados muestran una diferencia clara respecto al grupo sin aversión con los intervalos de 5 ($p < 0.01$), 15 ($p < 0.01$), 30 ($p < 0.01$) y 60 ($p < 0.001$) min, pero no con 90 ni 120 min (gráfica 12). Estos resultados sugieren que hubo asociación del olor con el malestar provocado por el LiCl con intervalos interestímulo tan largos como 60 min.

MCP del AAO con diferentes intervalos interestímulos



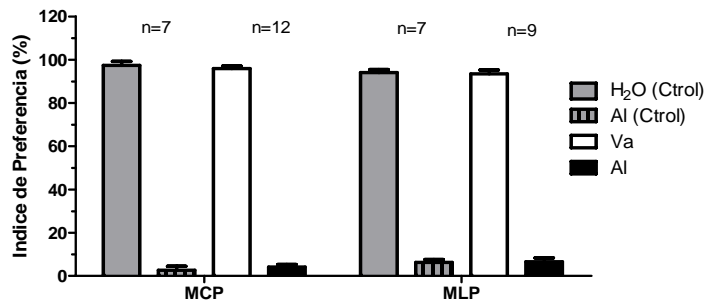
Gráfica 12. Evaluación de MCP (4 h después del olor) del AAO con diferentes intervalos interestímulos. Se permitió a las ratas beber agua en presencia de olor de almendra durante 10 min. Se administró LiCl después de 5, 15, 30, 60, 90 o 120 min (0.15 M, 2 % del peso corporal) por vía intraperitoneal. ANOVA seguida de Dunnett. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Se grafica media \pm EE.

Para descartar la posibilidad de que existiera alguna preferencia por el olor no condicionado, por efecto de la exposición del día anterior, que pudiera incrementar la aversión al olor condicionado durante la prueba de evocación, realizamos dos controles adicionales con ratas condicionadas con un intervalo de 5 min, pero en la prueba se les presentó agua sin olor y el olor condicionado, y se les probó en MCP y MLP independientemente.

Experimento 13. La familiaridad del olor no condicionado no aumenta la aversión hacia el olor condicionado.

En la gráfica 13 podemos ver que los I.P. fueron similares entre el nuevo grupo control (con agua sin olor) y los grupos experimentales (con vainilla) respectivos de MCP y de MLP de 5 min, indicando que no hubo efecto de preferencia por el olor no condicionado que contribuyera a la aversión por el olor condicionado.

Control de Preferencia H₂O sin olor vs Olor no Condicionado



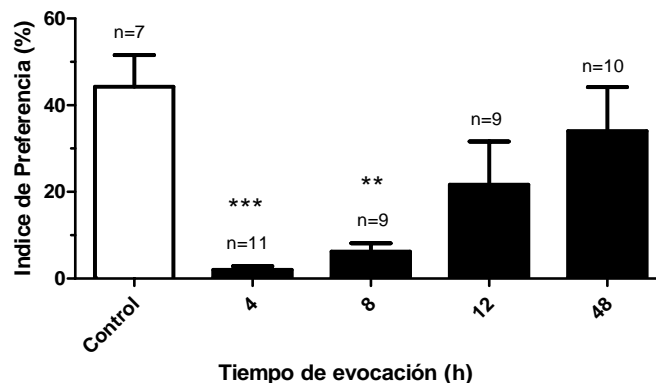
Gráfica 13. Control de preferencia de bebida sin olor vs olor no condicionado. Los grupos de H₂O recibieron una prueba de evocación de agua contra el olor condicionado, en lugar de vainilla, para descartar una posible preferencia por el olor sin condicionamiento que influyera sobre la aversión por olor condicionado. Prueba de t entre agua y vainilla en ambos casos, sin diferencias.

En contra de lo esperado, estos resultados mostraron que en el AAO los estímulos pueden asociarse y generar MCP aún con intervalos interestímulo tan largos como 60 min. De esta manera, dos posibilidades podrían explicar la ausencia de memoria aversiva cuando se espera a evaluar la MLP (48 h después del condicionamiento): falta de consolidación o problemas de evocación. En un intento de diferenciar entre estas dos posibilidades, hicimos pruebas de evocación 8 y 12 h después del condicionamiento, en grupos independientes de ratas entrenadas con el intervalo de 60, que fue el más largo en que se dio la asociación.

Experimento 14. La falta de aversión en la MLP se debe a deficiente consolidación y no a problemas de evocación.

En la gráfica 14 se muestra una caída de la aversión dependiente del tiempo de evocación, en la cual 8 h después del condicionamiento permanece casi tan fuerte (I.P. 6 %) como cuando se evalúa a las 4 h (I.P. 2 %), mientras que a las 12 h se pierde (I.P. 22 %). Por lo tanto, sugerimos que una deficiente consolidación explica la ausencia de aversión en las pruebas de MLP de los intervalos interestímulo >15 min en el AAO.

**Evocación del AAO en diferentes horas posteriores al entrenamiento
(Intervalo interestímulo 60')**



Gráfica 14. Se condicionaron grupos independientes con un intervalo interestímulo de 60 min. Se esperó 4, 8, 12 o 48 h para la prueba de evocación. Se realizó una ANOVA, seguida de Dunnett. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

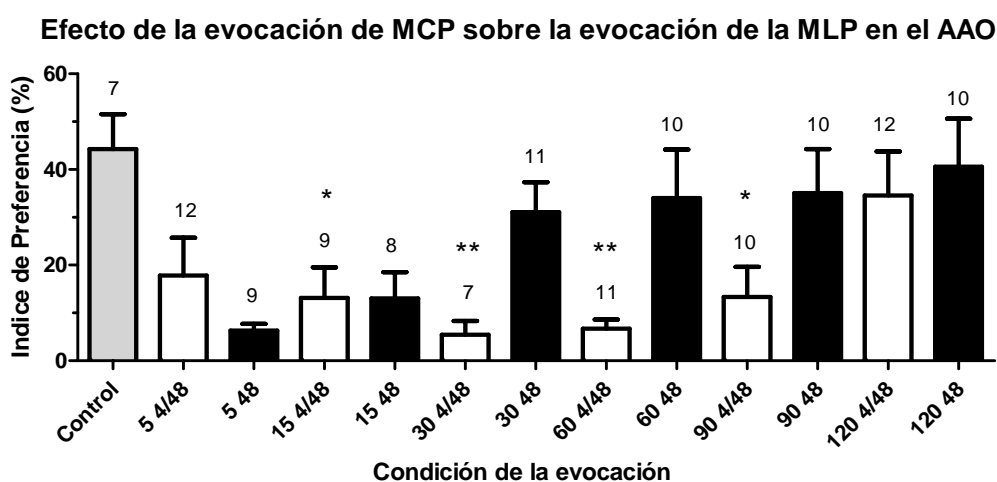
Con estos resultados demostramos que en el AAO el olor puede asociarse con malestar gastrointestinal aún con intervalos interestímulo tan largos como 60 min y que la ausencia de aversión mostrada en las pruebas de MLP, cuando el intervalo interestímulo es mayor que 15 min, se debe a un problema de consolidación y no de asociación ni de evocación.

En la siguiente parte de nuestra investigación decidimos probar la MLP (48 h después del condicionamiento) de los grupos probados en MCP (4 h después del condicionamiento) para verificar que la memoria estaba ausente, como habría de esperarse de conformidad con los resultados de los grupos probados solo en MLP.

Experimento 15. La evocación de MCP facilita la consolidación para generar MLP, por un efecto de “reactivación”.

En la gráfica 15 se muestra el efecto que hemos descrito como “facilitación de la consolidación por reactivación de la MCP”. Los grupos marcados “4/48” son los mismos de la gráfica 13, pero ahora probados en MLP, y los grupos 48 son los mismos de la gráfica 12. Sorprendentemente, en la prueba de MLP encontramos que los grupos condicionados con intervalos interestímulo de 15 – 90 min que fueron probados previamente en MCP presentaron I.P. aversivos, estadísticamente diferentes al grupo sin condicionamiento (ANOVA seguida de Dunnett, $p < 0.05$). Extrañamente,

el grupo de 5 4/48 no fue diferente al grupo control. Corroboramos la presencia de aversión comparando que los valores fueran estadísticamente iguales al grupo condicionado de 5 min probado solo en MLP. Corrimos nuevamente ANOVA y Dunnett, tomando como control de aversión el grupo de 5 min probado solo en MLP, comprobando que todos los grupos 4/48, incluyendo al de 5 min, y exceptuando el de 120, son iguales al de 5 48 ($p>0.05$). El grupo de 90 min es particularmente notable, pues a pesar de no mostrar memoria aversiva en la prueba de corto plazo, en esta ocasión sí la muestra.

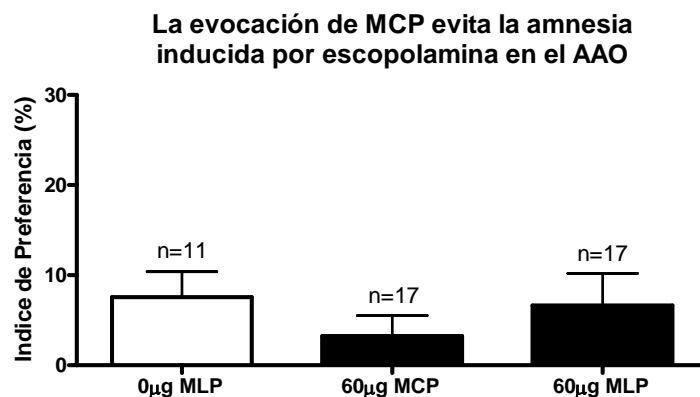


Gráfica 15. Grupos independientes fueron condicionados con diferentes intervalos interestímulo y probados en MCP (4 h después del olor) y en MLP (48 h después del condicionamiento) (barras blancas). Mientras que grupos homólogos fueron probados solo en MLP (barras negras). ANOVA no paramétrica seguida de prueba de Dunnett, comparando los grupos de doble evocación contra el grupo control. * $p<0.05$; ** $p<0.01$. Comparando contra el grupo 5 48, los grupos de doble evocación de 5 - 90 son iguales ($p<0.05$)

Debido a lo inesperado de este resultado, decidimos probar diversas condiciones que se sabe deterioran el AAO, incluyendo los bloqueos de la transmisión muscarínica del BO previamente descritos en la primera parte de esta tesis. Teníamos dos predicciones posibles: que los estímulos realmente no fueran asociados, por lo cual no habría MCP, o que fueran asociados pero no consolidados por efecto de los antagonistas, por lo cual tendrían MCP pero no MLP. Nuevamente, fuimos sorprendidos, esta vez al encontrar que la evocación de MCP previene los efectos amnésicos de la escopolamina y la pirenzepina administrada según el protocolo empleado previamente, pues hubo aversión tanto en MCP como en MLP.

Experimentos 16 y 17. La evocación de la MCP evita la amnesia anterógrada inducida por escopolamina o pirenzepina, administrados antes del condicionamiento, permitiendo la consolidación y expresión de la MLP.

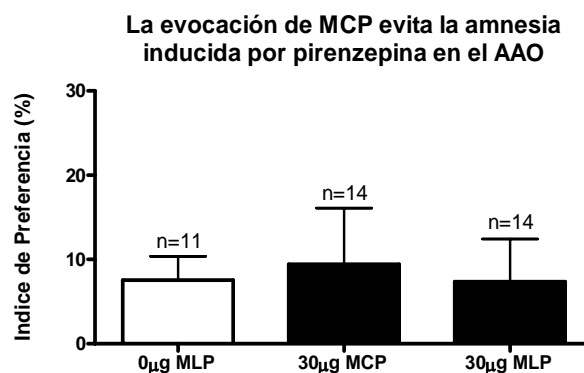
En la gráfica 16 se observa que la escopolamina (60 µg/µl/BO) administrada 10 min antes de la presentación del estímulo olfativo no afectó la asociación de estímulos ni la evocación de la MCP, pues el I.P. se mantiene tan bajo (3.2 %) como el del grupo inyectado con solución salina (I.P. 7.6 %). Pero además se observa que al probar al mismo grupo en MLP, sigue presentando aversión (I.P. 6.6 %). Recordemos que en la primera parte de esta tesis describimos que tras la administración de escopolamina siguiendo este mismo protocolo (inyección previa al olor), en la evocación de MLP no se observó aversión. Estos resultados sugieren dos cosas. Primero, que la escopolamina no afectó la asociación de estímulos, pues existe MCP. Segundo, que la evocación de la MCP revirtió el efecto de la escopolamina sobre la consolidación de la aversión, de tal manera que ahora sí hay MLP.



Gráfica 16. Se administró escopolamina 10 min antes del estímulo olfativo y se probó la MCP (4 h post entrenamiento) y la MLP (48 h post entrenamiento) en los mismos sujetos. ANOVA de una vía, seguida de Dunnet comparando contra el grupo control. No hay diferencias.

