



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL CONSUMO FORZADO O VOLUNTARIO SOBRE EL APRENDIZAJE  
AVERSIVO Y LA ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA AL SABOR**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TREJO CASTILLO MIREYA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.  
**DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de agosto de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **TREJO CASTILLO MIREYA** con número de cuenta **405048603**, con la tesis titulada **"EFECTO DEL CONSUMO FORZADO O VOLUNTARIO SOBRE EL APRENDIZAJE AVERSIVO Y LA ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA AL SABOR"**, realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN**:

Presidente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY  
Vocal: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
Secretario: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ  
Suplente: DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON  
Suplente: DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de noviembre de 2017

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización mis estudios de maestría (CVU: 627379 / No. de Becario: 330357).

A mi tutor principal el Dr. Gabriel Roldán Roldán y a los miembros de mi comité tutor la Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz y el Dr. Francisco Sotres Bayón por las revisiones, observaciones y sugerencias durante la realización de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mis padres y hermanos por el apoyo y amor incondicional que siempre me han brindado; por ser parte fundamental en la motivación e impulso para lograr este objetivo.

A Manuel del Castillo por ser mi amigo y compañero de vida. Por apoyarme incondicionalmente y animarme cada día a seguir superándome tanto profesional como personalmente, por todo el amor y alegría que me brindas.

Al Dr. Gabriel Roldán por haber guiado este proyecto, por compartir su experiencia y conocimientos y por todo el apoyo tanto académico como personal durante este tiempo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: a Jorge por el apoyo y entrenamiento en la realización de los experimentos, a Samuel, Heidy, Beth y Benjamín por las risas y momentos amenos compartidos.

*A mi familia*

*“Recordar es siempre reconstruir, no reproducir.”*

*Oliver Sacks*

*“Hay que haber comenzado a perder la memoria, aunque sea sólo a retazos para darse cuenta de que esta memoria es lo que constituye toda nuestra vida. Una vida sin memoria no sería vida... nuestra memoria es nuestra coherencia, nuestra razón, nuestra acción, nuestro sentimiento. Sin ella no somos nada...”*

*Luis Buñuel*

## ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Aprendizaje.....	3
Proceso de aprendizaje.....	4
Memoria.....	5
Tipos de memoria y sus características.....	5
Fases del proceso de memoria.....	8
Aprendizaje asociativo.....	9
Condicionamiento aversivo al sabor (CAS) como modelo de aprendizaje.....	10
Características particulares del CAS.....	11
Importancia del CAS con IIE largos.....	12
Estructuras cerebrales que participan en el CAS.....	12
ANTECEDENTES.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
METODOLOGÍA.....	19
Sujetos.....	19
Caja de condicionamiento.....	19
Análisis estadístico.....	19
EXPERIMENTO 1	
<i>1.1 Efecto de la doble evocación de la memoria (a corto plazo y largo plazo) sobre el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) empleando intervalos interestímulos (IIEs) largos.....</i>	20
Estímulos.....	20
Método.....	20



Resultados.....	22
<i>1.2 Efecto de la doble evocación de la memoria (a corto plazo y largo plazo) sobre el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) empleando dosis bajas de LiCl como estímulo incondicionado (EC).....</i>	23
Método.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	25
<b>EXPERIMENTO 2</b>	
<i>Reevaluación del aumento del intervalo interestímulo (IIE) sobre el condicionamiento aversivo al sabor (CAS).....</i>	26
Antecedentes.....	27
Método.....	28
Resultados.....	29
Discusión.....	32
<b>EXPERIMENTO 3</b>	
<i>3.1 Atenuación de la neofobia con el modelo de consumo con libre elección (ANLE), a distintas concentraciones de solución de sacarina.....</i>	33
Antecedentes.....	36
Método.....	37
Resultados.....	38
<i>3.2 Atenuación de la neofobia bajo el modelo de consumo forzado (ANF), a distintas concentraciones de solución de sacarina.....</i>	40
Método.....	41
Resultados.....	41
<i>3.3 Análisis de la ANF y la ANLE en el mismo grupo experimental.....</i>	44
Método.....	45
Resultados.....	45
Discusión.....	49
<b>EXPERIMENTO 4</b>	
<i>Efecto del consumo con libre elección y el consumo forzado sobre la inhibición latente (IL).....</i>	51

Antecedentes.....	51
Estímulos.....	52
Método.....	52
Resultados.....	53
Discusión.....	57
DISCUSIÓN GENERAL.....	59
CONCLUSIONES.....	62
LITERATURA CITADA.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Modelo de formación de memorias de Atkinson y Shiffrin.....	5
<i>Figura 2.</i> Taxonomía de los sistemas de memoria de largo plazo (MLP) en mamíferos...	8
<i>Figura 3.</i> Rutas neuronales involucradas en el procesamiento de estímulos gustativos y viscerales durante la formación de la memoria del sabor.....	14
<i>Figura 4.</i> Modelo de Condicionamiento Aversivo al Sabor.....	21
<i>Figura 5.</i> Escala de intervalos interestímulos (IIEs) empleados.....	21
<i>Figura 6.</i> Índices de preferencia (IP) registrados para los grupos evocados a corto plazo (MCP), largo plazo (MLP) y grupos evocados tanto a corto como a largo plazo (Reactivación).....	22
<i>Figura 7.</i> Metodología empleada durante el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) empleando dosis bajas de LiCl.....	24
<i>Figura 8.</i> Índices de preferencia (IP) registrados para los grupos evocados a corto plazo (MCP), largo plazo (MLP) y grupos evocados tanto a corto como a largo plazo (Reactivación).....	25
<i>Figura 9.</i> Escala de Intervalos Interestímulos utilizados para los grupos experimentales inyectados con LiCl, así como los momentos equivalentes a la 1ª y 2ª exposición a la sacarina en el grupo control inyectado con solución salina (SAL).....	28
<i>Figura 10.</i> Índices de preferencia (IP) durante la evocación de la memoria a corto (MCP) y largo plazo (MLP), condicionando a distintos intervalos interestímulo (IIE) utilizando solución de Sacarina 0.1% e inyección ip de LiCl 0.15M, 2% p.c.....	30
<i>Figura 11.</i> Comportamiento del consumo de sacarina 0.1%, registrado para los distintos grupos con IIE largo, así como para los grupos controles.....	31
<i>Figura 12.</i> Consumos totales (agua + sacarina 0.1%) registrados tanto a corto como a largo plazo para cada uno de los IIE empleados.....	31
<i>Figura 13.</i> Método de atenuación de la neofobia con consumo de libre elección (ANLE).....	38
<i>Figura 14.</i> Índices de preferencia (IP) obtenidos con el modelo de atenuación de la neofobia con libre elección (ANLE), empleando soluciones de Sacarina al 0.1%, 0.3% y 0.5% Vs Agua.....	39
<i>Figura 15.</i> Consumos de sacarina y consumos totales (sacarina+agua) obtenidos con el modelo de atenuación de la neofobia con consumo de libre elección (ANLE).....	40
<i>Figura 16.</i> Método de atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF).....	41
<i>Figura 17.</i> Consumo de sacarina (ml) obtenido bajo el modelo de atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF), empleando soluciones de Sacarina al 0.1%, 0.3% y 0.5%.....	42
<i>Figura 18.</i> Comparación del método de ANLE y ANF.....	43

<i>Figura 19.</i> Comparación del método de ANLE y ANF empleando Quininna 0.003%.....	44
<i>Figura 20.</i> Método de atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF) y consumo con libre elección (ANLE) aplicados de manera consecutiva en un mismo grupo.....	45
<i>Figura 21.</i> Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de Sacarina 0.1%.....	47
<i>Figura 22.</i> Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de Sacarina 0.3%.....	47
<i>Figura 23.</i> Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de Sacarina 0.5%.....	48
<i>Figura 24.</i> Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de Quinina 0.003%.....	49
<i>Figura 25.</i> Metodología empleada para la prueba de inhibición latente (IL) bajo condiciones de consumo forzado y consumo con libre elección.....	53
<i>Figura 26.</i> Efecto de la pre-exposición a Sacarina 0.5% de manera forzada vs con libre elección y la evocación de memoria aversiva a largo plazo (CAS) de manera forzada vs con libre elección en el modelo de IL.....	54
<i>Figura 27.</i> Efecto de la pre-exposición forzada a Sacarina 0.1% en la evocación de la memoria aversiva a largo plazo (MLP) con consumo de libre elección.....	55
<i>Figura 28.</i> Comparación de los consumos registrados en los grupos pre-expuestos de manera forzada a sacarina 0.1% (concentración baja) y sacarina 0.5% (concentración elevada) durante la prueba de IL.....	56
<i>Figura 29.</i> Efecto de la pre-exposición a Quinina 0.003% durante tres días, sobre la evocación de la memoria aversiva a largo plazo (CAS) en el modelo de IL.....	57
<i>Tabla A.</i> Interpretación de los eventos conductuales registrados durante las distintas pruebas de condicionamiento aversivo al sabor (CAS), atenuación de la neofobia (AN) e inhibición latente (IL).....	60

## ABREVIATURAS

CAS	Condicionamiento aversivo al sabor.
CAO	Condicionamiento aversivo al olor.
IIE	Intervalo interestímulo
EC	Estímulo condicionado.
EI	Estímulo incondicionado.
AN	Atenuación de la neofobia.
IL	Inhibición latente.
RC	Respuesta condicionada.
RI	Respuesta incondicionada.
MCP	Memoria de corto plazo.
MLP	Memoria de largo plazo.
IP	Índice de preferencia.
SAL	Solución salina.
Exp.	Exposición.
ANLE	AN con consumo voluntario o de libre elección.
ANF	AN mediante consumo forzado.
IL F	Inhibición latente con pre-exposición con consumo forzado.
IL LE	Inhibición latente con pre-exposición con consumo de libre elección.
CAS F	Condicionamiento con consumo forzado.
CAS LE	Condicionamiento con consumo de libre elección.

## RESUMEN

La supervivencia de un organismo depende en gran medida de la habilidad para discriminar correctamente entre un alimento nutritivo y otro potencialmente tóxico. Una forma de lograr esto es mediante la asociación entre las características organolépticas (sabor, olor, textura, temperatura, color) del alimento consumido y sus consecuencias post ingestas, de tal manera que el aprendizaje obtenido pueda ser recuperado mediante mecanismos mnémicos en encuentros posteriores con dicho alimento. En este contexto, el condicionamiento aversivo ha sido un modelo de aprendizaje ampliamente estudiado tanto con estímulos olfativos como gustativos. Se ha demostrado que la contigüidad en la presentación de los estímulos (unos cuantos segundos) es crucial para que estos puedan asociarse, siendo el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) la excepción a la regla y más recientemente el condicionamiento aversivo al olor (CAO), en donde también es posible establecer asociaciones con intervalos interestímulos (IIE) largos, sugiriendo que la falta de aprendizaje reportada en muchos estudios se debe a una consolidación deficiente de la memoria, más que a una falla en la asociación de los estímulos; dicha consolidación es posible cuando la memoria es “reactivada” a corto plazo.

Los primeros experimentos realizados en este trabajo estuvieron encaminados a determinar si esta reactivación de memoria también se presenta en el CAS, empleando condiciones subóptimas de aprendizaje (IIE largos y dosis bajas de estímulo condicionado, EC). Los resultados mostraron que, contrario a lo que sucede en CAO, la calidad de las memorias de corto (MCP) y largo plazo (MLP) se corresponde una con otra, es decir, es posible observar MLP sólo si se ha establecido la MCP, por lo que en este modelo no es posible encontrar condiciones que permitan observar el fenómeno de reactivación.