Debido a lo sorprendente de este resultado, que hasta donde sabemos no había sido descrito, decidimos probar si ocurría lo mismo con la administración de pirenzepina. De hecho, inicialmente pensamos que este resultado se debió a algún problema en el procedimiento de inyección del fármaco y repetimos el experimento, razón por la cual el grupo fue relativamente grande (n=17). Sin embargo obtuvimos el mismo resultado. Aun así, repetimos el experimento pero con pirenzepina.

En la gráfica 17 se observa que bajo el mismo procedimiento, la pirenzepina (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{BO}$) tampoco afectó la asociación de estímulos ni la evocación de la MCP, pues el I.P. se mantiene tan bajo (9.4 %) como el del grupo inyectado con solución salina (7.6 %). Pero además se observa que al probar al mismo grupo en MLP, siguen presentando aversión (I.P. 7.3 %). Recordemos que en la primera parte de esta tesis describimos que tras la administración de pirenzepina siguiendo este mismo protocolo (inyección previa al olor), en la evocación de MLP no se observó aversión.



Gráfica 17. Se administró pirenzepina 10 min antes del estímulo olfativo y se probó la MCP (4 h post entrenamiento) y MLP (48 h post entrenamiento) en los mismos sujetos. ANOVA de una vía seguida de Dunnet, comparando contra el grupo control. No hay diferencias significativas.

Estos resultados nos han llevado a proponer la reinterpretación de algunos resultados previamente publicados sobre los efectos amnésicos de la escopolamina, así como los propios de la primera parte de esta tesis.

Discusión

En esta segunda parte de mi investigación doctoral he mostrado dos condiciones en las cuales la adecuada evocación de la MCP revela que la asociación de estímulos en el AAO realmente ocurre, contraviniendo los postulados previos basados en pruebas de MLP que sostenían lo contrario. La primera condición fue un intervalo interestímulos largo (hasta 60 min) y la segunda la administración de escopolamina y pirenzepina, fármacos con efecto amnésico anterógrado bien establecido en varios modelos de aprendizaje, incluido el AAO en la presente investigación.

Adicionalmente he mostrado que la evocación de la MCP facilita la consolidación de la MLP en el AAO en las dos condiciones descritas.

La presencia de MCP indica asociación de estímulos aún con intervalos interestímulos de 60 min en el AAO.

Desde las primeras descripciones del AAO, realizadas por el grupo de John García (Hankins y cols, 1973; Rusiniak y cols, 1979; Palmerino y cols, 1980), hasta las más recientes por otros investigadores (Ferry y cols, 1996; Ferry y Di Scala 1997; Chapuis y cols, 2007), se ha mencionado que el AAO no soporta retrasos entre los estímulos a condicionar superiores a los 15 min, cuando el olor es percibido por vía orthonasal (no ingerido con el alimento o bebida). En todos los estudios mencionados las pruebas se han realizado siempre 48 h después del condicionamiento, lo cual ha impedido aclarar si la asociación de estímulos ocurrió pero no se consolidó en MLP.

En esta investigación, logramos reproducir los reportes previos en las pruebas de MLP. De tal manera que solo entre los intervalos de 5 – 15 min encontramos aversión, aunque con 15 no fue estadísticamente significativa (gráfica 11). La reproducción fiel de resultados previos nos indica que nuestra metodología no contiene factores que afecten sustancialmente el condicionamiento. Por otro lado, al evaluar la MCP encontramos aversión con los intervalos de 5, 15, 30 y 60 (gráfica 12), pero no con 90 ni 120 min. La presencia de aversión específica al olor condicionado indica que necesariamente ocurrió la asociación de estímulos en los intervalos considerados previamente como demasiado largos (15 – 60 min).

Hasta el presente estudio, no se evaluó sistemáticamente la MCP del AAO. Es posible que las limitaciones intrínsecas del modelo hayan evitado su evaluación en tiempos cortos posteriores al condicionamiento. Dado que los efectos del LiCl se pueden prolongar hasta 3 h (Lamprecht y cols, 1997), es difícil evaluar la ingestión de agua durante este intervalo. Sin embargo, en el aprendizaje de aversión gustativa, que básicamente sigue los mismos parámetros de condicionamiento, incluyendo la inyección de LiCl, sí hay reportes específicos sobre la demostración de una MCP (Haupt y Berlin, 1999), definida por su independencia de síntesis de proteínas, que dura hasta 6 h, con un tiempo de transición a MLP correspondiente a la fase de consolidación, de las 4.5 a las 6 h posteriores al condicionamiento. Por lo tanto, pensamos que no hay una razón justificada para obviar las pruebas de MCP en el AAO. Aún más, pueden medirse

parámetros adicionales para inferir el efecto del condicionamiento en intervalos aún más cortos, como mencionaré en el siguiente párrafo.

Hasta donde sabemos, solo hay un reporte previo en el que se evaluó la MCP del AAO, aunque de manera incidental. El objetivo de este estudio fue describir los efectos de la infusión de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en la Ami, sobre la consolidación del AAO (Desgranges y cols, 2008). El protocolo consistió en la presentación de isoamil acetato (olor de plátano, 0.01 %) diluido en el agua de bebida, seguida 30 min después de la administración de LiCl y 4 h más tarde de la prueba de MCP. A pesar de ser un estudio interesante que muestra la presencia de MCP del AAO, los autores no tenían en mente los objetivos de nuestro estudio. Con respecto a la elección del tiempo para la prueba, se basaron en la duración del malestar inducido por el LiCl (2 a 3 h; Lamprecht y cols, 1997; Desgranges y cols, 2008) y en estudios previos que muestran que no hay efectos alternos producidos por LiCl, como neofobia inducida por el malestar (Ferreira y cols, 2002; Desgranges y cols, 2008). A diferencia de nuestro protocolo, en este trabajo el olor fue percibido por vía retronasal (por la nasofaringe), lo cual se sabe que prolonga el tiempo de asociación entre el olor y el malestar hasta 2 h (Chapuis y cols, 2007). A pesar de esta diferencia, es interesante mencionar que el tiempo de espera para la prueba de MCP fue aproximadamente el mismo que nosotros empleamos. Al igual que ellos, nosotros nos basamos en el tiempo aproximado de duración de los efectos del LiCl, pero principalmente en pruebas piloto en las que encontramos que 4 h después de la sesión de bebida con el olor las ratas podían beber cantidades suficientes para hacer las pruebas estadísticas. En nuestros pilotos, encontramos que en tiempos menores las ratas no bebían o bebían demasiado poco, pero se observó una conducta de alejamiento del olor condicionado. La cuantificación del tiempo que pasa la rata alejada del lado con olor aversivo podría utilizarse eventualmente como una medida del grado de aversión en lapsos menores que 4 h.

Debido a que es la primera vez que se evalúa estrictamente el tiempo máximo de asociación entre estímulos en el AAO a través de la evocación de MCP, nuestros resultados son una aportación importante para la correcta interpretación de la ausencia de memoria aversiva en las pruebas de MLP. La interpretación tradicional ha sido que el olor, percibido por vía orthonasal, es un estímulo incapaz de asociarse con el malestar gastrointestinal cuando el intervalo entre ellos supera los 15 min. Esta interpretación ha dirigido en sentido equivocado los esfuerzos por encontrar sentido a fenómenos como la potenciación de la aversión al olor por el sabor, cuyo

significado expondré más adelante. También ha relegado a un segundo término a la vía olfativa como modalidad sensorial reguladora de ciertas conductas alimenticias, frente a la vía gustativa que ha demostrado condicionarse bajo retrasos más largos.

A este respecto, debemos mencionar que hay condiciones especiales bajo las cuales se logra la asociación de estímulos con intervalos más largos en el AAO. Una primera condición, es la percepción del olor por vía retronasal. Esta forma de estimulación se refiere a la detección de odorantes ingeridos con el alimento. A nivel experimental, el odorante es mezclado en el agua de bebida. Se sabe que en esta condición el tiempo de asociación se prolonga hasta 2 (Chapuis y cols, 2007) o 4 h (Slotnick y cols, 1997), dependiendo además de otros factores, como la concentración del odorante, el número de sesiones de entrenamiento, etc. Es importante mencionar que en los protocolos de presentación retronasal se han requerido dos o más apareamientos de los estímulos para generar aversiones significativas (Slotnick y cols, 1997; Chapuis y cols, 2007), lo cual hace pensar que a pesar de que es una vía que tolera mayor retraso entre los estímulos, no es suficiente para generar una MLP efectiva con una sola sesión. En nuestro protocolo siempre fue suficiente un solo apareamiento de estímulos para mostrar aversiones robustas en la MCP. Cabría verificar si la repetición de ensayos de condicionamiento en el modelo ortonasal genera MLP con intervalos de 90 y 120 min. Otra condición en la cual se han observado tiempos de asociación largos, de hasta 2 h, corresponde a la destrucción de la corteza entorinal lateral (Ferry y cols, 1996; Ferry y cols, 2006). Bajo esta manipulación, la ampliación del intervalo interestímulos no depende de la concentración del olor ni de su presentación por vía retronasal. Una condición más es la potenciación de la aversión al olor por el sabor, en donde la estimulación conjunta de olor y gusto (sabor) amplía el intervalo de asociación hasta 2 h y permite evocar la aversión con solo la estimulación olfativa (Rusiniak y cols, 1979; Palmerino y cols, 1980; Ferry y cols, 1995). Así mismo, el bloqueo de receptores GABA_A de la Ami basolateral con la infusión de bicuculina posterior al estímulo olfativo, permite la asociación con el malestar visceral con un retraso de 30 min (Ferry y Di Scala, 1997). En todos los trabajos mencionados, la falta de aversión en las pruebas de MLP es atribuida a la incapacidad de asociación del olor con el malestar, lo cual ha llevado a proponer que el olor genera una memoria de corto plazo muy breve (< 15 min) que no alcanza a asociarse con el malestar (Hankins y cols, 1973; Palmerino y cols, 1980; Ferry y cols, 1996; Ferry y Di Scala 1997; Chapuis y cols, 2007). Esta interpretación fue tomada del modelo de aversión gustativa, para el cual se propuso la

existencia de una MCP del estímulo gustativo que duraría lo suficiente para asociarse con el malestar gastrointestinal retrasado (Bures y cols, 1998), de tal manera que en el AAO, la MCP del olor sólo duraría unos 15 min (Chapuis y cols, 2007).

Con la evidencia obtenida en este trabajo, ha quedado claro que la memoria del olor dura y puede asociarse con el malestar visceral hasta los 60 min, generando una memoria aversiva que dura aproximadamente 8 h posteriores a la presentación de olor. Nuestros controles presentando agua en lugar del olor no condicionado mostraron que no hubo preferencia por efecto de la familiaridad hacia el olor no condicionado que incrementara la aversión hacia el olor condicionado (gráfica 13). Aún más, las pruebas de evocación a las 8 y 12 h después del condicionamiento mostraron una caída gradual de la aversión (gráfica 14), en donde a las 8 h aún se expresa, pero a las 12 ya no. En conjunto, estos resultados nos llevan a concluir que la falta de aversión en las pruebas de 48 h se debe a una deficiente consolidación, pero no a falta de asociación ni a problemas de evocación, mientras el intervalo interestímulos no supere los 60 min. Así, con nuestros resultados hemos cambiado la interpretación hacia un defecto de consolidación en lugar de un problema de asociación.

En el AAO la falta de aversión en las pruebas de 48 h se debe a una deficiente consolidación, mientras el intervalo interestímulos no supere los 60 min.

Se considera que el proceso de formación de MLP es un continuo en el que tras la percepción y asociación de estímulos se forma una MCP gracias a los procesos de atención (Salamon 2002). Así mismo, para que la MCP se transforme en MLP se requiere del proceso de consolidación, que a nivel celular involucra la síntesis de proteínas, y a nivel de sistemas involucra interacciones entre redes neurales de diferentes regiones cerebrales como el hipocampo, la corteza y la Ami, por mencionar algunas (Bailey y cols, 1996; Nader y cols, 2000; Dudai y Eisenberg, 2004; Baratti y cols, 2009; Nader y Hardt, 2009; Redondo y Morris, 2011). Dos líneas de evidencias han soportado la distinción tradicional entre MCP y MLP. Primero, diversas manipulaciones como choques electroconvulsivos, inhibición de la síntesis de proteínas, administración de fármacos, daño cerebral, posteriores al aprendizaje provocan amnesia de forma inversamente proporcional al tiempo transcurrido. Segundo, si un sujeto aprende una tarea y luego otra poco tiempo después, la memoria de la primera se deteriora (fenómeno conocido como interferencia retroactiva), pero no si entre ellas transcurre más tiempo (Bailey y cols, 1996; Nader y cols, 2000;

Nader y Hardt, 2009). Por otro lado, la retención de la información puede mejorarse con la administración de ciertos compuestos, como la estriquina, anfetamina o agonistas β -adrenérgicos, de forma igualmente dependiente del tiempo transcurrido desde la adquisición (Pelletier y Paré, 2004; Nader y Hardt, 2009). Debido a que estas manipulaciones solo tienen efecto poco tiempo después del aprendizaje, se infiere que la memoria existe en dos estados: uno lábil, susceptible a mejorarse o deteriorarse (MCP), y otro estable, insensible a los tratamientos mencionados (MLP). En nuestro diseño experimental, no realizamos ninguna manipulación, por lo cual pensamos que las características específicas del aprendizaje son responsables de la falta de consolidación.

A nivel conductual, se considera que la consolidación se origina por dos razones generales: por la saliencia (relevancia, notoriedad) de la información adquirida, o por repetición del aprendizaje (Morgado Bernal, 2011). A nivel molecular, se ha propuesto que la consolidación no solo requiere de mecanismos positivos, tales como la expresión de CREB, sino también de la remoción de mecanismos que impiden la consolidación, tales como la represión de CREB2, la activación persistente de PKA y la inhibición de crecimiento sináptico (Abel y Kandel, 1998; Dudai, 2004). A pesar de que las condiciones fisiológicas necesarias para inducir la consolidación aún no son bien conocidas, se sugiere la existencia de un “umbral” de actividad, con suficiente liberación de neurotransmisores y neuromoduladores, de suma de estímulos coincidentes, etc., durante la fase de aprendizaje que delimitaría el paso de MCP a MLP (Abel y Kandel, 1998; Dudai, 2004). Desde este punto de vista, sería fácil inferir que estos eventos celulares determinarían la saliencia suficiente de la información para inducir su consolidación. En el AAO utilizado por nosotros es posible que la disociación de la actividad generada por los estímulos imposibilitara superar el “umbral” de consolidación a pesar de ser suficiente para la formación de MCP.

A nivel de sistemas, recientemente Chapuis y cols (2009) compararon la actividad de diferentes estructuras durante la adquisición del AAO, presentando el estímulo olfativo por vía orthonasal o retronasal. Encontraron que con la olfacción orthonasal el BO, la corteza piriforme, la corteza orbitofrontal y la Ami basolateral generan un patrón de oscilación beta (15 – 40 Hz), mientras por la vía retronasal se suman la corteza insular y la corteza infralímbica. Además, encontraron que la emergencia del patrón beta oscilatorio es altamente predictivo de la expresión conductual de la aversión (Chapuis y col, 2009) en las pruebas de evocación. En este estudio la administración del LiCl para generar el condicionamiento aversivo se realizó inmediatamente después de la

presentación del estímulo olfativo, para ambas vías de presentación. Es posible que a pesar de que ambas vías de presentación olfativa generaron aversión que llegó a MLP (probada tres días después en este estudio), la presentación orthonasal seguida por un tiempo largo de la inyección del LiCl genere de forma diferencial, quizás solo en grado, el patrón beta oscilatorio, lo cual explicaría que no llegara a formar una MLP. Es posible que la estimulación coincidente de la Ami por ambas vías, del olor y del malestar, sea el requisito necesario para desencadenar los procesos de consolidación del AAO, de tal manera que en el diseño de intervalos largos la disociación de los estímulos produzca una estimulación suficiente para generar MCP pero insuficiente para consolidarla en MLP. De ser cierta, esta hipótesis explicaría que bajo las condiciones especiales en las que se obtiene AAO con intervalos largos (estimulación olfativa retronal, destrucción de la corteza entorinal, potenciación de la aversión al olor por el sabor) la actividad diferencial de la Ami permita la consolidación de la memoria aversiva. A este respecto, se sabe que la corteza entorinal modula el procesamiento olfativo en la Ami, de tal manera que su destrucción permite la expresión del AAO a las 48 h cuando se produce con intervalos largos (Ferry y cols, 1996; Ferry y cols, 2006). A diferencia de la explicación de los autores, que sugieren una prolongación de la memoria olfativa que permite su asociación con el malestar retrasado, nosotros proponemos que se facilita la consolidación de la memoria aversiva. De forma similar, en el caso de la olfacción retronal y de la potenciación de la aversión al olor por el sabor, el reclutamiento de la corteza insular en el patrón beta oscilatorio podría modificar los procesos de consolidación en la Ami, que parece ser la responsable de la consolidación del AAO como sugiere el hecho de que la administración de anisomicina previa al estímulo olfativo no afecta el aprendizaje, pues la memoria aversiva de corto plazo está intacta, mientras que impide su consolidación, pues afecta la expresión en la prueba de largo plazo (Desgranges y cols, 2008).

La evocación de la MCP facilita la consolidación de la MLP en el AAO.

En la parte final de mi investigación doctoral he descrito cómo, a través de un efecto de “reactivación”, la evocación de la MCP facilitó el tránsito hacia la MLP, es decir, facilitó la consolidación de la memoria. De tal manera, los grupos condicionados con intervalos interestímulos de 15 – 90 min, mostraron aversión en la prueba de MLP, con I.P. tan bajos como en la prueba de MCP y como el grupo de 5 min evocado solo en MLP (gráfica 15). De forma

similar, mostré que la evocación de MCP previene los efectos amnésicos de la escopolamina y la pirenzepina administradas antes del aprendizaje (gráficas 16 y 17).

A estas evidencias, se suman las descritas por la Lic. en Biología Hilda Sánchez de Jesús en su tesis de licenciatura (UNAM, 2010), realizada bajo la tutoría del Dr. Gabriel Roldán. Ellos utilizaron dosis bajas de LiCl como estímulo incondicionado para generar aversiones débiles. Al igual que en mis estudios, encontraron que la MCP estaba intacta, revelando la asociación de los estímulos.

En la figura 14 se muestran los I.P. de las pruebas de evocación a las 4, 8 12 y 48 h después del condicionamiento de grupos independientes, condicionados con dosis bajas de LiCl: 0.5 y 1% del peso corporal (la dosis usual es de 2 %). La prueba de 48 h, en la que no se observó aversión con ninguna de las dosis (IP 43.71% y 37.87% para 0.5 y 1 % respectivamente) se usó como control para comparar el resto de los grupos respectivos. La diferencia entre los grupos de 4 y 8 h (dosis 0.5%) y 4, 8 y 12 horas (dosis 1%) respecto al grupo correspondiente de 48 h fue significativa. Sin embargo, se observa una disminución de la aversión proporcional al incremento del tiempo de evocación (I.P. 18.7% y 11.4% a las 8 h y 46% y 17% a las 12 h, para las dosis de 0.5 y 1% respectivamente). La diferencia entre las dos dosis evaluadas a las 12 h (★) fue significativa, lo cual coincide con reportes previos en donde a mayor dosis de estímulo incondicionado, hay mayor aversión (García y cols, 1955; Andrews y Braveman, 1975).

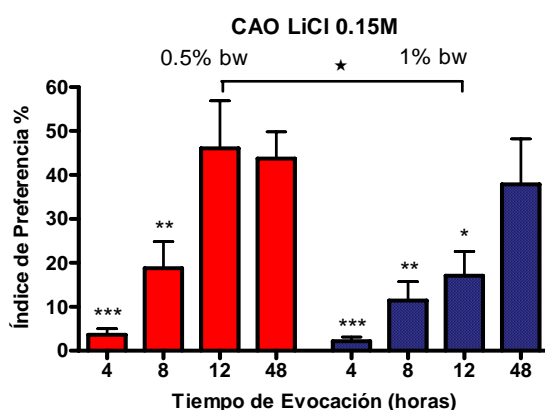


Figura 14. Evaluación de la memoria en un diseño de AAO con dos dosis bajas de LiCl, (estímulo incondicionado débil), en diferentes horas posteriores al entrenamiento. I.P. del olor condicionado 4, 8, 12 y 48 horas después del entrenamiento. Se muestra media \pm EE. ANOVA seguida de Newman-Keuls. *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$ en comparación con el grupo evocado a 48 horas para la misma dosis. ★ = diferencia significativa entre los grupos

evaluados a las 12 horas después del condicionamiento. $n \geq 9$. Tomado de Sánchez de Jesús, H. tesis de Licenciatura. UNAM, 2010).

Además, también encontraron que la evocación de la MCP facilitó la consolidación. En la figura 15 se observa que en la evaluación de la MLP (48 h) del grupo probado previamente a las 4 h el I.P. fue de 11.5% y 5.4% las dosis respectivas de 0.5 y 1% de LiCl, y que la aversión se pierde de forma gradual para los grupos evocados previamente a las 8 y 12 h (IP 31.1% y 18.2%, grupos de 8 h y 35.6% y 30.5%, grupos de 12 h, para las dosis respectivas de 0.5 y 1%). Nuevamente, estos resultados señalan que la evocación de MCP favorece la consolidación de la memoria, logrando su expresión en la prueba de MLP. Las diferencias entre los grupos con y sin evocación previa fueron significativas.

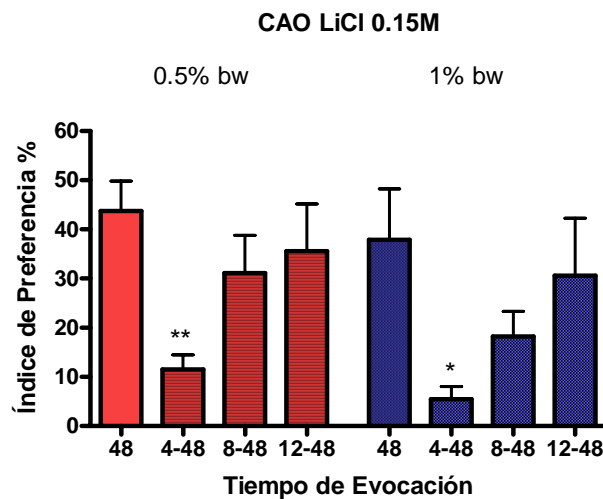


Figura 15. Efecto de la evocación de MCP sobre la MLP en un diseño de AAO con dos dosis bajas de LiCl, (estímulo incondicionado débil). I.P. del olor aversivo 48 h después del condicionamiento tras las pruebas de 4, 8 y 12 h. Media \pm EE. ANOVA + Newman-Keuls. **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$ en comparación con el grupo sin evocación previa de la dosis respectiva. $n \geq 9$.

Si bien no tenemos conocimiento de estudios similares en los que la evocación de MCP en un modelo de aprendizaje asociativo facilite la consolidación de MLP, algunos fenómenos relacionados han sido descritos. Primero, es necesario aclarar que nuestro efecto “facilitador” no se explica como un evento de repetición del aprendizaje, que sería la forma más fácil de

interpretarlo. Estrictamente hablando, la repetición de un aprendizaje asociativo incluye un nuevo apareamiento de los estímulos originales, mientras que en nuestro caso solo presentamos el estímulo condicionado para evaluar la memoria, es decir, como pista de evocación.

En general, la evocación de una memoria asociativa por la reexposición al estímulo condicionado sin el estímulo incondicionado puede generar dos procesos opuestos: reconsolidación o extinción del aprendizaje (Bouton y Moody, 2004; Dudai y Eisenberg, 2004; De la Fuente y cols, 2011). La reconsolidación se refiere a un proceso similar a la consolidación, que ocurre tras la reactivación del engrama por la exposición breve al estímulo condicionado y reestabiliza la MLP (Dudai y Eisenberg, 2004; De la Fuente y cols, 2011). La extinción se refiere a un nuevo aprendizaje sobre las características del estímulo condicionado, que ahora se presenta prolongada o repetidamente sin el estímulo incondicionado, de tal manera que ya no induce la respuesta del condicionamiento original (Bouton y Moody, 2004; Dudai y Eisenberg, 2004; De la Fuente y cols, 2011). Nuestros resultados no coinciden con ninguna de estas opciones, aunque nos parecen más semejantes a un proceso de reconsolidación, que en este caso hemos preferido llamar “reactivación”, pues no cubre los criterios de la reconsolidación. Con respecto a la extinción, nosotros solo hicimos dos pruebas de evocación, por lo cual no consideramos que cubra los criterios sobre “la exposición repetida o prolongada del estímulo condicionado”. Aun así, en sentido estricto nuestra prueba de MCP sería el primer ensayo de extinción, por lo cual esperaríamos que tras dicho ensayo la aversión se viera reducida. Por el contrario, funcionó como facilitador de la consolidación, al revelarse fuertemente la aversión en la prueba de MLP. Pensamos que nuestras condiciones son más semejantes a un caso de reconsolidación, dado que solo realizamos dos presentaciones del estímulo condicionado sin el incondicionado, es decir, solo hicimos una prueba de evocación, lo cual consideramos es más cercano a la definición de “exposición breve al estímulo condicionado” que define a la reconsolidación. De tal manera, nuestro hallazgo se explicaría sobre la teoría de la reconsolidación. Sin embargo, de acuerdo a la lógica más simple, la fenomenología de la reconsolidación no es posible, por el hecho simple de que la serie de eventos, tanto a nivel celular como de sistemas cerebrales, que implica la consolidación no han ocurrido aún. Un fenómeno parecido al nuestro, es el conocido como “efecto de recordatorio”, que se refiere a la reversión de los efectos amnésicos de diversos agentes bloqueadores administrados durante la consolidación, por la reexposición al estímulo condicionado solo. En este efecto, va implícita la noción de que el agente amnésico no impidió la consolidación, sino que imposibilitó la evocación temporalmente,