Dada la gran variedad de metodologías y por tanto de resultados relacionados con el efecto del IIE largo en el CAS, así como los resultados en el experimento anterior, decidimos llevar a cabo, bajo condiciones de aprendizaje óptimas, un estudio paramétrico de CAS, empleando IIEs largos. Se encontró que a diferencia de estudios previos, en el nuestro únicamente fue posible encontrar aversión hasta los 180 minutos, y a partir de los 240 si bien no se observó aversión, a diferencia de los grupos control, el desarrollo de preferencia por el sabor permaneció bloqueado. Para determinar cómo es que se lleva a cabo el desarrollo de la preferencia por un sabor, realizamos un estudio de atenuación de la neofobia (AN) y de inhibición latente (IL) empleando distintas concentraciones de solución de sacarina y quinina, así como dos métodos de presentación del estímulo de sabor: libre elección y consumo forzado. Encontramos que con un consumo de libre elección (agua vs sabor) no es posible observar AN con concentraciones elevadas de solución, contrario a lo que ocurre con un consumo forzado. Esto sugiere que cuando se fuerza a un animal, el consumo de soluciones que bajo otras condiciones resultan aversivas, no necesariamente indican la formación de una memoria segura del sabor y por tanto una AN real. En cuanto a IL, se encontró que la pre exposición forzada a soluciones concentradas, no desencadena el desarrollo de IL, sino el desarrollo de un CAS normal, contrario a lo que sucede con pre exposiciones a soluciones a baja concentración. Lo anterior indica que el método de presentación del estímulo gustativo (consumo voluntario vs. consumo forzado) así como la saliencia (del inglés *saliency*) del mismo, determinan si se desarrolla o no AN y si se favorece la adquisición de CAS o el desarrollo de IL.

## ABSTRACT

The survival of an organism depends to a great extent on the ability to correctly discriminate between a nutritious and a potentially toxic food. A way to achieve this is through the association between the organoleptic characteristics of the food consumed and its post ingestive consequences, in such a way that the obtained learning can be recovered by mnemonic mechanisms in later encounters with that food. In this context, aversive conditioning has been a learning model widely studied, both with olfactory and gustatory stimuli. It has been shown that the contiguity in the presentation of the stimuli (some seconds) is crucial for these to be associated, with conditioned taste aversion (CTA) being the exception to the rule, and more recently conditioned odor aversion (COA) in which it is possible to establish associations with long interstimulus intervals (ISI), suggesting that the lack of learning reported in many studies is due to poor memory consolidation rather than a failure in the association of stimuli; such consolidation is possible when the memory is "reactivated" in the short term. The first experiments carried out in the present work were aimed to determine if this memory reactivation observed in COA experiments also occurs in CTA using suboptimal learning conditions (long ISI and low doses of the conditioned stimulus, CS). The results showed that contrary to what happens in COA, the quality of the short and long term memories correspond to each other, so it is not possible to find conditions that allow us to observe the reactivation phenomenon. Given the wide variety of methodologies and therefore results related to the effect of long ISI in CTA, as well as the results of the previous experiment, we decided to carry out, under optimal learning conditions, a parametric study of CTA using long ISI. It was found that unlike previous studies, it was only possible to find aversion up to 180 minutes, and from 240 minutes although no aversion was observed, the development of preference for a taste remains blocked. To determine how the taste preference development is performed, we conducted a neophobia attenuation (NA) and latent inhibition (LI) study using different concentrations of saccharin and quinine solution, as well as two methods of presentation of the flavor stimulus: free choice and forced consumption. We found that with a consumption of free choice (water vs. flavor) it was not possible to observe NA with high concentrations of solution, contrary to what happens with forced consumption. This suggests that when an animal is forced, the consumption of solutions that under other conditions are aversive, does not necessarily indicate the formation of a safe taste memory and therefore a real NA. As for LI, it was found that forced pre-exposure to concentrated solutions does not trigger the development of LI, but the development of a normal CTA, contrary to pre-exposures to low concentration solutions. This indicates that the method of presentation of the gustatory stimulus (voluntary consumption vs. forced consumption) as well as the salience of the flavor, determine whether or not NA develops and whether the acquisition of CTA or the development of LI is favored.

## INTRODUCCIÓN

De manera general, la supervivencia de un organismo depende de factores internos y externos tales como la resistencia a enfermedades, la habilidad para hacer frente a condiciones ambientales cambiantes o adversas, el contar con mecanismos de defensa, la disponibilidad de recursos alimenticios, etc.; dentro de éste último punto, la correcta discriminación entre un alimento nutritivo y otro potencialmente tóxico es de suma importancia. Este mecanismo de diferenciación implica no solo el aprender a distinguir momentáneamente, sino también, la capacidad para recordar las características organolépticas de dicho alimento (sabor, olor, textura, temperatura) así como las consecuencias posteriores a su ingesta; tan es así, que esta capacidad de aprender y recordar se considera uno de los desarrollos evolutivos más importantes en los animales, siendo por mucho, la memoria del sabor, uno de los tipos de memoria cruciales para la supervivencia de los organismos a lo largo de la escala evolutiva (De la Cruz, 2008; De la Cruz, Rodríguez-Ortiz, Balderas y Bermúdez-Rattoni, 2015).

Pero ¿Qué es y que implica el aprender y el recordar? o en otros términos, ¿Qué son el aprendizaje y la memoria?

### **Aprendizaje**

El aprendizaje, es el proceso mediante el cual se adquiere información sobre el ambiente interno y externo de los organismos, es decir, se adquieren conocimientos sobre el mundo que nos rodea produciendo modificaciones conductuales tanto transitorias como permanentes; asimismo, es considerado como una de las funciones más elaboradas en sistemas nerviosos complejos, sin embargo también ocurre en organismos elementales (Ambrogio-Lorenzini, Baldi, Bucherelli, Sacchetti y Tassoni, 1999; Kandel, Schwartz y Jessell, 2000).

Se asume que la función del aprendizaje ha evolucionado a la par de los constantes cambios en el ambiente, permitiendo el ajuste del comportamiento de los organismos para asegurar su supervivencia. Este aprendizaje se expresa en una gran variedad de formas que van a depender de las condiciones bajo las cuales se haya producido (Ambrogio-Lorenzini, *et al.*, 1999; Timberlake, 1994).



De acuerdo con Salamon (2002) el aprendizaje puede ser dividido en dos tipos:

- 1) *Aprendizaje Explícito*: Donde el sujeto es consciente tanto del conocimiento que está adquiriendo como de los productos de dicha adquisición.
- 2) *Aprendizaje Implícito*: Aquel en donde un aprendizaje se adquiere independientemente de la conciencia del sujeto sobre dicho el proceso. Este aprendizaje involucra la participación de estructuras cerebrales que precedieron evolutivamente a la corteza, lo que aportó grandes ventajas evolutivas y adaptativas a los organismos, mismas que se transmitieron de una generación a otra.

### **Proceso de aprendizaje**

La información parcial que se adquiere sobre un objeto, funciona frecuentemente como una señal sobre el objeto en su totalidad (Rescorla, 1988a), así, cuando un organismo aprende una representación sobre el mundo, es decir, genera su propia representación interna y a través de la experiencia, ajusta dicha representación para ponerla acorde con la estructura real del mundo, haciendo un esfuerzo por reducir cualquier error o discrepancia entre su representación y la realidad externa (Thompson y Kim, 1996).

En este sentido, una manera en la que los organismos, incluyendo al ser humano, aprenden sobre relaciones causales en el mundo, es mediante el *aprendizaje asociativo*, el cual no se encuentra limitado únicamente a un set particular de asociaciones o a una respuesta en particular, sino que, además, modifica el comportamiento del organismo inmerso en dicho proceso de aprendizaje; tales asociaciones están formadas por representaciones complejas de múltiples eventos, de modo que el contenido resultante permite tener una representación más enriquecida sobre el mundo (Rescorla, 1988b; Timberlake, 1994).

Una de las formas más simples y más estudiadas de aprendizaje asociativo es el *condicionamiento clásico*, cuyo postulado indica que cuando un estímulo originalmente neutro (*estímulo condicionado, EC*) se asocia con otro que posee algún significado biológico para el sujeto (*estímulo incondicionado, EI*), en un futuro el encuentro con el primero (EC) en ausencia

del segundo (EI) provocará por sí mismo la respuesta que originalmente suscitaba este último, fenómeno al que se le denominó *respuesta condicionada (RC)* (Gluck y Bower, 1988).

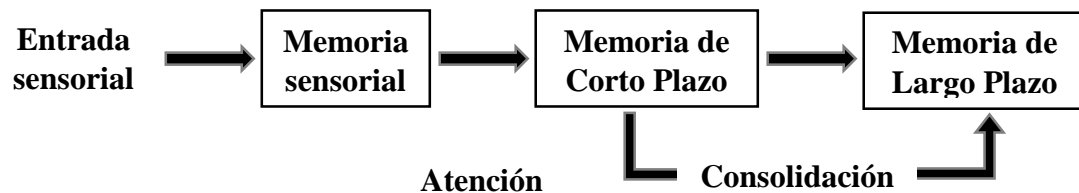
Mucho se ha dicho sobre la importancia que tiene la contigüidad entre ambos estímulos para que pueda darse una asociación; de manera tradicional, especialmente en el área de la psicología, se considera que para que ambos estímulos puedan asociarse de manera adecuada, el intervalo entre estos debe de ser de unos cuantos segundos, sin embargo es necesario señalar que el condicionamiento no sólo depende de la contigüidad de los estímulos (EC-EI), sino también de la información que uno (EC) da acerca del otro (EI), pues la sola contigüidad puede fallar en capturar la información necesaria para que se produzca una asociación (Rescorla, 1988).

Las experiencias vividas por un organismo resultan de gran relevancia cuando de supervivencia se trata, pues como se ha mencionado, los conocimientos que se adquieren ontogenéticamente le permitirán modular su conducta, de modo que resulte más adaptativa y en concordancia con las condiciones de su entorno. Sin embargo, es necesario reconocer que esta experiencia propia, la memoria de lo vivido y el comportamiento expresado ante esto, implica necesariamente una estrecha relación entre el aprendizaje y la memoria (Klein, Cosmides, Tooby y Chance, 2002).

## **Memoria**

La *memoria* también llamada *trazo*, *huella* o *engrama*, se refiere a los cambios físicos y funcionales del sistema nervioso (plasticidad) que codifican lo aprendido (Squire, 1987; Wolf, 1998; Bear, 2001). Esta memoria implica un proceso mediante el cual la información obtenida del ambiente ya sea interno o externo es retenida, modificada, almacenada y posteriormente recuperada. Esta memoria se evidencia con la persistencia de modificaciones conductuales que pueden ser observadas en el organismo (Ambrogi-Lorenzini *et al.*, 1999; Kandel *et al.*, 2000). Tulving (1995, citado en Klein *et al.*, 2002) y Klein *et al.*, (2002) sostienen que la memoria es el componente de una maquinaria neural que proporciona a los organismos la habilidad para retener y utilizar la información y conocimientos adquiridos en el pasado y así poder regular su comportamiento en el presente.

El proceso de almacenamiento de la información adquirida comienza desde el instante en que el estímulo es percibido, posteriormente esta información puede ser almacenada en una memoria que dura desde unos cuantos minutos (memoria de corto plazo, MCP) hasta por el resto de la vida del organismo (memoria de largo plazo, MLP). Dicha memoria bajo condiciones de estimulación adecuada, puede ser recuperada y evidenciada por los cambios conductuales manifestados por el sujeto (Paller, 2009). De manera general, esta formación de la memoria sigue un proceso lineal, en donde la información almacenada a corto plazo pasa posteriormente al almacén de largo plazo (Fig. 1) fortaleciéndose cada vez más conforme es procesada a través de las distintas estructuras cerebrales.