de tal manera que la reexposición al estímulo condicionado es capaz de recuperar esa memoria (Dudai, 2004). A pesar de que tampoco este parece ser nuestro caso, pues todos nuestros grupos de intervalos interestímulo largos, así como aquellos a los que administramos fármacos, pudieron evocar la MCP, es decir, no se mostró un efecto amnésico inicial, es el más parecido que encontramos en la literatura. A pesar de esta diferencia, encontramos similitudes. Por ejemplo, ya comentamos que, de acuerdo a los resultados presentados en las gráficas 17 y 18, hemos concluido que a pesar de ser administrados antes de la presentación de estímulos, los efectos de escopolamina y pirenzepina se manifiestan sobre la consolidación y no sobre la formación de MCP. De esta forma, el efecto de la evocación de la MCP sí podría considerarse como de “recordatorio”, a pesar de que no se demostró previamente que la memoria estuviera formada. Ahora nos parece buen momento para intentar explicar el resultado mostrado en la gráfica 16, referente al grupo de 90 min probado primero en MCP y luego en MLP. Es notable que a pesar de que en la evocación de MCP no mostró aversión, en la MLP tuvo un I.P. muy bajo, significativo de aversión. Este resultado podría ser el “limbo” entre el “efecto recordatorio” ya descrito antes (Dudai, 2004) y un “efecto de reactivación”, que describimos por primera vez. Es posible que este resultado esté mostrando el efecto amnésico anterógrado de la ampliación del intervalo interestímulo, en donde la MCP estaba muy dañada, y que al reactivarse por la evocación se generara el efecto recordatorio. La otra posibilidad es que la evocación de una MCP tenga un efecto diferente a los dos posibles en la evocación de una MLP, funcionando como reactivadora, según proponemos. Sea cual fuere la explicación teórica, es posible pensar que la evocación incrementó la actividad de los circuitos recientemente reclutados por el aprendizaje y permitió superar el “umbral” de la consolidación. Es interesante mencionar que Desgranges y cols (2008) mostraron que la infusión de anisomicina en la Ami antes del condicionamiento, no afecta la MCP, pero sí afecta la MLP, es decir, afecta la consolidación. En este caso, la evocación de MCP no facilitó la consolidación del aprendizaje, señalando claramente que la actividad de la Ami es un factor limitante en el proceso de consolidación del AAO, y que el efecto de la anisomicina no es superable por la evocación temprana. Recientemente se ha propuesto que hay dos oleadas de síntesis de proteínas durante la consolidación de una memoria olfativa, una alrededor de las primeras dos horas posteriores al entrenamiento, y otra entre las 6 y 18 (Richter y cols, 2005; Engelmann, 2009; Wanisch y cols, 2008). Sería interesante evaluar la MCP en estos tiempos para demostrar si en el caso del AAO existen estas subetapas de la consolidación que

podieran explicar el efecto “reactivador” en términos de “reconsolidación” muy temprana. A pesar de la diversidad de reportes sobre el tema de la consolidación, las evidencias siguen siendo insuficientes para establecer una relación causal entre los mecanismos moleculares y la manifestación conductual de la memoria. Cualesquiera que sean los procesos limitantes, o las condiciones “umbrales” para iniciar la consolidación, para nosotros es claro que la percepción del estímulo condicionado durante dicho proceso puede reactivarlos, permitiendo el tránsito hacia la expresión de la MLP.

Pensamos que esta evidencia aporta una nueva perspectiva sobre los procesos de formación de la memoria, dándole un tinte más dinámico de lo tradicional. A este respecto, en una revisión sobre los diferentes fenómenos relacionados con la consolidación, Dudai (2004) ha comentado sobre la posibilidad de que las diferentes memorias nunca terminen de consolidarse, y que no es el tiempo el que determina la susceptibilidad de una memoria a diversas intervenciones, sino su estado funcional: activo o inactivo, de tal manera que bajo el estado activo, es susceptible de ser dañada o facilitada. De esta manera, la distinción entre MCP y MLP no estaría dada por la ocurrencia de la consolidación, sino por la susceptibilidad de ser modificada. En nuestro caso, pensamos que la evocación por exposición al estímulo condicionado reactivó los circuitos recientemente reclutados en la fase de adquisición incrementando su actividad, originalmente insuficiente debido a las manipulaciones debilitadores, hasta superar el “umbral” de la consolidación.

Conclusiones

En esta parte de mi tesis he mostrado que la evocación de la MCP reveló información valiosa para la correcta interpretación del AAO. Los hallazgos más importantes fueron los siguientes:

1) el AAO se genera bajo intervalos interestímulos tres veces más largos que lo previamente aceptado (hasta 60 min) y bajo los efectos de escopolamina o pirenzepina. De tal manera que proponemos una nueva interpretación de los resultados arrojados previamente por las pruebas de MLP. A saber, que dichas manipulaciones no afectan la asociación de los estímulos, como es aceptado actualmente, sino que afectan su consolidación.

2) la evocación de la MCP facilita la consolidación del AAO bajo condiciones de aprendizaje inicialmente debilitado por manipulaciones amnésicas tales como la prolongación del intervalo interestímulos o la administración previa a los estímulos de escopolamina o pirenzepina.

Hemos intentado explicar nuestros resultados con base a la información disponible, sin embargo, las condiciones exactas de nuestro caso nos dejan pocas opciones, por lo cual creemos que nos enfrentamos a un fenómeno no descrito antes. Las evidencias mostradas indican que la exposición al estímulo condicionado en un ensayo de evocación temprana, donde se considera que la memoria todavía está en fase de MCP, facilita su consolidación, efecto diferente a las dos posibilidades descritas en el caso de la evocación de una MLP (extinción y reconsolidación). Dicho fenómeno no se ha documentado en la literatura especializada por lo cual lo consideramos como un hallazgo novedoso de gran relevancia.

Conclusiones generales

Debido a que las conclusiones de la segunda parte afectan las de la primera, las mencionaré primero. En la segunda parte de esta investigación hemos llegado a dos conclusiones importantes. La primera se refiere específicamente al modelo del AAO. Hemos demostrado que los estímulos pueden asociarse bajo intervalos interestímulos tres veces más largos que lo previamente aceptado. Esta conclusión contradice la interpretación actual que afirma que la memoria del olor dura menos de 15 min, pues al retrasarse la presentación del estímulo incondicionado más de este tiempo no se encuentra aversión al probarse la MLP. Nosotros demostramos que los estímulos pueden asociarse con intervalos de hasta 60 min y generar una aversión que puede evocarse en el corto plazo, pero que por alguna razón desconocida no logra consolidarse en MLP. La segunda se refiere a la facilitación de la consolidación por la evocación de la MCP. Hemos demostrado que la evocación de la MCP facilita la consolidación, superando los efectos debilitantes del aprendizaje inducidos por la ampliación del intervalo interestímulos o por la administración de drogas de conocido efecto amnésico. Debido a que es fenómeno nuevo, aún no conocemos los mecanismos responsables de este efecto. El alcance de esta conclusión podría ir más allá del modelo de AAO y lo comentaremos por separado.

Respecto a la primera parte de nuestra investigación, a la luz de los resultados de la segunda parte, concluimos que los efectos amnésicos de la escopolamina y la pirenzepina, a pesar de ser administrados antes del condicionamiento, afectan la consolidación y no la asociación de estímulos.

La evocación como proceso determinante de la permanencia de la memoria ¿un mecanismo general de los procesos mnémicos?

A continuación haré una breve revisión del modelo actual más aceptado sobre los procesos de formación de la memoria y, basándome en los resultados de mi investigación, especialmente respecto a la importancia de la evocación como un evento determinante de su permanencia, propondré un modelo simplificado. Para los fines que nos ocupan, seré sucinto en la descripción de los procesos de neurotransmisión, limitándome a los colinérgicos, si bien no pretendo de ninguna manera sean los únicos, ni siquiera los más importantes, responsables de la formación de la memoria.

En la actualidad es ampliamente aceptado que la formación de la memoria sigue una secuencia lineal. Partiendo de la adquisición y transducción de la información en los sistemas sensoriales adecuados, ésta es codificada en el sistema nervioso para formar una MCP. Dependiendo de ciertos factores, aún no bien comprendidos, la MCP puede consolidarse para formar una MLP. Finalmente, la demostración de la persistencia de la memoria se realiza haciendo una prueba de evocación, que consiste en la expresión de alguna conducta que indique que el sujeto retuvo la información. De tal manera, tradicionalmente son identificados tres procesos y tres consecuentes estados de la información: 1) proceso de adquisición de la información, o simplemente proceso de aprendizaje; 2) formación de una MCP, la cual según las descripciones típicas es susceptible a diferentes manipulaciones amnésicas (labilidad) y es de corta duración; consiste en el mantenimiento de la información en un estado activo durante un tiempo relativamente corto posterior a su adquisición; 3) proceso de consolidación, el cual consiste en la remodelación morfológica y funcional de las conexiones sinápticas pertinentes a partir de la activación genética; 4) formación de MLP, la cual se considera como una forma de memoria más estable, inmune a las manipulaciones que afectan a la MCP, y duradera; 5) proceso de evocación, el cual consiste en la reactivación de la memoria a partir de la presentación de una señal adecuada; 6) memoria reactivada como consecuencia de su evocación, la cual vuelve a ser susceptible a las mismas manipulaciones amnésicas que la MCP, aunque también a las facilitadoras, y que pasará por un nuevo proceso de consolidación que ha sido llamado preferentemente reconsolidación.

Basándome en los resultados de mi investigación, considero que el esquema actual puede ser simplificado en dos procesos y dos estados funcionales de la memoria. Veamos:

1) un proceso de adquisición y codificación de la información en el sistema nervioso, o simplemente aprendizaje, el cual genera

2) una memoria activa, fresca, que sería la correspondiente a la MCP del modelo actual; en este estado, es susceptible a manipulaciones que pueden mejorar o dañar su representación en el sistema nervioso;

3) un procesamiento sostenido de la información, que estaría determinado por las condiciones de la adquisición, básicamente el grado de atención generado o la repetición de ensayos; este proceso correspondería a la consolidación del modelo actual. La distinción esencial que introduzco consiste en que la consolidación no es un evento subsecuente a la adquisición, cuyo inicio parte de la formación de una MCP, sino desde el momento mismo de la adquisición, pero que se continúa hasta generar los cambios morfológicos y funcionales más estables que se le atribuyen. Este proceso no cursa con manifestaciones conductuales, es decir, está disociado de la conducta en curso del animal, por lo cual ha sido considerado como un proceso hasta cierto punto independiente de la adquisición; las investigaciones más recientes han mostrado que este proceso se beneficia durante el sueño, así como de los estados de vigilia pasiva (Carr y cols, 2011; Diekelmann y Born, 2010). En ambas situaciones la atención del sujeto no está dirigida a los estímulos ambientales, por lo cual los recursos de procesamiento pueden ocuparse en la reelaboración de la información existente en el sistema nervioso. Este proceso genera

4) una memoria inactiva, estable, no susceptible a manipulaciones amnésicas, pero que no guía la conducta en curso del sujeto. Sería el estado de “latencia” descrito por Cammarota y cols (2004).

En mi propuesta, sugiero que el quinto elemento del modelo actual, la evocación, es muy similar a la adquisición, pues comparten estructuras, como hipocampo y corteza prefrontal, y requieren del proceso de atención (Diekelmann y Born, 2010; Hasselmo y Sarter, 2011). La atención/evocación determinaría los dos estados funcionales de la memoria: activa o inactiva, así como el procesamiento continuado de la información para incrementar o disminuir la solidez de su representación inicial en el sistema nervioso. Diferentes evidencias indican que la adquisición y la evocación comparten los recursos, de estructuras y función, de los procesos de atención. Las

estructuras más fáciles de identificar y que considero forman parte de un sistema único de procesamiento durante la activación de la memoria son el hipocampo y la corteza prefrontal. De tal manera, la distinción entre MCP y MLP, dependería no tanto del tiempo transcurrido desde la adquisición de la información, sino de su estado: activo o inactivo, como de hecho ha sido sugerido por Dudai (2004). Adicionalmente, no cabría la distinción entre los procesos de consolidación y reconsolidación, pues son esencialmente el mismo. La distinción correspondería exclusivamente al grado de similitud entre las condiciones de activación inicial de la fase de adquisición y las de la evocación. Si las condiciones son las mismas, entonces el significado y por lo tanto la expresión conductual será fortalecida. Si las condiciones son diferentes, por ejemplo, se presenta un estímulo condicionado como señal de evocación, pero no se presenta el estímulo incondicionado, el significado y por lo tanto la expresión conductual cambia. Consideramos que este fenómeno, actualmente llamado reconsolidación, se explica sobre la base de un nuevo aprendizaje, que de hecho es conocido como extinción.

En nuestros estudios, al reactivar la memoria 4 h después de su adquisición, se facilitó la asociación aversiva, de manera que pudo expresarse a las 48 h. Asumimos que la reactivación es un nuevo evento de aprendizaje, donde la nueva puesta en marcha de los procesos de atención generados por el estímulo condicionado, inducen mayor procesamiento de la experiencia recientemente adquirida. Se ha propuesto que, bajo ciertas circunstancias, la presentación del estímulo condicionado evoca una especie de “alucinación” del incondicionado con el que se emparejó, actuando como reforzador. Por lo menos bajo ciertas condiciones un estímulo condicionado puede activar o recuperar información acerca del estímulo incondicionado. Esto significa que una vez que se activa la información acerca del incondicionado, ésta puede influir en la conducta del animal, y permite más aprendizaje acerca de dicho estímulo incluso en su ausencia (Pearce, 1998).

Nuestros datos indican que la condición que permite más aprendizaje acerca del estímulo incondicionado en su ausencia, es la reactivación por evocación poco tiempo después de la adquisición (p.ej. 4 h). De tal manera que si esperamos más (p.ej. > 8h), el estímulo condicionado ya no es capaz de recuperar información del incondicionado, generándose la extinción. Es decir, se aprende la ausencia del reforzador y se genera una nueva asociación que no indica peligro, por lo cual la rata ya no muestra aversión.

Una pregunta clave de las teorías de la memoria, es ¿de qué factores depende su permanencia temporal? Son varios, pero el más discutido en la literatura especializada es el proceso de consolidación, el cual permite a la memoria pasar de un estado lábil y de corta duración, la MCP, a uno más estable y de larga duración, la MLP (Redondo y Morris, 2011; Dudai, 2004). La consolidación incluye procesos tanto a nivel celular como de circuitos neurales. Los procesos celulares son los más inmediatos y conciernen el fortalecimiento sináptico y cambios en neuronas individuales en el plazo de minutos y horas después de la codificación inicial de la información (Redondo y Morris, 2011; Dudai, 2004; Litvin y Anokhin, 2000; Nader y cols, 2000). Los procesos a nivel de circuitos o sistemas neurales incluyen la transferencia de información de una región (el hipocampo) a otra (la corteza) que constituirá el almacén permanente de la memoria (Dudai, 2004; Litvin y Anokhin, 2000; Nader y cols, 2000). Si bien la consolidación ha sido ampliamente estudiada y se conocen muchos detalles sobre su funcionamiento, poco se ha mencionado sobre las condiciones que la activan, dándose el caso exagerado de teorizar un “umbral” para su activación (Dudai, 2004). A continuación haremos algunas consideraciones al respecto.

A nivel conductual, se considera que la característica más importante que debe tener un estímulo para activar la maquinaria del aprendizaje y la memoria, es la saliencia, es decir la notoriedad, singularidad, novedad o relevancia, la cual provoca la atención selectiva por parte del sujeto (Hasselmo y Sarter, 2011; Menon y Uddin, 2010; Salamon, 2002; Pearce, 1998; Sarter y cols, 2006) y dirige su conducta en curso. En sus investigaciones sobre los reflejos condicionados, Pavlov describió un “reflejo de investigación” que *causa en hombres y animales una respuesta inmediata a los cambios leves del mundo que los rodea, de modo que orientan inmediatamente su órgano receptor apropiado conforme a la cualidad perceptible en el agente causante del cambio, haciendo una investigación completa de él* (revisado en Pearce, 1998). Actualmente a este reflejo se le conoce como respuesta de orientación o atención selectiva (Hasselmo y Sarter, 2011; Pearce, 1998; Coull, 1998). Puesto de otro modo, la atención consiste en la disposición adecuada de los recursos de procesamiento hacia un estímulo relevante (Coull, 1998). Así, la atención inducida por un estímulo varía dependiendo de su relevancia para dirigir la conducta en curso del sujeto. Como corolario, debemos aceptar que entre más atención genere un estímulo, mejor será su procesamiento y mayor probabilidad de generar aprendizaje y memoria. La atención selectiva

parece ser el elemento crucial que determina la “reverberancia” de los ensambles neurales propuesta por Hebb hacia 1949, en su teoría del mecanismo de trazo dual, en donde la actividad sostenida del ensamble celular reclutado en la adquisición de la información podría generar una memoria de larga duración. También podría ser el factor cuyo nivel “umbral” determinaría la inducción de los procesos de consolidación, según ha propuesto Dudai (2004). A nosotros nos parece evidente que la atención es el traslape de los procesos de aprendizaje y de evocación, como bien ha sido comentado antes (Sarter y cols, 2006; Pepeu y Giovannini, 2004). La activación del sistema colinérgico anterior es requisito para la atención sostenida, y ésta a su vez para la correcta adquisición de información, consolidación y evocación (Pepeu y Giovannini, 2004).

Diversos experimentos han mostrado que la activación de los mecanismos de atención es necesaria para mantener el procesamiento de la información y eventualmente estabilizar la memoria. Es notable la similitud entre los procesos de atención y los de la memoria de trabajo, cuya existencia es hasta cierto punto solo teórica. De igual manera, la MCP comparte características con la atención selectiva. Es posible que la única diferencia sea que en los procesos de atención es necesaria la intervención de la corteza prefrontal y del hipocampo, mientras que en la MCP, considerada como una propiedad elemental de todos los sistemas de procesamiento (Squire, 1986) puede no serlo.

Pasemos a los mecanismos neurofisiológicos de la atención. Es ampliamente aceptado que la transmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos de la corteza, especialmente de la prefrontal, y del hipocampo, proveniente de los núcleos colinérgicos del cerebro basal anterior, es esencial para generar y mantener la atención selectiva, así como para la detección de señales ambientales (Hasselmo y Sarter, 2011; Pepeu y Giovannini, 2004). Se ha demostrado que ante la presentación de señales diversas, sean luminosas, auditivas, olfativas, etc., surge la correspondiente respuesta de orientación – p.ej. olfateo ante la estimulación olfativa – y se detienen otras conductas – p.ej. de acicalamiento – y aumenta la actividad colinérgica en las cortezas respectivas a la modalidad sensorial, así como en la corteza prefrontal y en el hipocampo (Hasselmo y Sarter, 2011; Robinson y cols, 2011; Pepeu y Giovannini, 2004). Interesantemente, la destrucción o inactivación de las proyecciones colinérgicas hacia la corteza prefrontal, disminuye dramáticamente la respuesta de orientación y la detección de señales, y evita el aumento de liberación de ACh en las cortezas sensoriales (Hasselmo y Sarter, 2011; Robinson y

cols, 2011). La función de la corteza prefrontal parece esencial para los mecanismos que filtran y descartan la información irrelevante, pues sus proyecciones modulan la actividad colinérgica del cerebro basal anterior, y por lo tanto el ingreso colinérgico cortical (Sarter y cols, 2005). Por otro lado, se ha propuesto que el hipocampo sirve como compuerta para incrementar el procesamiento de las señales externas durante la adquisición de información, evitando el ingreso de información cortical preexistente, mientras que durante la evocación, ocurre el proceso inverso (Hasselmo y Sarter, 2011).

La liberación de ACh muestra una relación lineal con el grado de novedad o relevancia para el sujeto (y por lo tanto la probabilidad de generar memoria). De tal manera, aumenta ante un estímulo nuevo o conocido por su asociación nociva y disminuye conforme el estímulo se vuelve familiar y no indica consecuencias relevantes (Pepeu y Giovannini, 2004; Miranda y cols, 2000; Acquas y cols, 1996; Shimura y cols, 1995). Esta parece ser la base de fenómenos tales como la habituación o la inhibición latente, los cuales debilitan el condicionamiento de un estímulo.

En la escala temporal, el pico de liberación de ACh evocado por estimulación sensorial varía según el modelo empleado. Puede presentarse tan pronto como a 1.5 seg en aprendizajes asociativos apetitivos en los que la recompensa demora un par de segundos (Hasselmo y Sarter, 2011), mientras que durante la estimulación gustativa (mantenida por 10 min) el pico se presenta aproximadamente a los 30 min de su inicio (Shimura y cols, 1995). Por su parte, el mantenimiento de altos niveles también varía. En la estimulación gustativa, el retorno a niveles basales ocurre entre 60 – 80 min después de su inicio (Shimura y cols, 1995). Es interesante notar la coincidencia de tiempo entre la presentación del pico de liberación de ACh con el tipo de información adquirida y el tiempo máximo de asociación con otro estímulo. Para los sistemas sensoriales de procesamiento “rápido” como la vista y el oído, tanto el pico de liberación de ACh como el máximo retraso para asociarse con otro estímulo, coinciden en los dos segundos posteriores a la estimulación inicial. En el caso del sentido gustativo, íntimamente ligado a los procesos digestivos relativamente “lentos”, es posible retardar la presentación de un estímulo nocivo varias horas y aún asociarse con el estímulo gustativo inicial. Interesantemente, el retraso que induce máxima asociación es de 30 – 60 min (Bures, 1998), coincidiendo con el pico de liberación de ACh en corteza insular (30 min de iniciada la estimulación) y el retorno a la línea basal (60 – 80 min). Si bien el tiempo en que ocurre el pico y la duración de niveles altos varía según la modalidad sensorial, en todos los casos el aumento es prácticamente inmediato a la

estimulación. Esto explicaría por qué los efectos amnésicos de antagonistas muscarínicos se limitan a su administración previa a la estimulación. Es muy probable que la hiperexcitabilidad cortical sostenida generada por ACh, sea inmediata y mantenga la codificación del estímulo condicionado el tiempo suficiente para el arribo del estímulo incondicionado (Hasselmo y Sarter, 2011), permitiendo su asociación. Aún más, la duración de la memoria estaría determinada prácticamente desde el inicio de la estimulación sensorial, pues a mayor relevancia, mayor liberación de ACh y mayor probabilidad de consolidación. Incluso parecería una propiedad intrínseca de los estímulos nuevos, intensos y relevantes, la promoción de los procesos de consolidación, pues la activación del sistema colinérgico del cerebro basal anterior, no solo se relaciona con los estados de atención selectiva, sino también con la inducción de sueño MOR (Nishino y cols, 1998), durante el cual se facilita la consolidación (Carr y cols, 2011; Diekelmann y Born, 2010). El cambio del estado de vigilia activa, durante el cual la atención del sujeto está dirigida a los estímulos ambientales, a un estado de vigilia pasiva o incluso a etapas de sueño, sería una estrategia muy adecuada para redirigir los recursos de procesamiento hacia la reelaboración de la información existente en el sistema nervioso, es decir, para consolidar la memoria.

Dos manipulaciones facilitarían la permanencia de la memoria, un nuevo ensayo de adquisición, o uno de evocación. Si hay un nuevo ensayo (condiciones idénticas al primero) se fortalece la asociación y el procesamiento de la memoria, incrementando su permanencia. Si se presenta solo el estímulo condicionado como señal de evocación, dos posibilidades surgen: a) presentado poco tiempo después de la adquisición (<4 h), se reactiva la representación del estímulo incondicionado, generando más aprendizaje, aún en su ausencia. Esta condición sería idéntica a un nuevo ensayo de adquisición, en términos de actividad neuronal; b) presentado mucho tiempo después (>8 h) la presentación del estímulo condicionado reactiva su propia representación, fortaleciéndola, pero no reactiva la representación del incondicionado. Como consecuencia, se genera la extinción del aprendizaje inicial, es decir ahora se aprende la ausencia del incondicionado y por lo tanto se reducen las posibilidades de permanencia de la memoria original.

En resumen, la información ingresa por los receptores apropiados, activa las vías primarias y se releva en el tálamo antes de pasar a sus cortezas respectivas. Paralelamente, es activado el

sistema colinérgico del cerebro basal y éste libera ACh en la corteza prefrontal y en el hipocampo. Las proyecciones prefrontales hacia los núcleos colinérgicos permiten la liberación de ACh en las cortezas sensoriales respectivas. De tal manera convergen las vías glutamatérgicas talámicas con las colinérgicas del cerebro basal anterior en la corteza, facilitando las representaciones sensoriales. La actividad generada por el estímulo incondicionado debería inducir una secuencia similar a partir de la modalidad sensorial respectiva, aumentando aún más la actividad en aquellas estructuras en las que converge la información y permitiendo los cambios plásticos propios de la memoria. Una vez que la atención es inducida por el estímulo relevante, la codificación se mantiene en los sistemas de MCP y activa los procesos de consolidación.

Perspectivas

Respecto a las funciones del BO durante el AAO:

1. El procesamiento de información en el BO es complejo. Las proyecciones centrífugas que recibe no se limitan a las colinérgicas, pues también existen adrenérgicas, serotoninérgicas y GABAérgicas, además de las glutamatérgicas provenientes de la propia corteza olfativa. Es necesario estudiar sus funciones durante el procesamiento del AAO, así como sus interacciones con las vías colinérgicas. Por ejemplo, sabemos que la activación de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos incrementan la excitabilidad de células mitrales del BO, facilitando la detección de estímulos débiles (Matsutani y Yamamoto, 2008). ¿Este mecanismo es redundante al descrito por efectos de ACh, o es complementario?
2. ¿Qué papel tiene la interacción recíproca entre BO y corteza olfativa en el procesamiento olfativo? ¿Podría explicar el mantenimiento de la información a pesar de la administración de escopolamina en el BO?