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

### **Tipos de memoria y sus características**

Se han propuesto distintas clasificaciones de la memoria con base en su contenido, naturaleza o duración, lo cual implica que los mecanismos de almacenamiento y recuperación de la información difieren en este mismo sentido.

Squire (1987) e Izquierdo, Medina, Vianna, Izquierdo y Barros (1999), proponen la división de la memoria en explícita o declarativa e implícita o procedimental (por contenido); memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP) (por duración) y de momento a momento (memoria de trabajo). Sin embargo también se le ha clasificado en memoria primaria y secundaria, memoria episódica y semántica, etc. (Fig. 2).

*Memoria declarativa o explícita:* se refiere a aquella memoria sobre hechos factuales y episódicos situados en espacio y tiempo, donde se incluyen eventos complejos y experiencias personales. Este tipo de memoria está relacionada con el conocimiento y la conciencia (Thompson y Kim, 1996; Paller, 2009). A su vez, este tipo de memoria se divide en *memoria episódica:* aquella memoria correspondiente a un evento experimentado en un contexto espaciotemporal específico (Paller, 2009) y *memoria semántica:* contiene información y conocimientos generales sobre el mundo e incluye fragmentos de información abstraídos de un conjunto de eventos particulares. (Klein *et al*, 2002).

*Memoria no declarativa o implícita:* concerniente al conocimiento y recuerdo inconsciente. Incluye habilidades aprendidas como los patrones motores, formación de hábitos, formas simples de condicionamiento así como formas no asociativas de aprendizaje tales como la habituación y la sensibilización entre otras (Thompson y Kim, 1996; Paller, 2009).

*Memoria de corto plazo (MCP):* implica el desarrollo de la traza o huella de memoria y su almacenamiento por un periodo breve de tiempo, que va desde unos pocos segundos o minutos, hasta unas horas (alrededor de 6 según algunos autores) (Izquierdo *et al.*, 1999; Paller, 2009).

*Memoria de largo plazo (MLP):* este tipo de memoria se consolida lentamente en un engrama relativamente permanente, pudiendo permanecer desde algunos meses hasta años, e incluso por el resto de la vida del organismo (Izquierdo *et al.*, 1999; Paller, 2009).

Tanto la MCP como la MLP son sistemas cuya función principal es preservar la información adquirida para su posterior uso en caso de ser requerida. Estudios farmacológicos sugieren que los mecanismos implicados en la formación de estas dos memorias están regulados por subsistemas cerebrales separados, que en muchos casos, pueden pertenecer a las mismas estructuras cerebrales o a estructuras diferentes.

Se sabe que durante la formación de estos dos tipos de memoria, se producen cambios a nivel cerebral que implican una compleja secuencia de eventos moleculares en las diferentes estructuras encargadas de procesar la información recibida. Dichos cambios incluyen por ejemplo la síntesis de proteínas, la activación de genes, la liberación de neurotransmisores y la consecuente estimulación sostenida de sus receptores, tales como los NMDA (receptores de glutamato) que son críticos para la formación y regulación tanto del aprendizaje como de la

memoria especialmente durante la fase inicial del proceso asociativo entre los estímulos (EC-EI) (Lattal y Bernardi, 2007; Paller, 2009). El que estos cambios se lleven a cabo, permite la modificación y el establecimiento de redes neuronales necesarias para el almacenamiento estable de la información adquirida.

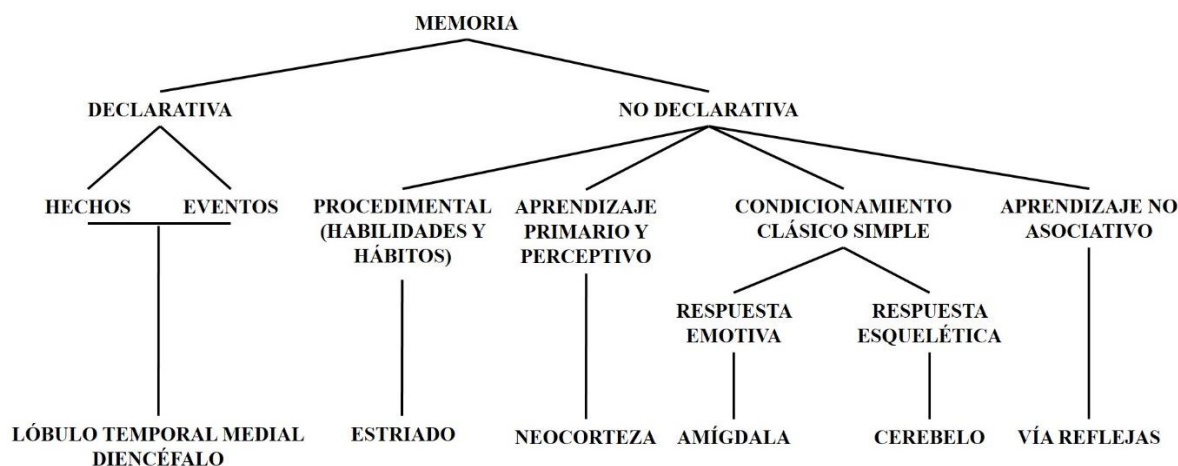


Figura 2. Taxonomía de los sistemas de memoria de largo plazo (MLP) en mamíferos. Se mencionan las principales estructuras cerebrales implicadas (Tomado y traducido de Squire, 2004).

### Fases del proceso de memoria

Ambrogio-Lorenzini *et al.*, (1999) consideran que el proceso de formación de la memoria o proceso mnémico está conformado por una secuencia de fases diferenciadas: adquisición, consolidación, almacenamiento y recuperación de la información.

*Adquisición*: implica la percepción de información del exterior o interna a través de los distintos sistemas sensoriales de sujeto. Poco tiempo después de la adquisición la información es lábil y puede ser alterada o incluso perderse (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1999).

*Consolidación*: consiste en la formación del engrama, huella, o traza (sinónimos utilizados para designar al código neuronal) de memoria. Durante este proceso la información recientemente adquirida se vuelve más estable a lo largo del tiempo, llegando a ser altamente resistente a modificaciones (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1999; Kandel *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante mencionar que una memoria o huella de memoria no permanece estática, si no que puede ser asociada a otros tipos de información que favorezcan su almacenamiento estable o

bien, que puedan interferir en su consolidación, de modo tal que, una memoria consolidada puede tornarse lábil nuevamente y ser “reconsolidada” (Paller y Voss, 2004; Paller, 2009; Yamamoto y Ueji, 2011).

*Evocación:* es el proceso que permite la recuperación y utilización de la información almacenada en el pasado, misma que es reevaluada y relacionada con la información nueva presente durante el momento de la evocación y utilizada en el presente o en el futuro (Kandel *et al.*, 2000; Paller, 2009).

Estos procesos de formación de memoria pueden ser independientes, de modo que el daño en alguna estructura cerebral puede impedir la formación y almacenamiento de información nueva pero mantener intacto el proceso de evocación de memorias antiguas. El proceso de recuperación de la memoria (evocación) difiere de acuerdo con las necesidades de información más apropiada o adaptativa a las condiciones presentes.

En los estudios de memoria, una falla durante la formación, consolidación, almacenamiento o recuperación de la información, siempre se manifiesta como una alteración en la evocación, por lo que, el que un organismo sea capaz de beneficiarse de los aprendizajes obtenidos en el pasado, depende no únicamente de los procesos de formación de memoria, sino también de los aspectos cognitivos tales como sus mecanismos de aprendizaje, su “maquinaria” de búsqueda de información, etc., es decir, de la búsqueda e identificación de información en la memoria del organismo que sea potencialmente relevante para la conducta a realizar o el problema a resolver (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1999; Klein, 2002).

### **Aprendizaje asociativo**

Se sabe que las propiedades básicas del aprendizaje y la memoria, así como las estructuras cerebrales implicadas en el aprendizaje asociativo son muy similares en la mayoría de los mamíferos incluyendo al ser humano (Thompson y Kim, 1996), por lo que, independientemente del organismo en cuestión, este tipo de aprendizaje depende de las expectativas del sujeto en una situación dada.

Este aprendizaje de relaciones entre eventos permite a los animales, resultado de la exposición a dichas relaciones, la interpretación y representación de su ambiente (Rescorla, 1988a) así

como la regulación de sus sistemas de conducta, incorporando restricciones basadas en información sensoriomotriz, secuencias de respuesta, la relación entre la motivación hacia el estímulo y el procesamiento motor (Timberlake, 1994).

Rescorla-Wagner (1972) (citado en Lattal y Bernardi, 2007) ha sugerido que en el aprendizaje asociativo ocurren cambios conductuales en función de las diferencias entre el estímulo esperado, la disponibilidad de pistas y el estímulo presente. De este modo, la respuesta observada ante un EC no solo depende del EI, sino también de sus propiedades perceptuales (color, olor, sabor, textura, temperatura, concentración, etc.) (Rescorla, 1988a).

Debido a que la alimentación es un comportamiento esencial para la supervivencia y adaptación de un organismo ante la gran variedad de recursos que ofrece el ambiente, resulta de gran importancia que un organismo cuente con habilidades que le permitan diferenciar aquellos alimentos que son seguros para comer, de aquellos que no lo son, siendo el olor y el sabor dos de las principales señales que permiten esta diferenciación (Dardou, Datiche y Cattarelli, 2007). En este contexto, el aprendizaje de un sabor es una forma adaptativa de aprendizaje que permite a los organismos adecuar sus requerimientos nutricionales y rechazar los potencialmente tóxicos (Nuñez-Jaramillo, Ramírez-Lugo, Herrera-Morales y Miranda, 2010; Yamamoto y Ueji, 2011).

### **Condicionamiento aversivo al sabor (CAS) como modelo de aprendizaje**

El *condicionamiento aversivo al sabor (CAS)* es un modelo de aprendizaje asociativo en el que los organismos muestran un comportamiento de evitación hacia un *sabor determinado (EC)* una vez que el consumo de éste provoca *malestar gastrointestinal (EI)*, dando como resultado la formación de una memoria específica a ese sabor aversivo que evitará su consumo posterior (Bures, Bermudez-Rattoni y Yamamoto, 1998; Yamamoto, 2007).

Cuando un sabor es asociado con consecuencias postingestivas desagradables, el valor hedónico de éste cambia de positivo a negativo; sin embargo, esto no implica un cambio en el estímulo de sabor en sí, sino en un posible incremento de la intensidad percibida que facilita la detección de la sustancia “peligrosa”. Este cambio hedónico es observable cuando la conducta apetitiva cambia hacia una conducta aversiva basada en dicho sabor (Yamamoto, 2007; Yamamoto y Ueji, 2011).

Es importante mencionar que no todos los estímulos son igualmente asociables, ya que algunos pueden asociarse con mayor facilidad con una señal que con otra (García y Koelling, 1966, citado en Rescorla, 1988a). En estudios de CAS, por ejemplo, un malestar interno se asocia mejor con un estímulo gustativo que con uno auditivo o visual, es decir, se aprende a asociar más fácilmente, pistas de sabor con el malestar que con otros estímulos externos (Revusky y Parker, 1976; Rescorla, 1988). Por lo tanto, la memoria del sabor implica el reconocimiento de éste, las diferentes características relacionadas con su valor hedónico, el grado de familiaridad y las características nutritivas o tóxicas asociadas con el mismo (Nuñez-Jaramillo et al, 2010).