Respecto a la neurotransmisión colinérgica durante el AAO:

1. Cuantificar la liberación de ACh en el BO y en otras regiones, como la corteza prefrontal, el hipocampo y la Ami, en las diferentes fases del AAO. Esto ayudará a determinar en qué regiones y en qué etapas es requerida la ACh. Según nuestras consideraciones, esperaríamos que durante los estados de vigilia pasiva o sueño REM posteriores al condicionamiento la actividad colinérgica en el hipocampo, por ejemplo, promoviera la consolidación. También esperaríamos que durante la evocación la actividad colinérgica en hipocampo y en corteza prefrontal fuera necesaria.
2. Es necesario explorar paralelamente la función de los receptores nicotínicos, pues no todos los efectos de ACh pueden explicarse a través de la activación de los muscarínicos.

Respecto a los mecanismos facilitadores o limitantes de la consolidación:

1. A partir de la cuantificación en diversas estructuras, como las vías sensoriales primarias, o aquellas relacionadas con la atención como corteza prefrontal e hipocampo, de la liberación de ACh ante estímulos olfativos de diferente intensidad, relacionar la duración de la memoria en pruebas de corto y largo plazo. Sería una forma de encontrar, si es que existe, el “umbral” de actividad colinérgica necesario para la consolidación del AAO.

Bibliografia

Abel T, Kandel E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 26(2-3):360-78.

Abrams TW, Kandel ER. Is contiguity detection in classical conditioning a system or a cellular property? Learning in *Aplysia* suggests a possible molecular site. *Trends Neurosci* 1988; 11(4):128-35.

Acquas E, Wilson C, Fibiger HC. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci* 1996; 16(9):3089-96.

Albright TD, Kandel ER, Posner MI. Cognitive neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10(5):612-24.

Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. Neural Topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71(1):1-18.

Andrews EA, Braveman NS. The combined effects of dosage level and interstimulus interval on the formation of one-trial poison-based aversions in rats. *Anim Learn Behav* 1975; 3(4): 287-89.

Anglade F, Chapouthier G, Dodd RH, Baudoin C. Olfactory memory in rats, cholinergic agents and benzodiazepine receptor ligands. *J Physiol Paris* 1999; 93(3):225-32.

Auerbach JM, Segal M. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol* 1996; 492(Pt 2):479-93.

Aura J, Sirviö J, Riekkinen P Jr. Methoctramine moderately improves memory but pirenzepine disrupts performance in delayed non-matching to position test. *Eur J Pharmacol* 1997; 333(2-3):129-34.

Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24):13445-52.

Baratti CM, Boccia MM, Blake MG. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(2):148-54.

Barco A, Bailey CH, Kandel ER. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 2006; 97(6):1520-33.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience. Exploring the brain. 2a ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA. 2001.

Berman DE, Dudai Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 2001; 291(5512):2417-9.

Bermúdez Rattoni F, Prado Alcalá R. Memoria. Dónde reside y cómo se forma. Trillas, México. 2001.

Breer H. Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. *Anal Bioanal Chem* 2003; 377(3):427-33.

Bouton ME, Moody EW. Memory Processes in classical conditioning. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28(7):663-74.

Bunce JG, Sabolek HR, Chrobak JJ. Intraseptal infusion of the cholinergic agonist carbachol impairs delayed-non-match-to-sample radial arm maze performance in the rat. *Hippocampus* 2004; 14(4):450-9.

Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T. Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind. Oxford University Press, USA. 1998.

Camarota M, Barros DM, Vianna M, Bevilaqua L, Coitinho A, Szapiro G, Izquierdo L, Medina J, Izquierdo I. The transition from memory retrieval to extinction. *An Acad Bras Cienc* 2004; 76(3):573-82.

Cano-Lozano V, Gauthier M. Effects of the muscarinic antagonists atropine and pirenzepine on olfactory conditioning in the honeybee. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59(4):903-7.

Carr MF, Jadhav SP, Frank LM. Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat Neurosci* 2011; 14(2):147-53.

Castillo PE, Carleton A, Vincent JD, Lledo PM. Multiple and opposing roles of cholinergic transmission in the main olfactory bulb. *J Neurosci* 1999; 19(21):9180-91.

Chapuis J, Messaoudi B, Ferreira G, Ravel N. Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behav Neurosci* 2007; 121(6):1383-92.

Chapuis J, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Ferreira G, Gervais R, Ravel N. The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *J Neurosci* 2009; 29(33):10287-98.

Coull JT. Neural correlates of attention and arousal: insights from electrophysiology, functional neuroimaging and psychopharmacology. *Prog Neurobiol* 1998; 55(4):343-61.

Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Briñón JG, Alonso JR, Domínguez MI, Martínez-Guijarro FJ. Subcellular localization of m2 muscarinic receptors in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2000; 12(11):3963-74.

Crowder RG. Short-term memory: where do we stand? *Mem Cognit* 1993; 21(2):142-5.

Davis RL. Olfactory learning. *Neuron* 2004; 44(1):31-48.

de la Fuente V, Freudenthal R, Romano A. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci* 2011; 31(15):5562-73.

DeMaria S, Ngai J. The cell biology of smell. *J Cell Biol* 2010; 191(3):443-52.

Desgranges B, Lévy F, Ferreira G. Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Res* 2008; 1236:166-75.

Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11(2):114-26.

Douglas CL, Baghdoyan HA, Lydic R. M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in prefrontal cortex of C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(3):960-6.

Douglas CL, Baghdoyan HA, Lydic R. Prefrontal cortex acetylcholine release, EEG slow waves, and spindles are modulated by M2 autoreceptors in C57BL/6J mouse. *J Neurophysiol* 2002; 87(6):2817-22.

Dudai Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(2):211-6.

Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 2004; 55:51-86.

Dudai Y, Eisenberg M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 2004; 44(1):93-100.

Dux PE, Marois R. How humans search for targets through time: A review of data and theory from the attentional blink. *Atten Percept Psychophys* 2009; 71(8): 1683–1700.

El-Etri MM, Ennis M, Griff ER, Shipley MT. Evidence for cholinergic regulation of basal norepinephrine release in the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 1999; 93(2):611-7.

Engelmann M. Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2009; 91(1):58-65.

Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F. In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res* 1998; 779(1-2):314-9.

Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 2000; 852(1):208-12.

Everitt BJ, Robbins TW. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 1997; 48:649-84.

Ferreira G, Gutiérrez R, De La Cruz V, Bermúdez-Rattoni F. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 2002; 16(6):1139-45.

Ferry B, Sandner G, Di Scala G. Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol Learn Mem* 1995; 64(2):169-80.

Ferry B, Oberling P, Jarrard LE, Di Scala G. Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behav Neurosci* 1996; 110(3):443-50.

Ferry B, di Scala G. Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 67(1):80-3.

Ferry B, Ferreira G, Traissard N, Majchrzak M. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* 2006; 120(5):1180-6.

Fletcher M Wilson D. Experience modifies olfactory acuity: acetylcholine-dependent learning decreases behavioral generalization between similar odorants. *J Neurosci* 2002; 22(2):1-5.

Fournier GN, Semba K, Rasmusson DD. Modality- and region-specific acetylcholine release in the rat neocortex. *Neuroscience* 2004;126(2):257-62.

Forbes JM. Consequences of feeding for future feeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 128(3):463-70.

Gais S, Born J. Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(7):2140-4.

Gao Y, Strowbridge BW. Long-term plasticity of excitatory inputs to granule cells in the rat olfactory bulb. *Nat Neurosci* 2009; 12(6):731-3.

García J, Kimeldorf DJ, Koelling RA. Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 1955; 122(3160):157-8.

Gauthier M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. *Adv Exp Med Biol* 2010; 683:97-115.

Glanzman DL. Associative learning: Hebbian flies. *Curr Biol* 2005; 15(11): R416-9.

Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 80(3):194-210.

Gutiérrez R, Rodríguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Núñez-Jaramillo L, Bermudez-Rattoni F. Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 80(3):323-31.

Hankins WG, Garcia J, Rusiniak KW. Dissociation of odor and taste in baitshyness. *Behav Biol* 1973; 8(3):407-19.

Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16(6):710-5.

Hasselmo ME, Sarter M. Modes and Models of Forebrain Cholinergic Neuromodulation of Cognition. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36(1):52-73.

Haupt TA, Berlin R. Rapid, labile, and protein synthesis-independent short-term memory in conditioned taste aversion. *Learn Mem* 1999; 6(1):37-46.

Inglis FM, Day JC, Fibiger HC. Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal. *Neuroscience* 1994; 62(4):1049-56.

Inglis FM, Fibiger HC. Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 1995; 66(1):81-6.

Inoue T, Strowbridge BW. Transient activity induces a long-lasting increase in the excitability of olfactory bulb interneurons. *J Neurophysiol* 2008; 99(1):187-99.

Isaacson JS. Odor representations in mammalian cortical circuits. *Curr Opin Neurobiol* 2010; 20(3):328-31.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 1997; 22(4):507-1515.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia*. 4a ed. McGraw-Hill-Interamericana, España. 2001.

Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A. Acetylcholine and attention. *Behav Brain Res* 2010; Nov 23.

Kosower EM. A molecular basis for learning and memory. *Proc Natl Acad Sci* 1972; 69(11):3292-6.

Kyriazakis I, Tolkamp BJ, Emmans G. Diet selection and animal state: an integrative framework. *Proc Nutr Soc* 1999; 58(4):765-72.

Lamprecht R, Hazvi S, Dudai Y. cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *J Neurosci* 1997; 17(21):8443-50.

Lévy F, Richard P, Meurisse M, Ravel N. Scopolamine impairs the ability of parturient ewes to learn to recognize their lambs. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 129(1):85-90.

Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. Muscarinic acetylcholine receptor-dependent induction of persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 2007; 144(2):754-61.

Linster Ch Hasselmo ME. Neural activity in the horizontal limb of the diagonal band of Broca can be modulated by electrical stimulation of the olfactory bulb and cortex in rats. *Neurosci Lett* 2000; 282(3):157-60.

Litvin OO, Anokhin KV. Mechanisms of memory reorganization during retrieval of acquired behavioral experience in chicks: the effects of protein synthesis inhibition in the brain. *Neurosci Behav Physiol* 2000; 30(6):671-8.

Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* 2005; 85(1):281-317.

Lucas F, Sclafani A. Carbohydrate-conditioned odor preferences in rats. *Behav Neurosci* 1995; 109(3):446-54.

Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch.* 2003; 446(1):17-29.

Maren S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* 2005; 47(6):783-6.

Martin LT, Lawrence CD. The importance of odor and texture cues in food aversion learning. *Behav Neural Biol* 1979; 27(4):503-15.

Matsutani S, Yamamoto N. Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anat Sci Int* 2008; 83(4):218-27.

Menon V, Uddin L. Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. *Brain Struct Funct* 2010; 214(5-6): 655–667.

Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. 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 USA* 1999; 96(11):6478-82.

Miranda MI, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 2000; 882(1-2):230-5.

Morgado Bernal I. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* 2011; 176:12-9.

Mouly AM, Gervais R, Holley A. Evidence for the involvement of rat olfactory bulb in processes supporting long-term olfactory memory. *Eur J Neurosci* 1990; 2(11):978-84.

Myers KP, Sclafani A. Development of learned flavor preferences. *Dev Psychobiol* 2006; 48(5):380-8.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 2000; *Neurosci*; 1(3):216-9.

Nader K, Hardt O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10(3):224-34.

Nagao H, Yamaguchi M, Takahash Y, Mori K. Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. *Microsc Res Tech* 2002; 58(3):168-75.

Naor C, Dudai Y. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 1996; 79(1-2):61-7.

Okutani F, Yagi F, Kaba H. Gabaergic control of olfactory learning in young rats. *Neuroscience* 1999; 93(4):1297-300.

Orsetti M, Casamenti F, Pepeu G. Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res* 1996; 724(1):89-96.

Packard MG, Regenold W, Quirion R, White NM. Post-training injection of the acetylcholine M2 receptor antagonist AF-DX 116 improves memory. *Brain Res* 1990; 524(1):72-6.

Palmerino CC, Rusiniak KW, Garcia J. Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 1980; 208(4445):753-5.

Paxinos G, Watson Ch. *The rat brain. In stereotaxic coordinates*. 4° ed. Academic Press. USA, 1998.

Pearce JM. Las condiciones para el aprendizaje: sorpresa y atención, en: *Aprendizaje y cognición*. Ariel, España. 1998.

Pelletier JG, Paré D. Role of amygdala oscillations in the consolidation of emotional memories. *Biol Psychiatry* 2004; 55(6):559-62.