El CAS está compuesto de 5 fases: 1) detección y procesamiento del estímulo de sabor (EC), 2) detección y procesamiento del malestar (EI), 3) asociación de la representación neural de ambos estímulos (EC-EI), 4) recuperación de la información de esta asociación y 5) expresión del conocimiento adquirido observable en la conducta (Lin, Roman, St. Andre y Reilly, 2009). Esta posibilidad de aislar experimentalmente cada fase del proceso de adquisición, consolidación y evocación de la memoria, lo hace un modelo ampliamente utilizado para el estudio de las diferentes etapas del proceso mnémico, dado que, mediante la interrupción de alguna de ellas, el CAS puede ser atenuado o incluso impedido.

### **Características particulares del CAS**

El CAS es considerado como una forma especial de condicionamiento clásico debido a que posee una serie de características peculiares y únicas como la posibilidad de obtener un aprendizaje aversivo robusto con tan solo un ensayo, además de soportar intervalos interestímulo (IIE) hasta de varias horas. Se sabe que la adquisición del CAS se da con mayor facilidad cuando el sabor es novedoso, en tanto que, cuando es familiar, la aversión suele ser más débil o no producirse, dependiendo del grado de familiaridad (Lin *et al*, 2009; Miranda, 2012), siendo la evitación del consumo del sabor, un signo inequívoco de que el condicionamiento ha sido exitoso (Bures *et al.*, 1998; Welzl, D'Adamo y Lipp, 2001). Asimismo, se ha demostrado que, a diferencia de otros tipos de condicionamiento, la aversión generada con un único ensayo, puede permanecer durante meses o incluso años (Houpt, Philopena, Joh y Smith, 1996).



### **Importancia del CAS con IIE largos**

Estudios iniciales sobre condicionamiento clásico consideraban que una contigüidad muy breve (en el rango de segundos) entre la presentación de los estímulos, era indispensable para que se produjera este tipo de aprendizaje, sin embargo, posteriormente se demostró que no solo el IIE era relevante, sino que además el que un EI sea efectivo depende de la relación entre el EC y la respuesta esperada (Gluck y Bower, 1988), la saliencia de los estímulos (Sakai y Yamamoto, 1997; Misanin *et al.*, 2001), su familiaridad (Kalat y Rozin, 1973; Koh y Bernstein, 2005; Lin *et al.*, 2009; Miranda, 2012).

El que la contigüidad temporal entre el sabor y el malestar visceral el modelo de CAS no sea necesaria para que estos puedan asociarse, resulta de gran relevancia a nivel ecológico y adaptativo, considerando que el aprendizaje con IIE prolongados, favorece la habilidad de los organismos de regular su consumo alimenticio. Asimismo, es importante en el caso de la asociación de sabores con efectos benéficos tardíos (Revusky, 1968) o por el contrario, si se considera que la aversión al sabor ayuda a los sujetos a evitar el consumo de alimentos tóxicos; esta capacidad asociativa después de un intervalo largo, resulta muy útil puesto que la absorción de nutrientes típicamente comienza hasta alrededor de una hora después de la ingesta (Rescorla, 1988a). Por otro lado, a nivel experimental, esta característica del CAS de tolerar IIEs largos permite realizar manipulaciones tanto en la presentación del EC como del EI, tales como el marcaje de neuronas individuales que permiten la caracterización de las rutas involucradas en el evento de aprendizaje (Barot, Kyono, Clark y Bernstein, 2008).

### **Estructuras cerebrales que participan en el CAS**

Toda conducta consciente o inconsciente realizada por un animal, incluyendo al hombre, está dirigida por cambios en el sistema nervioso que implican la participación de distintas estructuras cerebrales que trabajan en conjunto, ya sea al mismo tiempo o en momentos diferentes, para que el aprendizaje y la memoria derivados de esa conducta, sean procesados y almacenados de manera eficiente.

La existencia de una variedad de formas de aprendizaje y memoria, requiere de la participación de distintos sistemas de estructuras cerebrales, cada uno de los cuales, procesa un aspecto

diferente de la situación en cuestión (Thompson y Kim, 1996). La codificación, almacenamiento y recuperación de la información adquirida, se debe a la actividad neuronal de una red distribuida en diferentes áreas cerebrales (Nuñez-Jaramillo *et al.*, 2010); por ejemplo, los ganglios basales son sustratos clave para las funciones cognitivas tales como la recompensa y el aprendizaje aversivo (Hikida, Morita y Mcpherson, 2016), en tanto que, específicamente en el CAS, la activación de redes neuronales es producida tanto por los estímulos gustativos como viscerales, mismas que han sido descritas en diversos estudios empleando técnicas electrofisiológicas, inmunohistoquímicas y farmacológicas.

La adquisición del CAS genera cambios en los patrones de actividad cerebral en estructuras tales como el núcleo del tracto solitario (NTS), núcleo parabraquial (PbN), amígdala (AMY), la porción parvocelular del núcleo talámico ventral posteromedial (VPMpc) y la corteza insular (CI) en respuesta al EC, en tanto que las estructuras cerebrales mediadoras del EI dependen del tipo de estímulo del que se trate. El cloruro de litio (LiCl) inyectado sistémicamente, es el estímulo más comúnmente utilizado en los estudios de CAS, ya que es capaz de inducir náusea al activar los nervios vago y esplácnico. Este procesamiento del estímulo visceral aversivo es paralelo al procesamiento de la información gustativa en distintos niveles cerebrales como en el NTS, el PbN, la porción parvocelular del núcleo talámico ventral posteromedial (VPMpc), la AMY y la corteza insular (CI) (Welzl *et al.*, 2001), por lo que se considera que la asociación entre el EC y el EI puede darse no solo en uno sino en varios de estos niveles (Fig. 3).

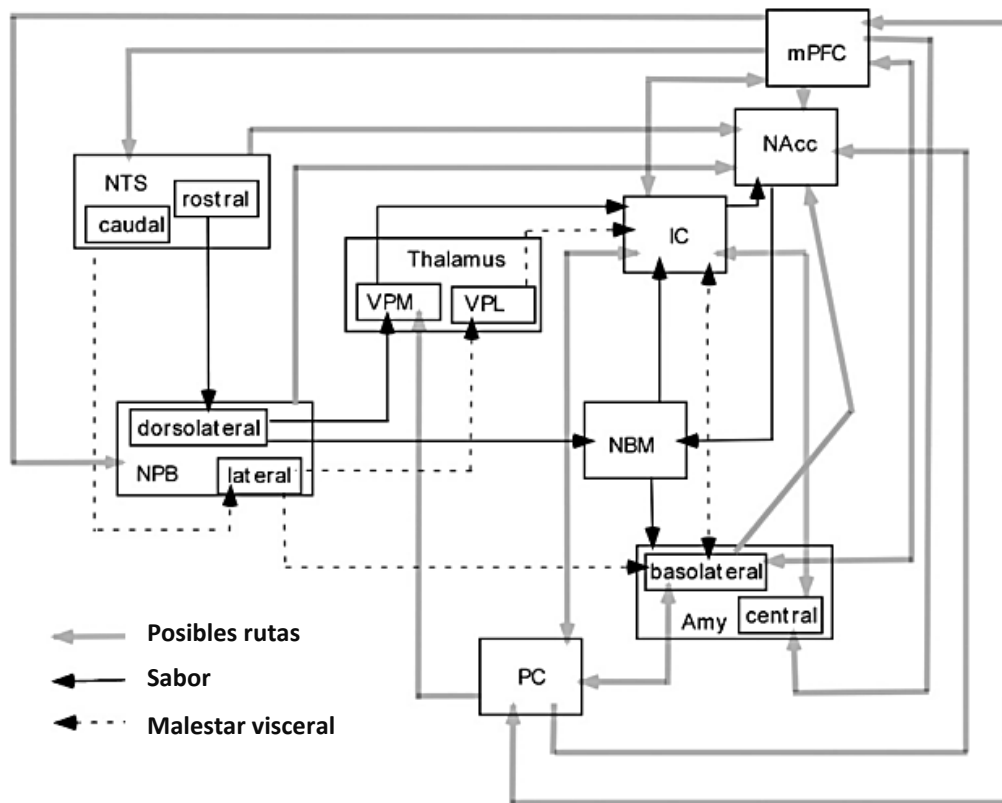


Figura 3. Rutas neuronales involucradas en el procesamiento de estímulos gustativos y viscerales durante la formación de la memoria del sabor (Tomado de Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

*Núcleo del Tracto Solitario (NTS):* la parte rostral del NTS es la primera estación de relevo del estímulo gustativo proveniente de los nervios facial y glossofaríngeo, además de recibir entradas sensoriales provenientes de aferencias viscerales (nervio vago). Es un mediador de la memoria al modular los efectos de la estimulación de receptores periféricos. Proyecta hacia estructuras límbicas tales como la amígdala y el hipotálamo, además del núcleo parabraquial, mismas que juegan un papel importante en la memorización de conductas motivadas aversivamente (Ambrogi-Lorenzini, Baldi, Bucherelli, Sacchetti y Tassoni, 1999; Yamamoto y Ueji, 2011).

*Núcleo Parabraquial (PbN):* es el segundo relevo de la información gustativa; proyecta tanto al NTS como a la amígdala. La región caudal y lateral de este núcleo responden a la estimulación vagal, mientras que la porción anterior y extrema medial responden a la estimulación gustativa (Hermann y Rogers, 1985). Se sabe que la integridad de este núcleo es necesaria durante la

consolidación de la respuesta condicionada (Ambrogi-Lorenzini *et al.*, 1999; Yamamoto y Ueji, 2011), además de que su activación cambia de “positivo a negativo” dependiendo del contenido hedónico del sabor. Se ha demostrado que la transcripción mediada por Fos en esta zona juega un papel crítico en la adquisición y/o consolidación de la memoria de largo plazo; del mismo modo, la actividad glutamatérgica en este núcleo, es necesaria durante el procesamiento del sabor aversivo (Nuñez-Jaramillo *et al.*, 2010). Se cree que es una de las áreas centrales en donde la memoria del sabor interactúa con las señales de malestar visceral, teniendo un rol crucial en la asociación de ambos estímulos.

*Porción Parvocelular del Núcleo Talámico Ventral Posteromedial (VPMpc)*: es el tercer relevo de la información gustativa, la cual es enviada desde ésta estructura a la corteza insular (Yamamoto y Ueji, 2011), además de procesar información visceral del estímulo aversivo (Welzl *et al.*, 2001).

*Corteza Insular (IC)*: es el cuarto relevo de la información gustativa; posee un papel importante en el aprendizaje aversivo dado que se considera como un área cerebral multimodal relacionada con la percepción de patrones temporales y tipos de estímulos sensoriales (Ambrogi-Lorenzini *et al.*, 1999). Es la corteza gustativa primaria (corteza agranular) y visceral; participa en el reconocimiento de un sabor como familiar o novedoso. Receptores NMDA en esta estructura se encuentran implicados en la consolidación de la memoria del sabor (Lin *et al.*, 2009). Asimismo se considera que la memoria aversiva es almacenada a largo plazo en esta y otras estructuras, después de que se ha llevado a cabo dicho proceso (Yamamoto y Ueji, 2011).

*Núcleo Accumbens (NAcc)*: es una interfase involucrada en la motivación (palatabilidad en el caso del sabor) para llevar a cabo la acción (alimentarse).

*Corteza Prefrontal (PFC)*: esta estructura se encuentra asociada con distintos mecanismos del sistema de control alimenticio incluyendo el CAS. Recibe información de la corteza insular, siendo las neuronas de la *corteza prefrontal medial (mPFC)* las que responden a los estímulos gustativos (Yamamoto y Ueji, 2011).

*Núcleo Basal Magnocelular (NBM)*: estudios han demostrado que para que se lleve a cabo una adecuada consolidación de la memoria, es necesario que el NBM se encuentre intacto, siendo esencial para la integración de funciones subcorticales y la regulación de actividad neocortical

(Ambrogi-Lorenzini *et al*, 1999). La liberación de acetilcolina (ACh) desde este núcleo, es necesaria durante etapas tempranas de formación de la memoria gustativa, independientemente del componente hedónico del sabor (Nuñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

*Amígdala (AMY)*: juega un papel importante en la adquisición y el mantenimiento de los cambios hedónicos de positivo a negativo (Yamamoto, 2007). Se considera un sitio de convergencia de los EC y EI (Barot *et al.*, 2008). Estudios han mostrado que lesiones en la *amígdala basolateral (BLA)* impiden la formación de aversión hacia el sabor (Yamamoto y Ueji, 2011). Se sabe que receptores NMDA en la BLA son importantes para la consolidación y recuperación de la memoria del sabor (Lin *et al.*, 2009); del mismo modo, estudios realizados con anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) aplicada en *amígdala central (ceA)* muestran que ante esta manipulación se impide el establecimiento de CAS a largo plazo, sugiriendo que la síntesis de proteínas en dicha área es necesaria para la consolidación de la memoria aversiva al sabor (De la Cruz *et al*, 2008).

*Corteza Perirhinal (Ph)*: se ha demostrado que los receptores colinérgicos en esta estructura, juegan un papel importante para la formación de la memoria de reconocimiento del sabor y del condicionamiento aversivo (Gutiérrez, De la Cruz, Rodríguez-Ortíz y Bermúdez-Rattoni, 2004). Asimismo, lesiones en la corteza perirhinal, afectan la percepción de las ratas cuando se presenta un sabor nuevo, alterando la respuesta neofóbica normal del animal (Ramos, 2015).

## **ANTECEDENTES**

Se sabe que tanto las características olfativas como gustativas de un alimento, juegan un papel relevante en la alimentación. Al igual que el CAS, el condicionamiento aversivo al olor (CAO) es una forma de aprendizaje asociativo, importante para la regulación de la conducta alimenticia. Ambos fenómenos comparten ciertas características tales como la adquisición de aversión con un solo entrenamiento, la formación de una aversión robusta que puede durar por el resto de la vida del organismo, así como la capacidad para tolerar intervalos interestímulos (IIE) prolongados (Chapuis, Messaoudi, Ferreira y Ravel, 2007). Tradicionalmente se ha considerado que en el CAO cuando se da una presentación orthonasal del olor, puede resistir IIE de hasta 15 min (Hankins, Garcia y Rusiniak, 1973) en tanto que, en su modalidad retronasal o cuando es

combinado con un sabor, dicho condicionamiento puede resistir intervalos de hasta de varias horas (Chapuis *et al.*, 2007).

Hankins *et al.* (1973) compararon las características del CAS con las del condicionamiento aversivo al olor (CAO) empleando diferentes IIEs; sus resultados mostraron que la aversión al olor no se produce cuando el IIE alcanza los 30 minutos, contrario a la aversión al sabor que puede desarrollarse fácilmente con dicho intervalo. Estudios recientes en nuestro laboratorio con el modelo de CAO (Tovar-Díaz, González-Sánchez y Roldán-Roldán, 2011) reportan la presencia de memoria aversiva a IIEs de hasta 15 min. cuando se evoca a largo plazo; sin embargo cuando se evoca a corto plazo es posible observar aversión con IIEs de hasta 60 min, sugiriendo que, contrario a lo que tradicionalmente se ha señalado, la falta de memoria aversiva a largo plazo se debe a un falla en la consolidación de la memoria más que a una falla en la asociación de los estímulos. Por otro lado, un fenómeno interesante que este autor reporta, es que cuando la memoria se evoca tanto a corto (4h) como a largo plazo (48h) en un mismo grupo de sujetos, la memoria aversiva parece fortalecerse, de tal forma, que es posible observar aversión a largo plazo con IIEs de hasta 90 min. A éste fortalecimiento de la memoria de largo plazo mediante la evocación a corto plazo, se le denominó “Reactivación” de la memoria (Tovar-Díaz, 2011). Resultados similares sobre este fenómeno de “reactivación” de la memoria aversiva al olor son los reportados por Sánchez (2010), quien utilizó dosis bajas de LiCl (1% y 0.5% p.c) inyectado intraperitonealmente como EI, con la finalidad de producir un aprendizaje subóptimo que permitiera evidenciar el mejoramiento de la MLP después de la manipulación conductual. Sus resultados mostraron que es posible observar memoria aversiva con ambas dosis a corto pero no a largo plazo, sin embargo, cuando la memoria es evocada tanto a corto como a largo plazo en un mismo grupo, es posible observar aversión por el olor por un periodo de hasta 48h.

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que tanto el CAS como el CAO son mecanismos de regulación de la conducta alimenticia basados en un aprendizaje asociativo y que ambos comparten propiedades conductuales similares cuya relevancia ecológica y evolutiva ha permitido la supervivencia de los organismos, consideramos de gran relevancia determinar la universalidad del fenómeno de reactivación que describimos en el apartado anterior, por lo que nos planteamos de manera inicial, las siguientes hipótesis y objetivos:

## **HIPÓTESIS**

- Al igual que en el CAO, en el modelo de CAS, el aumento del IIE permitirá la asociación entre estímulos y la formación de una memoria aversiva a corto plazo pero no a largo plazo.
- La evocación del CAS a corto plazo reactivará la memoria permitiendo su consolidación a largo plazo.

## **OBJETIVOS**

- Establecer una condición experimental en la que se adquiriera una buena MCP y una MLP deficiente.
- Determinar el efecto de la evocación de la MCP sobre la MLP.

## **METODOLOGÍA**

### *GENERAL*

#### *Sujetos*

En todos los experimentos se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 a 300g proporcionadas por la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Se mantuvieron con ciclo luz-oscuridad 12h:12h, con alimento (Rodent Laboratory Chow, Purina, México) y agua *ad libitum* hasta 24h antes de comenzar las pruebas, en donde el agua fue retirada para mantenerlos bajo condiciones de privación.

#### *Caja de condicionamiento*

Las pruebas fueron realizadas en una caja rectangular (50cm largo x 40cm ancho x 18cm alto) de polimetilmetacrilato (Plexiglas), sobre la que se colocó en cada extremo, una gradilla del mismo material, con 8 perforaciones cada una, mismas que sirvieron para colocar un total de 16 bebederos plásticos con capacidad de 3ml y 0.1de precisión.

#### *Análisis estadístico*

Una vez obtenidos los datos de consumo (índices de preferencia o ml) de cada sujeto, los datos fueron ingresados al programa Graph Pad Prisma versión 5 (San Diego, CA, USA) para hacer el análisis estadístico y la generación de gráficos. Se graficaron medias y errores estándar para cada grupo experimental y se aplicó prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida se la prueba *post hoc* de Dunnet o prueba de Tukey, así como pruebas de *t* de Student de dos colas.



## *EXPERIMENTO 1*

### *1.1 Efecto de la doble evocación de la memoria (a corto plazo y largo plazo) sobre el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) empleando intervalos interestímulos (IIEs) largos.*

#### **Estímulos**

Se empleó como estímulo gustativo (EC) solución de Sacarina 0.1% (Sigma-Aldrich, Toluca, México) y como agente inductor de malestar (EI) cloruro de litio (LiCl) (Sigma-Aldrich, Toluca, México) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.15M a una dosis de 2% del peso corporal (p.c.) del sujeto.

#### **Método**

Se privó de agua a los sujetos 24 horas antes de comenzar el experimento. Durante los *Días 1 y 2 (Habituaación)*: los sujetos fueron pesados y llevados a las cajas de prueba en donde se les proporcionó agua en los bebederos durante 10 minutos registrando los consumos. Lo anterior con la finalidad de habituar a los sujetos a las condiciones y contexto en que se llevarían a cabo las pruebas futuras. El *Día 3 (Condicionamiento y Evocación a Corto Plazo)* se llevó a cabo la sesión de condicionamiento (Fig. 4), para lo cual se retiró el alimento hasta terminar la sesión. Se pesaron y dividieron los sujetos en dos grupos para cada intervalo interestímulos (IIEs) establecido: 30, 120, 180, 240 y 300 min. Al Grupo 1 una vez condicionado, se le evocó la memoria tanto a corto plazo (MCP) como a largo plazo (MLP) mientras que al Grupo 2, únicamente se le midió MLP (Fig. 5). Los sujetos de ambos grupos fueron llevados de manera individual a las cajas de prueba, en donde se les proporcionó 4ml de solución de Sacarina (repartida en 8 bebederos conteniendo 0.5ml c/u) durante 5min. Después de esto, los sujetos fueron devueltos a la caja hogar y se esperó el IIE establecido para cada grupo, luego del cual, se administró a cada sujeto una inyección intraperitoneal (i.p.) de LiCl a un volumen del 2% p.c. Dos horas después del EI, se midió la MCP en el Grupo 1. Para lo cual se llenaron 8 bebederos (3 ml) de la caja de prueba con solución de sacarina y los 8 restantes (3 ml) con agua, mismos que se colocaron de manera alternada. Se permitió a los sujetos beber durante 10 minutos con libre elección entre ambas sustancias; posteriormente se les regresó a la caja hogar y se registraron las cantidades consumidas tanto de agua como de sacarina y se calculó el índice de

preferencia (IP) por la sacarina mediante la siguiente fórmula:  $IP (\%) = [\text{ml consumidos de sacarina} / (\text{ml consumidos agua} + \text{ml consumidos de sacarina})] * 100$ . El *Día 4 (Recuperación)* únicamente se proporcionó agua en la caja de pruebas y se registraron las cantidades consumidas para cada sujeto. *Día 5 (Evocación a Largo Plazo)* se llevó a cabo la evocación de la MLP tanto en el Grupo 1 como en el Grupo 2 usando el mismo procedimiento que el día 3 para la MCP, se obtuvieron los IP. Posteriormente se vaciaron los datos obtenidos tanto a corto como a largo plazo en el programa Graph Pad Prism 6 para la realización de los gráficos y estadísticos (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnet).

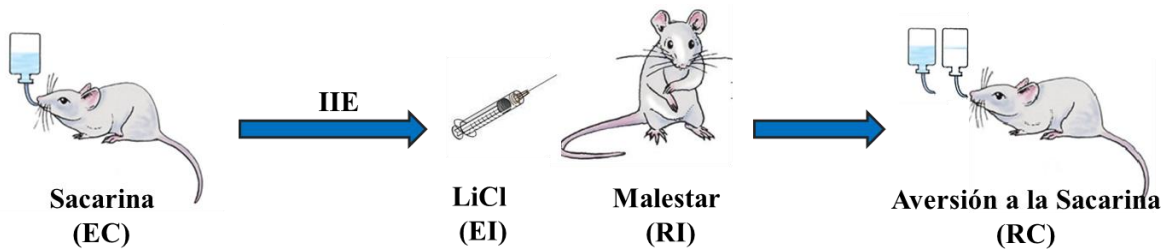


Figura 4. Modelo de Condicionamiento Aversivo al Sabor. EC: estímulo condicionado; EI: estímulo incondicionado; RI: respuesta incondicionada; RC: respuesta condicionada.