Pepeu G, Giovannini M. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem* 2004; 11(1):21-7.

Pressler RT, Inoue T, Strowbridge BW. Muscarinic receptor activation modulates granule cell excitability and potentiates inhibition onto mitral cells in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 2007; 27(41):10969-81.

Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, Parent A, White N, Meaney MJ. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M(2)-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired. *J Neurosci* 1995;15(2):1455-62.

Raineki C, Shionoya K, Sander K, Sullivan RM. Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learn Mem* 2009; 16(2):114-21.

Ramírez-Lugo L, Miranda MI, Escobar ML, Espinosa E, Bermúdez-Rattoni F. The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 79(2):184-93.

Ravel N, Akaoka H, Gervais R, Chouvet G. The effect of acetylcholine on rat olfactory bulb unit activity. *Brain Res Bull* 1990; 24(2):151-5.

Ravel N, Elaagouby A, Gervais R. Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behav Neurosci* 1994; 108(2):317-24.

Redondo RL, Morris RG. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12(1):17-30.

Rezayof A, Darbandi N, Zarrindast MR. Nicotinic acetylcholine receptors of the ventral tegmental area are involved in mediating morphine-state-dependent learning. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 90(1):255-60.

Richter K, Wolf G, Engelmann M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn Mem* 2005; 12(4):407-13.

Robinson L, Platt B, Riedel G. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res* 2011; 221(2):443-65.

Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* 1999; 64(6-7):501-9.

Rusiniak KW, Hankins WG, Garcia J, Brett LP. Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behav Neural Biol* 1979; 25(1):1-17.

Saghatelian A, Carleton A, Lagier S, de Chevigny A, Lledo PM. Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb. *J Physiol Paris* 2003; 97(4-6):517-28.

Salamon E. Mechanisms of knowledge learning and acquisition. *Med Sci Monit* 2002; 8(7):RA133-9.

Sarter M, Gehring WJ, Kozak R. More attention must be paid: the neurobiology of attentional effort. *Brain Res Rev* 2006; 51(2):145-60.

Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B. Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 48(1):98-111.

Scalera G. Effects of conditioned food aversions on nutritional behavior in humans. *Nutr Neurosci* 2002; 5(3):159-88.

Schreurs BG, Alkon DL. *Imaging Learning and Memory: Classical Conditioning*. *Anat Rec*. 2001; 265(6):257-73.

Sclafani A. How food preferences are learned: laboratory animal models. *Proc Nutr Soc* 1995; 54(2):419-27.

Segal M, Auerbach JM. Muscarinic receptors involved in hippocampal plasticity. *Life Sci* 1997; 60(13-14):1085-91.

Shiba K, Machida T, Uchida S, Hotta H. Effects of nicotine on regional blood flow in the olfactory bulb in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 546(1-3):148-51.

Shimura T, Suzuki M, Yamamoto T. Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Res* 1995; 679(2):221-6.

Shiple MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 1996; 30(1):123-76.

Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC. What the rat's nose tells the rat's mouth: Long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors. *Anim Learn Behav* 1997; 25(3): 357-69.

Squire LR. *Mechanisms of Memory*. *Science* 1986; 232(4758):1612-9.

Squire LR. *Memory and brain*. Oxford University Press. New York, USA. 1987.

- Squire LR, Knowlton B, Musen G. The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 1993; 44:453-95.
- Sutherland R, Lehmann H. Alternative conceptions of memory consolidation and the role of the hippocampus at the systems level in rodents. *Curr Opin Neurobiol* 2011; 21: 1-6.
- Wallenstein GV, Hasselmo ME. GABAergic modulation of hippocampal population activity: sequence learning, place field development, and the phase precession effect. *J Neurophysiol* 1997; 78(1): 393-408.
- Wanisch K, Wotjak CT, Engelmann M. Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behav Brain Res* 2008; 186(2):191-6.
- Welzl H, D'Adamo P, Lipp HP. Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behav Brain Res* 2001; 125(1-2):205-13.
- Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44:423-50
- Wilson DA, Sullivan RM. Neurobiology of associative learning in the neonate: Early olfactory learning. *Behav Neural Biol* 1994; 61(1):1-18.
- Wilson DA, Fletcher ML, Sullivan RM. Acetylcholine and olfactory perceptual learning. *Learn Mem* 2004; 11(1):28-34.
- Wirth S, Lehmann O, Bertrand F, Lazarus C, Jeltsch H, Cassel JC. Preserved olfactory short-term memory after combined cholinergic and serotonergic lesions using 192 IgG-saporin and 5,7-dihydroxytryptamine in rats. *Neuroreport* 2000; 11(2):347-50.
- Wolf NJ. A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol* 1998; 55(1):59-77.
- Yeomans MR. Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiol Behav* 2006; 89(1):10-4.
- Zhang JJ, Okutani F, Huang GZ, Taniguchi M, Murata Y, Kaba H. Common properties between synaptic plasticity in the main olfactory bulb and olfactory learning in young rats. *Neuroscience* 2010; 170(1):259-67.
- Zola-Morgan S, Squire L. Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16:547-63.

ANEXO



Association of stimuli at long intervals in conditioned odor aversion

Jorge Tovar-Díaz, Héctor González-Sánchez, Gabriel Roldán-Roldán *

Laboratory of Behavioral Neurobiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2010
Received in revised form 9 February 2011
Accepted 9 February 2011

Keywords:

Odor aversion learning
Short term memory
Inter-stimulus interval

ABSTRACT

Rats learn to avoid a tasteless odorized solution if they experience visceral malaise after consuming it. This phenomenon is referred as Conditioned Odor Aversion (COA). It is widely accepted that an odor can only be associated with illness if the inter-stimulus interval (ISI) is shorter than 15 min. However, this conclusion is based on long-term memory tests usually made 48 h after conditioning, thus precluding the possibility to discriminate between a specific failure to make the odor–malaise association rather than the failure to consolidate the short-term association into long-term memory. In the present study, we compared the short-term and long-term memories for COA in rats trained with long ISIs. Independent groups of male rats were conditioned using 5, 15, 30, 60 or 90 min ISIs and tested either 4 or 48 h after conditioning. We found a reliable odor aversion at 5, 15, 30 and 60 min, but not at 90 min ISIs, when tested 4 h after conditioning. In contrast, odor aversion was only found at 5 and 15 min ISIs in the groups tested 48 h after training. Our results show that COA can be acquired when malaise follows the odor CS by at least 60 min. This finding indicates that the lack of aversion at long ISIs is not due to an association failure, but rather to a limitation in consolidating short-term memory into long-term memory of COA.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Conditioned Odor Aversion (COA) is a form of classical conditioning in which rats learn to avoid the consumption of an odorized tasteless solution (conditioned stimulus, CS) that was previously paired with visceral malaise (unconditioned stimulus, US) [1–4]. Most forms of classical conditioning yield optimum results only when the CS precedes the US by a few seconds [5,6]. Conditioned taste aversion (CTA) and COA are notable exceptions, since both of them can be obtained even with a long inter-stimulus interval (ISI) of several hours for CTA [5,7–9] and up to 15 min for COA.

Since the classic research of Garcia [2] and coworkers a reliable COA has been observed using ISIs that range from 0 to 5 min [3,10], following a steep gradient for odor–illness conditioning, in which ISIs of 15 min produced an attenuated COA and longer ISIs (i.e., 30 min) were ineffective in inducing odor aversion [2]. More recent papers confirmed these earlier reports and extended them by showing that COA can be acquired at longer ISIs only after particular manipulations that facilitate the CS–US association, i.e., lesions of entorhinal cortex, blockade of the basolateral amygdala GABA_A receptors, and proximal presentation of the odor diluted in the drinking water [1,4,11–13]. The standard account for facilitated as well as simple COA is that memory

for the odor CS is only associated with the malaise US during a limited time interval lasting less than 15 min [1,11,12]. According to this idea, the odor memory trace decays rapidly, which prevents its association with the US at longer ISIs. Consequently, the facilitation effects correspond to lengthening the persistence of the odor memory trace so it can associate with the delayed US [1,11–13].

There is however, an alternative account for all the COA results mentioned here, because these interpretations were based on retention tests given 48 h after conditioning that evaluated long-term memory (LTM) for the odor association [1–4,10,11,14]. According to the standard interpretation, there is a failure of the odor association at long ISIs, but an alternative is that the association failed to be consolidated into LTM, which is why it could not be detected 48 h after conditioning.

Since the lack of association between the olfactory CS and visceral US has been the key argument to explain both the failure to achieve delayed COA and also the facilitation of COA by different manipulations such as odor aversion potentiated by taste, it is important to evaluate the validity of this standard interpretation. We therefore investigated whether odor and illness can be associated after long ISIs by testing short-term memory (STM) and comparing it with LTM of COA. For the purpose of the present study STM and LTM refer to conditioned response retention 4 h and 48 h after the presentation of the CS, respectively. These testing times were chosen on the basis of pilot experiments and previous reports showing that between 2 and 3 h is a suitable interval for reliable retrieval testing without interference of the US aftereffects [15–17], whereas 48 h is the standard for LTM tests.

* Corresponding author at: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70-250, 04510, D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5623 2364; fax: +52 55 5623 2241.

E-mail address: gabaergico@gmail.com (G. Roldán-Roldán).

2. Materials and methods

2.1. Animals

One hundred and twenty nine adult male Wistar rats (250–300 g) obtained from the breeding colony of the Faculty were used. Animal care and experimental procedures were in accordance with the rules established by the ethics committee of the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México according to the Mexican Laws for Animal Care, which comply with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 80–23, revised 1996). Rats were kept two per cage in the vivarium of the laboratory under a 12–12 h light–dark cycle (lights on at 0800 h), with *ad libitum* access to food and tap water until experiments began.

2.2. Apparatus

Experiments were carried out in a plastic box (47×32×20 cm) equipped with two 30 ml pipettes mounted on the internal lateral walls of the box. The tip of each pipette was positioned 10 cm above the floor and 1 cm apart from a 1.5-cm circular hole made in both lateral walls. A 3-cm filter paper disk was placed inside a plastic bottle cap (“essence cap”), which was externally attached to each hole.

2.3. Behavioral testing

Independent groups of rats were deprived of water for 24 h and submitted to a COA training paradigm for five consecutive days in which they were allowed to drink water for 10 min as follows: On Day 1, rats were placed in the conditioning box and permitted to drink water from both pipettes. On Day 2, 0.2 ml of McCormick's vanilla odor extract (innocuous stimulus, IS) was placed in both essence caps and rats drank in the presence of the odor. On Day 3, the rats were allowed to drink again and experience the CS, which was the same amount of McCormick's almond odor extract applied to both essence caps. After 5, 15, 30, 60 or 90 min rats received the US, an IP injection of 0.15 M LiCl 2% BW. Control rats received an IP injection of physiological saline instead of LiCl 5 min after the CS. Four hours after the presentation of the CS, rats assigned to the STM test were returned to the conditioning box and allowed to choose between the two pipettes, one scented with the IS the other with the CS. On Day 4, rats assigned to the LTM test drank water again in the conditioning box to rehydrate them, and on the fifth day (i.e., 48 h after CS), they were permitted to drink from the two pipettes, one scented with the IS and the other with the CS. In order to rule out the possibility that preference for the non-conditioned IS might enhance the aversion to the CS during retrieval testing, two additional control groups were performed: rats were conditioned using a 5 min ISI, but were allowed to chose between tap water (without any odor) and the CS during the STM (4 h) and LTM (48 h) tests.