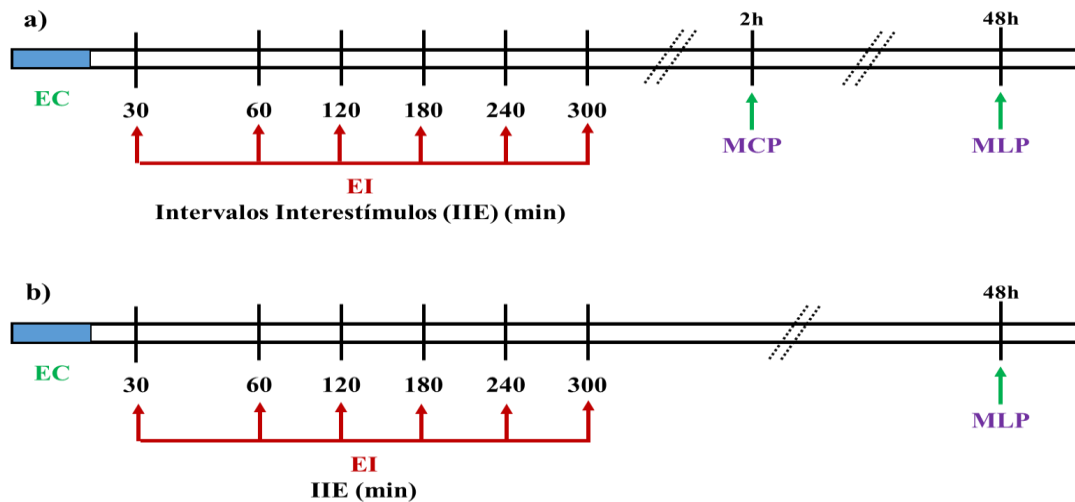


Figura 5. Escala de intervalos interestímulo (IIEs) empleados. Método seguido para el Grupo 1 (a) y el Grupo 2 (b) durante el condicionamiento aversivo y la evocación de la memoria del sabor.

## Resultados

A diferencia de lo reportado en el modelo de CAO, en el modelo de CAS con IIE largos no fue posible encontrar, bajo ningún intervalo, las condiciones en las cuales se observara un mejoramiento de la MLP debido a la evocación previa de la misma a corto plazo, es decir no se observó una “reactivación” de la memoria; observándose en su lugar, una pérdida progresiva de la aversión equivalente tanto a corto como a largo plazo, es decir: si la MCP era buena, también lo era la MLP y viceversa, si se encontraba una deficiente MCP también la MLP resultó deficiente, no encontrando diferencias significativas entre el grupo evocado a largo plazo y aquel evocado o reactivado previamente a corto plazo. Por otro lado se encontró la presencia de aversión tanto a corto como a largo plazo hasta el IIE de 180min (IP=28.9 y 20.4;  $P<0.05$ ) en tanto que, a intervalos superiores ya no fue posible observar aversión (IIE 240 min. IP=49.2 y 39.3) (Fig. 6).

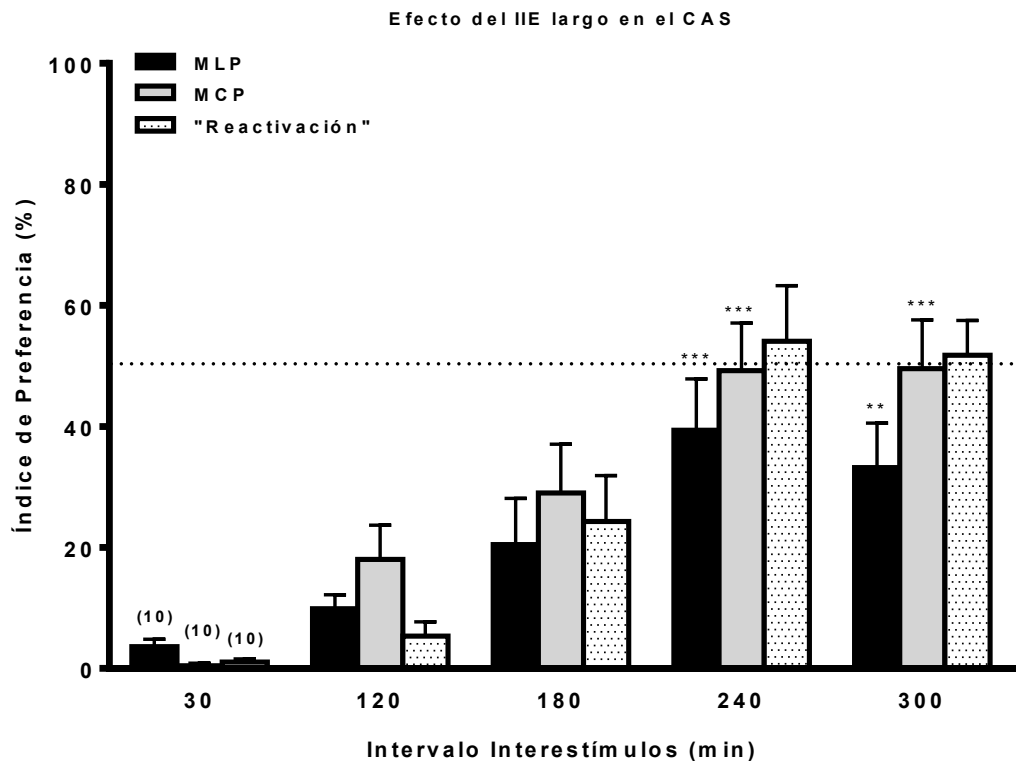


Figura 6. Índices de preferencia (IP) registrados para los grupos evocados a corto plazo (MCP), largo plazo (MLP) y grupos evocados tanto a corto como a largo plazo (Reactivación). Se condicionó a

distintos intervalos interestímulo (IIE) utilizando solución de Sacarina 0.1% e inyección ip de LiCl 0.15M, 2% p.c. (\*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001). Se grafica media  $\pm$  E.E.M. \*Diferencias respecto al grupo control condicionado con IIE de 30min. Número de sujetos por grupo (n) expresado entre paréntesis.

### ***1.2 Efecto de la doble evocación de la memoria (a corto plazo y largo plazo) sobre el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) empleando dosis bajas de LiCl como estímulo incondicionado (EC).***

Debido a los resultados obtenidos empleando IIE largos durante el condicionamiento, decidimos buscar nuevamente, bajo otros parámetros, aquella condición que permitiera la posibilidad de “reactivar” la memoria de largo plazo, es decir, condiciones en la que se produjera una buena memoria de corto plazo y una memoria de largo plazo deficiente. Para ello, y basándonos nuevamente en estudios previos de CAO, decidimos disminuir las dosis de cloruro de litio 0.15M (EC) a dosis de 1%, 0.5% y 0.25% del peso corporal (p.c.) del sujeto.

### **Método**

Se llevó a cabo el procedimiento de habituación ya descrito durante los *primeros 2 Días*. El *Día 3 (Condicionamiento y Evocación a Corto Plazo)* se llevó a cabo la sesión de condicionamiento previamente descrita dividiendo a los sujetos en 6 grupos, dos para cada dosis establecida. Se utilizó un IIE de 30min posteriores al consumo de la solución, administrando a grupos independientes, inyecciones i.p. de LiCl de acuerdo a la dosis asignada: 1%, 0.5% o 0.25% p.c., posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de evocación de la MCP y MLP. El *Día 4* se realizó la sesión de recuperación y el *Día 5* se evocó la MLP siguiendo el procedimiento del experimento anterior y se realizaron los análisis estadísticos (Fig. 7).

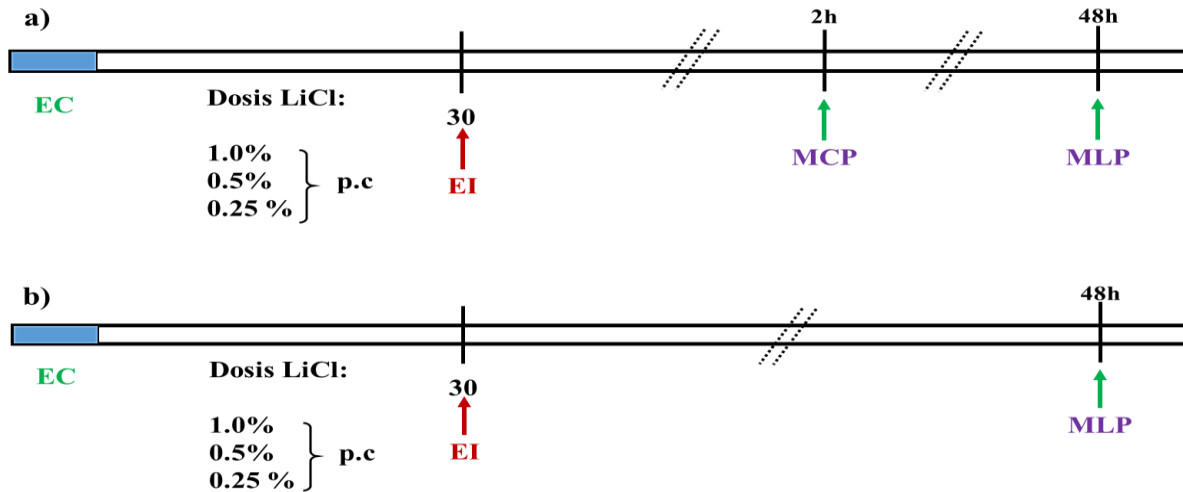


Figura 7. Metodología empleada durante el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) empleando dosis bajas de LiCl. Método seguido para los grupos evocados tanto a corto y largo plazo (a) y para los grupos evocados únicamente a largo plazo (b).

## Resultados

Los resultados obtenidos empleando dosis bajas de EI, al igual que el empleo de IIE largo no produjeron las condiciones necesarias para poder observar la reactivación de la memoria. Teniendo que, al igual que en el experimento anterior, la aversión registrada fue proporcional a la dosis de LiCl inyectada, es decir a menor dosis menor aversión, observándose una disminución de ésta de manera paralela tanto a corto como a largo plazo. Bajo estas condiciones fue posible observar aversión hasta una dosis de LiCl de 0.5% p.c. (IP=14.4 y 8.45;  $P < 0.05$ ), en tanto que a 0.25% la aversión observada fue deficiente (IP=31.4 y 45.8). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo evocado tanto a corto como a largo plazo, con aquel evocado únicamente a largo plazo para esta última concentración (0.25%) (Fig. 8).

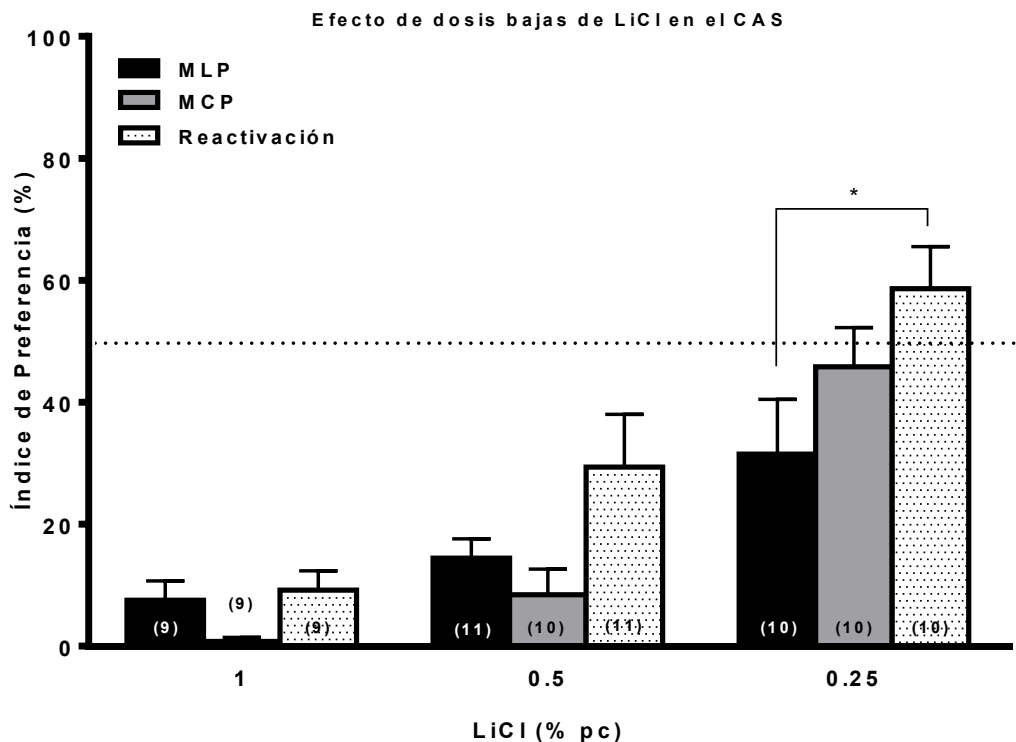


Figura 8. Índices de preferencia (IP) registrados para los grupos evocados a corto plazo (MCP), largo plazo (MLP) y grupos evocados tanto a corto como a largo plazo (Reactivación). Se condicionó empleando un IIE de 30 min. (\*  $P < 0.05$ ). Se grafica media  $\pm$  E.E.M. Número de sujetos por grupo (n) expresado entre paréntesis.

## Discusión

A diferencia de lo que sucede con el olor, el hecho de no haber encontrado el fenómeno de “reactivación” de la memoria de largo plazo en el CAS, revela esta reactivación no es una condición inherente a los sistemas de condicionamiento toxicofóbico en general, sino que deben de cumplirse ciertas condiciones particulares que permitan el desarrollo de dicho fenómeno. Por un lado, la presencia de memoria aversiva de corto plazo en el modelo de CAS, implica también, la presencia de memoria aversiva de largo plazo; esta memoria disminuye de manera proporcional conforme se incrementa el IIE, por lo que, a diferencia de lo reportado en CAO, no es posible encontrar una condición de aprendizaje subóptimo en donde se pueda observar una buena memoria de corto plazo y una deficiente memoria de largo plazo que pueda ser mejorada o “reactivada”. Los reportes de nuestro laboratorio (Sánchez, 2010 y Tovar *et al*, 2011)

sugieren que en el CAO, estas condiciones de aprendizaje subóptimo se deben a un problema en la consolidación de la memoria aversiva, mismo que impide su adecuada evocación; sin embargo en el CAS con IIE largo, puede observarse que esta falta de aversión ante IIE mayores a los 180min. o con dosis bajas de LiCl (0.25% p.c.) es en efecto, producto de una asociación deficiente de los estímulos debido al tiempo transcurrido entre la presentación del EC y el EI y a la incapacidad de dicha dosis para generar malestar gastrontestinal que pueda ser asociado al sabor.

## *EXPERIMENTO 2*

### ***Reevaluación del aumento del intervalo interestímulo (IIE) sobre el condicionamiento aversivo al sabor (CAS)***

Nuestros resultados anteriores mostraron que no es posible encontrar en el modelo de CAS, las condiciones experimentales que permitan el mejoramiento de la MLP mediante la evocación a corto plazo. Sin embargo, a pesar de que el CAS ha sido un fenómeno muy estudiado, existe una gran variedad de metodologías empleadas para generarlo y pueden afectar los resultados, por ejemplo el uso de uno o dos bebederos durante la fase de prueba, el uso de distintos EIs y estímulos “complementarios” tales como rayos X (Smith, Morris y Hendricks, 1964; McLaurin, 1964; García *et al.*, 1966; Smith y Roll, 1967; Revusky, 1968), disminución de la temperatura (Misanin *et al.*, 2002a; Hinderliter, Musci, Pollack, Misanin, y Anderson, 2004), rotación, anestesia (Rozin y Ree, 1972), el número de ensayos de condicionamiento (García *et al.*, 1966, García, Hankins, Robinson y Vogt, 1972), el método de presentación del EC (libre consumo o infusión intraoral) (Schafe, Sollars y Bernstein, 1995), así como el momento de evocación de la memoria que, de manera general, se lleva a cabo una vez consolidada la MLP.

La consecuencia de esta variación en los diseños experimentales ha provocado la obtención de resultados distintos, incluso contradictorios. Es por ello que decidimos llevar a cabo un estudio paramétrico bajo condiciones óptimas de entrenamiento, que nos permitiera observar el proceso de consolidación de la memoria del sabor través del tiempo, empleando IIEs largos y evocando tanto a corto como a largo plazo.

## Antecedentes

Dentro de los estudios pioneros sobre CAS empleando IIE largos, se encuentra el realizado por García *et al.*, en 1966 (experimento B), quienes condicionaron ratas Sprague-Dawley utilizando solución de sacarina y una inyección intraperitoneal (i.p.) de apomorfina (15 mg/Kg) administrada a diferentes IIEs: 30, 45, 75, 120 y 180 min. cada tercer día hasta completar cinco ensayos. Sus resultados mostraron que la apomorfina producía aversiones significativas con intervalos de hasta 75min., hecho que generó controversia debido a que no se ajustaba a lo tradicionalmente aceptado sobre el aprendizaje asociativo y la importancia de la contigüidad temporal entre los estímulos. A pesar de esto, el interés por dicho tema continuó y posteriormente se realizaron más investigaciones que corroboraron lo dicho por estos autores, tal fue el caso de Smith y Roll (1967) quienes condicionaron ratas Sprague-Dawley empleando solución de sacarina (0.1%) y solución de sacarosa (4%) e irradiándolas posteriormente con rayos X (3r/min con un total de 100r, 250kv) a IIEs de 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 horas., demostrando que con solución de sacarina es posible encontrar aversiones a IIE de hasta 12h, en tanto que con sacarosa, la aversión es observable únicamente hasta las 6h. Del mismo modo, Revusky en 1968 trabajó con ratas Sprague-Dawley a quienes proporcionó solución de sacarosa 19.7% y posteriormente irradió con rayos X (50r, 250kv, en un periodo de 21.3s) a IIEs de 4, 8, 16, 24 y 32 horas, encontrando que el grupo irradiado a las 4h, mostró una aversión significativa por la solución, en tanto que el grupo con intervalo de 8h se comportó como el grupo control, sugiriendo que con tales condiciones, es posible encontrar aversión a IIE mayores de 4h y menores de 8h. En un segundo experimento empleando los mismos estímulos pero a IIE de 3.5, 5, 6.5 y 8 h, demostró que es posible encontrar aversiones significativas con intervalos de hasta 6.5h entre los EC y EI. Un año más tarde Nachman (1970) (Experimento 1) empleando solución de sacarina (0.25%) y una inyección i.p. de cloruro de litio (LiCl) (0.15M, 2% pc) como agente causante de malestar gastrointestinal a IIEs de 1, 15 y 60min y 4, 8 y 12h, encontró que es posible formar aversiones con IIEs de hasta 8h y una aversión aparente incluso hasta las 12h en comparación con el grupo control. A partir de estos y otros estudios iniciales, se ha asumido a los IIEs largos como una característica particular del CAS sin que esto haya dejado de ser motivo de continua experimentación, como lo demuestran estudios más recientes dentro de los que se incluyen el llevado a cabo por Misanin *et al.*, en el 2002a, quienes disminuyeron la temperatura corporal de uno de dos grupos de ratas Wistar después de haberlas condicionado con solución



de sacarina 0.1% y una inyección i.p. de LiCl (0.15M) a IIEs de 90, 135 y 180 minutos. Sus resultados mostraron que los grupos a los que se les disminuyó la temperatura corporal presentaron mayor aversión que aquellos que no fueron sometidos a hipotermia, encontrando aversiones con intervalos de hasta 225 min., para los primeros y no mayores a los 90 min para los últimos, con lo cual concluyeron que la hipotermia, el grado y duración de ésta, funcionan “acortando” el intervalo temporal entre eventos y permitiendo así la asociación de ambos estímulos. En otro estudio realizado por estos mismos autores (Misanin *et al.*; 2002b) en el que administró el EC mediante cánulas intraorales a ratas Wistar de distintas edades (0.25, 1, 1.5, 2 y 2.5 años), se les condicionó con solución de sacarina 0.1% y una inyección i.p. de LiCl (0.3M) a IIEs de 0, 45, 90, 180 y 360 minutos, se encontró que las ratas adultas (2-2.5 años) forman aversiones al sabor con IIE mayores (360 min.) en comparación a las ratas más jóvenes, habilidad que se cree, emerge de manera gradual a lo largo del tiempo de vida del organismo, sugiriendo que a mayor edad, el rango metabólico se enlentece permitiendo a las ratas adultas asociar los estímulos con mayor facilidad.

## Método

Para llevar a cabo este experimento se empleó la metodología y estímulos descritos en el experimento 1, empleando intervalos interestímulos (IIEs) de 30, 120, 180, 240 y 300 min., así como un grupo control (SAL) a los que se les inyectó solución fisiológica en sustitución del EI (Fig. 9).

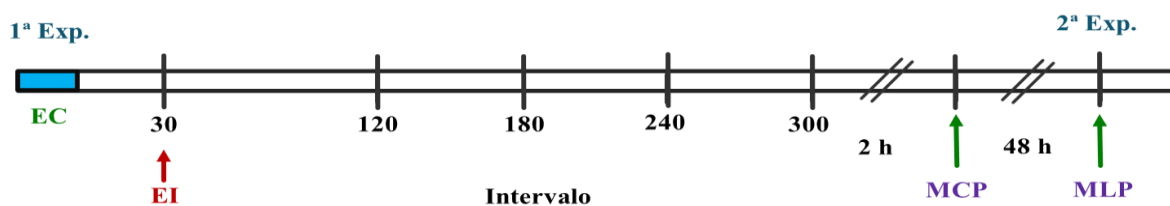


Figura 9. Escala de Intervalos Interestímulos utilizados para los grupos experimentales inyectados con LiCl, así como los momentos equivalentes a la 1ª y 2ª exposición a la sacarina en el grupo control inyectado con solución salina (SAL).