2.4. Data analysis

Water consumption was recorded for each rat and averaged for groups. Data were analyzed with GraphPad Prism 5 statistical software (San Diego, CA, USA) by using a one-way ANOVA and a Newman–Keuls multiple comparisons post-hoc test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Fig. 1 illustrates the results of the short and long term memory tests. Among the groups tested for STM 4 h after training, those conditioned with 5, 15, 30 and 60 min ISIs exhibited a clear aversion as indicated by very low water intake of the CS. The 90-min ISI group could not be distinguished from the saline-injected control group,

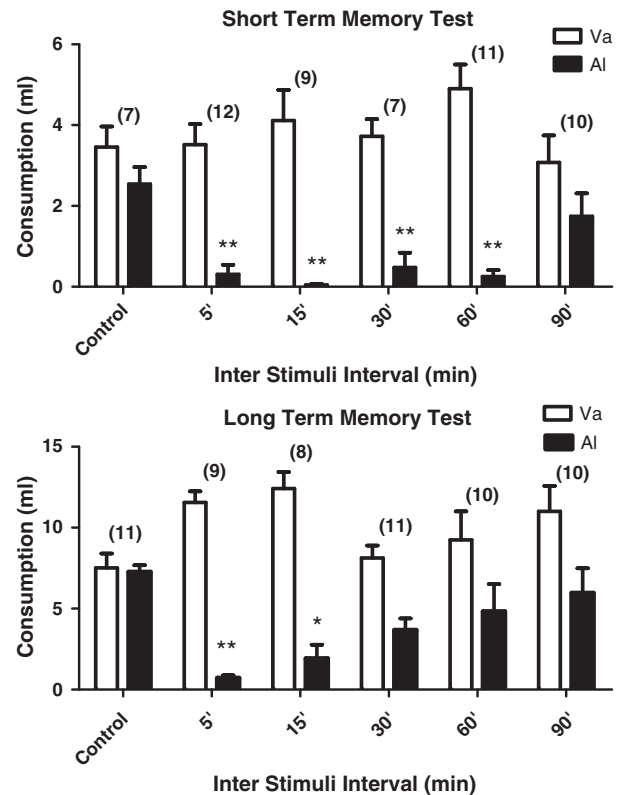


Fig. 1. Mean \pm SEM water consumption during STM and LTM retrieval tests, measured with 0.2 ml precision. Water intake of the IS (vanilla, Va) and the CS (almond, Al) are plotted together to show differences between consumption within each group. Neuman–Keuls post hoc test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Al control group. Values in parentheses are the number of rats per group.

indicating lack of aversion. Conversely, among the groups tested for LTM 48 h after training, only those conditioned with 5 min and 15 min ISIs displayed a strong and a mild aversion respectively, while the remaining groups (30, 60 and 90 min ISIs) showed no aversion. A one-way ANOVA confirmed a significant effect of the ISI on the preference for the CS ($F_{(11, 100)} = 15.5, p < 0.001$ and $F_{(11, 106)} = 9.68, p < 0.001$, for STM and LTM, respectively). A post-hoc Newman–Keuls multiple comparison test revealed significant differences between the saline injected control group and all the ISI groups (5, 15, 30 and 60 min; $p < 0.01$) except the 90 min group for the STM test. Moreover, the 5 and 15 min ISI groups differed from the control group ($p < 0.05$) for the LTM test.

Finally, rats showed a clear-cut aversion to the CS when tested against odorless water (Fig. 2). Furthermore, they drank a comparable amount of the odorless water than of the non-conditioned IS indicating that a possible preference for this stimulus did not contribute to the aversion found to the CS.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate whether odor and illness can be associated at long ISIs by comparing STM and LTM of COA. Our main finding is that the STM test revealed that odor and illness can be reliably associated at ISIs as long as 60 min, which is at least three times longer than previously reported for orthonasal (distal) odor presentation. This finding demands a reconsideration of the standard understanding of the strength of the odor memory trace and its relative importance in food-related aversion learning.

We tested LTM to verify that in our hands COA is comparable to that of other researchers [1–3,10]. Confirming prior work, we did not find COA at ISIs longer than 15 min when tested 48 h after conditioning. Even

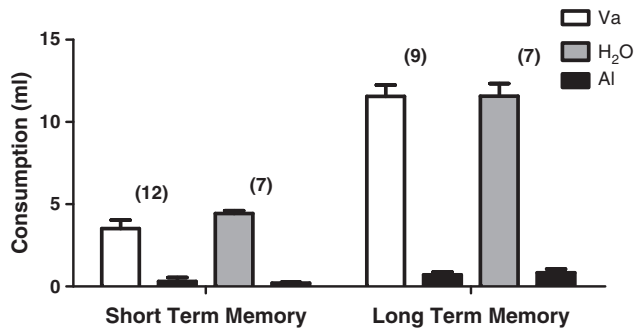


Fig. 2. Mean \pm SEM consumption of the IS (vanilla, Va), the CS (almond, Al), and odorless water (H₂O) during the STM and LTM retrieval tests. Data of the groups Va vs. Al are the same of the groups trained with 5 min ISI depicted in Fig. 1, and are shown here for comparison. One-way ANOVA: $F_{(7, 62)} = 122.1$, $p < 0.0001$. Post hoc Neuman-Keuls test revealed no significant differences between Va and H₂O intakes nor between Al intake in the respective STM and LTM groups ($p > 0.05$). Values in parentheses are the number of rats per group.

though there are reports of reliable COA at longer ISIs, the experimental conditions were either different from ours or special manipulations were needed to enhance the conditioning. The first difference is the method of odor presentation. Two methods of odor presentation have been used: distal (odor placed on a filter paper) and proximal (odor diluted in the drinking water). It has been reported that the proximal presentation of odor renders COA tolerant to ISIs of about 2 to 4 h [4,14]. The cause of this facilitation remains unclear, but it may be hypothesized that the odor could be associated with a delayed US because, as the odor was ingested, it may remain inside the body for a longer time and reach the nose through the breath [18,19]. In our study we used a distal presentation, which is only known to induce COA at shorter ISIs than the proximal CS presentation.

Second, manipulations such as lesions of the entorhinal cortex [1,13], blockade of GABA_A receptors [12], and odor aversion potentiated by taste [11] facilitate COA at longer ISIs. We did not use any particular manipulation to facilitate COA in our design, so no aversion was expected on the LTM test for ISIs greater than 15 min, an expectation we confirmed. There are additional differences in our experimental conditions compared to prior work, including previous use of a diversity of odors and their concentrations, specific unconditioned stimuli and their concentrations, and the number of CS–US pairings. Rather than go through the minutiae of these details, we have strictly compared our results only with the results from similar experimental conditions, and even included a LTM replication of prior work as a control. Our LTM results showed no aversion for ISIs longer than 15 min, in accord with the prior reports that used a distal odor presentation without additional manipulations. Taukulis [20] however, reported a clear long term odor aversion memory with ISIs up to 4 h using a device that permitted constant stream of odorized air limited to the end of the drinking spout. However, this manipulation also produced an undesired effect, i.e., the induction of neophobia in some proportion of animals, indicating that the CS might be very intense. Hence, it may be concluded that the effect of the CS delivery method was not limited to the odor source localization, but also to the odor intensity. Since the intensity of the CS is critical for toxicophobic conditioning [21,22], this difference may account for the apparent discrepancy between that study and the results presented here. Moreover, this method has been criticized by arguing that it may also produce a taste aversion as the odor was delivered directly into the rat's mouth while drinking [21].

Our STM test demonstrated that odor and visceral malaise can be associated even when a 60 min ISI is used, as indicated by a preference for the CS that was as low as any other effective interval. To our knowledge, this is the first time that STM for a COA was evaluated under the conditions and the aim established here. We are aware of

only one published test of STM [15], a scarcity that may be due to the long-lasting visceral malaise induced by LiCl (2–3 h after injection). Those authors tested the effect of infusing anisomycin into the basolateral amygdala on the STM and LTM of COA. The drug was infused 25 min before CS, and the US was administered 30 min after CS. When STM was tested a strong aversion was found despite drug effects, but no aversion was found at the LTM test [15], while the control group showed clear COA when tested either for STM or LTM. The authors concluded that the anisomycin-induced block of protein synthesis impaired consolidation of the CS–US representation in long-term memory, rather than a direct effect on the CS memory alone or its association with the US. Since they found aversion using an ISI of 30 min their STM results appear to be in accordance with ours, but not their LTM results. However the proximal odor presentation they employed could have facilitated the conditioning.

Our results rule out an impaired odor–malaise association at long ISIs, leaving two possible explanations for the observation of STM but no LTM for COA at ISIs between 15 and 60 min. The data indicate either a failure of consolidation or of retrieval. In an attempt to clarify this issue, we tested COA 8 and 12 h after CS presentation in independent groups of rats conditioned with 60 min ISI. Results (data not shown) revealed a time-dependent decay of aversion, in which 8 h after conditioning, aversion remained as strong as when tested at 4 h (Mean \pm SEM CS intake in ml = 0.8 ± 0.3), while at 12 h the aversion dramatically decreased (CS = 2.2 ± 1.1). Therefore, we suggest that deficient consolidation accounts for the absence of LTM in long-delay COA.

It would be expected that once stimuli are associated and short (4 h) and even intermediate term memory (8 h) are successfully formed, consolidation should continue until LTM accomplishment; this however does not necessarily occur [23,24]. Our results suggest that although short and intermediate term memory tests revealed an effective conditioning, this cannot be taken as an unequivocal evidence of optimum learning. The presence of the conditioned response during early stages of deficient memory consolidation might not be unusual, but we are unaware of this fact because retrieval tests are rarely performed at those intervals.

As mentioned in the Introduction section, in order to explain COA it was followed the proposal, first applied to CTA [5], that a memory of the CS is stored during some time and then is in turn associated with the US [1,11,12]. This idea implies a rapid decay of odor memory, which prevents its association with visceral malaise at ISIs longer than 15 min in simple COA. Accordingly, in facilitated COA the odor memory is extended, making possible its association with the delayed malaise [1,11,12]. Thus, short odor trace endurance impairing association with delayed malaise has been the key argument for explaining absence of aversion at long ISIs. The clear aversion observed in our STM test suggests that this is not the case when ISIs around 60 min are used, because odor traces should necessarily last that interval to be associated with malaise. However, the argument could still be valid for longer ISIs because at 90 min no further aversion was observed.

We conclude that odor traces can endure at least an hour, three times longer than previously accepted and furthermore, that these enduring traces can be associated with visceral malaise and generate short-term aversive memory. However, for some still unexplained reason, an aversive association with the enduring odor trace is distinct because it does not successfully consolidate into a long-term memory.

Acknowledgments

This work was partly supported by a CONACyT graduate fellowship to Jorge Tovar-Díaz (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México). We thank Dr. Ignacio Camacho-Arroyo and Robyn E. Hudson (UNAM) for the helpful comments and Dr. André Fenton for the revision of the manuscript.

References

- [1] Ferry B, Oberling P, Jarrard LE, Di Scala G. Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behav Neurosci* 1996;110(3):443–50.
- [2] Palmerino CC, Rusiniak KW, Garcia J. Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 1980;208(4445):753–5.
- [3] Hankins WG, Garcia J, Rusiniak KW. Dissociation of odor and taste in baitshyness. *Behav Biol* 1973;8(3):407–19.
- [4] Chapuis J, Messaoudi B, Ferreira G, Ravel N. Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behav Neurosci* 2007;121(6):1383–92.
- [5] Bures J. The CTA paradigm: terminology, methods and conventions. In: Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T, editors. *Conditioned taste aversion: memory of a special kind*. New York: Oxford University Press; 1998. p. 14–25.
- [6] Garcia J, Hankins WG, Robinson JH, Vogt JL. Bait shyness: tests of CS–US mediation. *Physiol Behav* 1972;8(5):807–10.
- [7] Andrews EA, Braveman NS. The combined effects of dosage level and interstimulus interval on the formation of one-trial poison-based aversions in rats. *Anim Learn Behav* 1975;3:287–9.
- [8] Garcia J, Ervin FR, Koelling RA. Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychon Sci* 1966;5(3):121–2.
- [9] Holder MD, Garcia J. Role of temporal order and odor intensity in taste-potentiated odor aversions. *Behav Neurosci* 1987;101(2):158–63.
- [10] Rusiniak KW, Hankins WG, Garcia J, Brett LP. Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behav Neural Biol* 1979;25(1):1–17.
- [11] Ferry B, Sandner G, Di Scala G. Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol Learn Mem* 1995;64(2):169–80.
- [12] Ferry B, Di Scala G. Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 1997;67(1):80–3.
- [13] Ferry B, Ferreira G, Traissard N, Majchrzak M. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* 2006;120(5):1180–6.
- [14] Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC. What the rat's nose tells the rat's mouth: long delay aversion conditioning with aqueous odor and potentiation of taste by odors. *Anim Learn Behav* 1997;25:357–69.
- [15] Desgranges B, Levy F, Ferreira G. Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Res* 2008;1236:166–75.
- [16] Lamprecht R, Hazvi S, Dudai Y. cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *J Neurosci* 1997;17(21):8443–50.
- [17] Meachum CL, Bernstein IL. Behavioral conditioned responses to contextual and odor stimuli paired with LiCl administration. *Physiol Behav* 1992;52(5):895–9.
- [18] Maruniak JA, Mason JR, Kostelc JG. Conditioned aversions to an intravascular odorant. *Physiol Behav* 1983;30(4):617–20.
- [19] Yamada K. Conditioned aversion to an intraperitoneally injected odor CS in rats. *Shinrigaku Kenkyu* 1992;62(6):373–7.
- [20] Taukulis HK. Odor aversions produced over long CS–US delays. *Behav Biol* 1974;10(4):505–10.
- [21] Nachman M, Rauschenberger J, Ashe JH. Stimulus characteristics in food aversion learning. In: Milgram NW, Krames L, Alloway TM, editors. *Food aversion learning*. New York: Plenum Press; 1977. p. 105–31.
- [22] Panhuber H. Effect of odor quality and intensity on conditioned odor aversion learning in the rat. *Physiol Behav* 1982;28(1):149–54.
- [23] Wanisch K, Wotjak CT, Engelmann M. Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behav Brain Res* 2008;186(2):191–6.
- [24] Jüch M, Smalla KH, Kähne T, Lubec G, Tischmeyer W, Gundelfinger ED, et al. Congenital lack of nNOS impairs long-term social recognition memory and alters the olfactory bulb proteome. *Neurobiol Learn Mem* 2009;92(4):469–84.