## Resultados

Los resultados empleando intervalos interestímulo (IIEs) largos (Fig. 10), muestran que la adquisición de la aversión hacia la sacarina 0.1%, es inversamente proporcional al intervalo utilizado, es decir, a mayor IIE menor el grado de aversión. De manera interesante, se observó una aversión equivalente tanto a corto como a largo plazo, i.e., la presencia o ausencia de memoria aversiva a corto plazo coincide con la memoria de largo plazo. Para cuantificar la calidad de la memoria, es decir, el grado de aversión por la solución, hemos empleado una escala en porcentaje de 0 a 100% o de preferencia (IP) que, a partir de una gran cantidad de estudios realizados bajo nuestras condiciones experimentales, podría resumirse así: un IP <5% indica una memoria inmejorable (sumamente aversivo), <20% buena memoria, 20-30% memoria deficiente y >40% mala memoria (ausencia de aversión). Cabe señalar que el 50% corresponde al nivel de azar (*chance level*), sin aversión ni preferencia por un sabor. Al comparar los IP obtenidos a los distintos intervalos contra el grupo de 30 min, en el cual se obtuvo un aprendizaje excelente (IP= 0.4% MCP y 3.6% MLP), se observó la presencia de memoria aversiva tanto a corto como a largo plazo con un intervalo hasta de 180 min (IP=31.2% y 19.0% respectivamente), mientras que a partir de los 240 min ya no fue posible encontrar ninguna memoria (IP=49.2% y 39.3%). Por otro lado, al comparar los distintos grupos contra el grupo control SAL 2ª Exp. (IP=71%), se observaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en todos los intervalos tanto a corto como a largo plazo, sugiriendo que si bien no hubo memoria aversiva con intervalos de 240 y 300 min., es posible observar (Fig. 11) una memoria aversiva muy débil o residual, que estaría impidiendo el desarrollo de preferencia por la sacarina. Esta preferencia habría sido esperada en ambos grupos (240 y 300 min) al ya no mostrar aversión, tal como sucedió con el grupo control SAL 2ª Exp., que por haber estado expuesto en dos ocasiones a la solución desarrolló preferencia por la misma, sin embargo, al comparar a dichos grupos contra el grupo control SAL 1ª Exp (IP=38.9%), se observó que los valores de IP registrados no mostraron diferencias significativas. En otras palabras, si los grupos entrenados con IIEs de 240 y 300 min no hubieran aprendido nada, deberían comportarse como el grupo control en la segunda exposición (SAL 2ª Exp), condición que no ocurrió.

Estudio paramétrico del IIE largo en el CAS

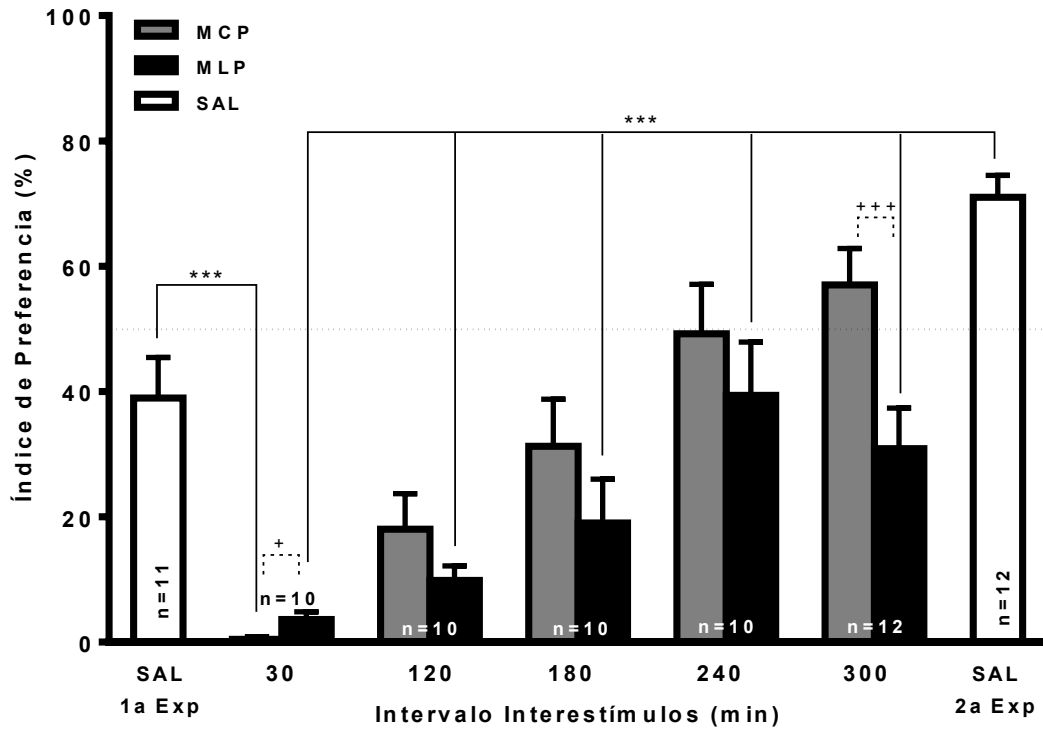


Figura 10. Índices de preferencia (IP) durante la evocación de la memoria a corto (MCP) y largo plazo (MLP). Se condicionó a distintos intervalos interestímulo (IIE) utilizando solución de Sacarina 0.1% e inyección ip de LiCl 0.15M, 2% p.c. Se realizó ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Dunnet (\* $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Se grafica media  $\pm$  E.E.M. \*Diferencias respecto a los controles SAL 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> Exp.; +Diferencias entre MCP y MLP a un mismo IIE.

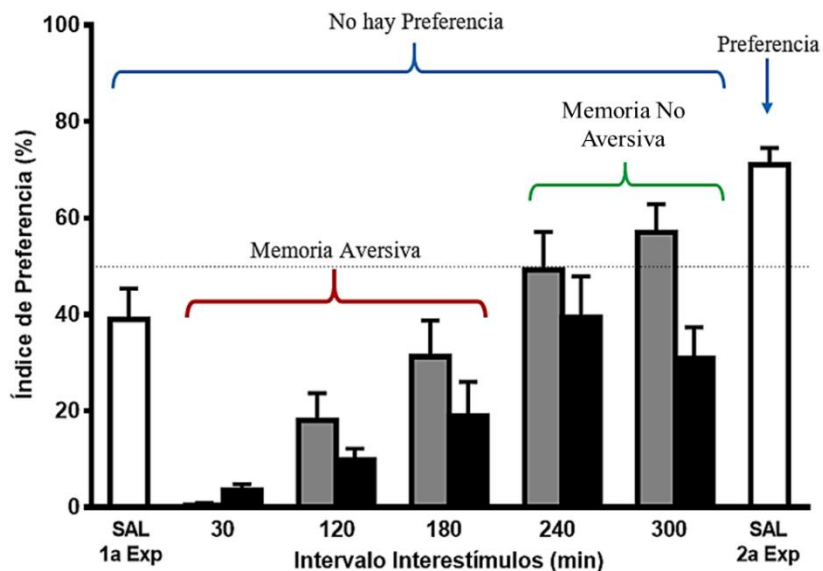


Figura 11. Comportamiento del consumo de sacarina 0.1%, registrado para los distintos grupos con IIE largo, así como para los grupos controles. Se observa un incremento en el consumo de la solución proporcional al tiempo transcurrido entre los estímulos (EC-EI). Del mismo modo se observa un incremento del consumo en el grupo control (SAL) en función del número de veces en que los sujetos fueron expuestos a la solución de sacarina.

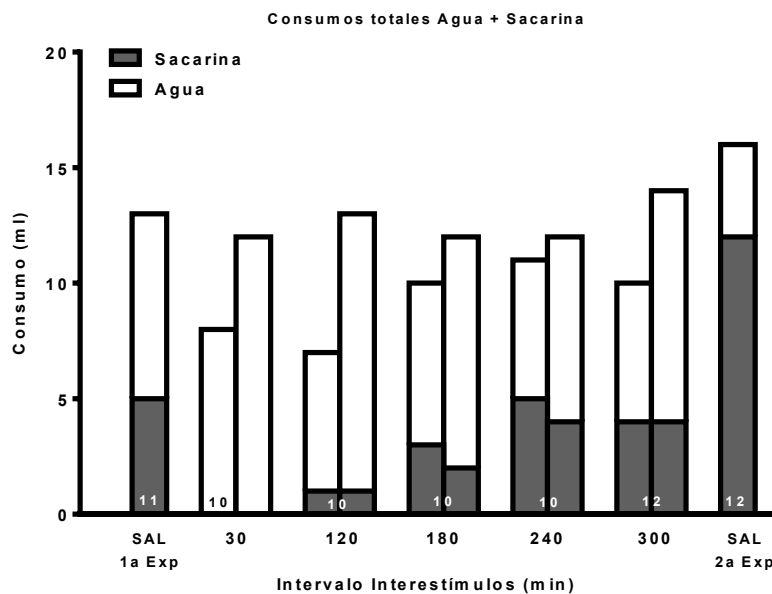


Figura 12. Consumos totales (agua + sacarina 0.1%) registrados tanto a corto como a largo plazo para cada uno de los IIE empleados. Nótese cómo el consumo de sacarina de incrementa a más del doble en el grupo no condicionado (SAL) de la 1ª a la 2ª exposición.

## Discusión

La ausencia de aversión a IIE largos en el modelo de CAS puede explicarse por un lado, con la “Teoría del decaimiento de la huella de memoria gustativa” (Davis y Bures, 1972; Kalat y Rozin, 1973), la cual postula que, tras cada experiencia gustativa novedosa, se genera una huella neural de dicha memoria que decae lentamente a lo largo del tiempo, siendo entonces demasiado débil para asociarse con el EI después de varias horas. Esta condición podría ocurrir en nuestros experimentos, en los que es posible que con IIE superiores a los 180min., la huella de memoria del sabor se encuentre disminuida y por lo tanto no esté disponible para asociarse con el malestar gastrointestinal producido por el LiCl. Lo anterior resulta lógico si consideramos que el grado de aversión es equivalente tanto a corto como a largo plazo, a diferencia del condicionamiento aversivo al olor (CAO), en el cual, ante condiciones subóptimas de aprendizaje, se ha observado una buena MCP y la ausencia total de MLP en grupos independientes condicionados con el mismo IEE (Tovar-Díaz *et al*, 2011), sugiriendo que en dicho modelo, pero no en el CAS, la falta de aversión a largo plazo cuando se emplean IIEs largos, no se debe a un problema de asociación entre los estímulos, sino a una consolidación deficiente de la memoria a largo plazo.

Por otro lado, la presencia de cierta memoria residual en los grupos condicionados a IIEs de 240 y 300 min., evidente al comparar contra el grupo control SAL 2ª Exp., contradice esta teoría, sugiriendo entonces que la huella de memoria del sabor no decae ni desaparece usando dichos intervalos, sino que permanece latente y por tanto, la falta de asociación del sabor con el malestar gastrointestinal, puede deberse a que el IIE largo favorece, no la desaparición de la huella de memoria del sabor, sino su catalogación y como un sabor “seguro”, del mismo modo en que la “Teoría del aprendizaje seguro” (Rozin y Kalat, 1971; Kalat y Rozin, 1973; Nachman y Jones, 1974) lo ha postulado para los modelos de atenuación de la neofobia (AN) e inhibición latente, en donde se considera que entre más amplio sea el intervalo posterior a la ingesta de un alimento y las consecuencias adversas, menor será la aversión manifestada, puesto que el sujeto ha aprendido, de manera gradual, que la sustancia ingerida es segura para su consumo.

El resultado relevante fue que estos mismos grupos (240 y 300), a pesar de no mostrar aversión por el sabor, tampoco desarrollaron preferencia por la sacarina tras ser expuestos en dos ocasiones a la solución tal como ocurrió con el grupo control SAL 2ª Exp., en el que la preferencia por dicho sabor fue muy evidente (Ver Fig. 10). Si bien, investigaciones más

recientes (Gutiérrez *et al*, 2003b) reportaron presencia de aversión con intervalos de hasta 6h, es importante mencionar que las diferencias en el método empleado (EC y EI más concentrados que en nuestro caso, lo cual provoca aprendizaje más robusto) deben considerarse para la interpretación de los resultados entre ambos estudios.

La falta de preferencia por el sabor observada con IIEs superiores a los 180min., en los que tampoco hay aversión aparente (Ver Fig. 11), puede deberse a un “bloqueo” del desarrollo de la preferencia debido a una memoria residual del malestar gastrointestinal, lo que ocasiona que el consumo de sacarina (ahora un sabor familiar) se mantenga a un nivel bajo, similar al consumo mostrado por un sabor novedoso (grupo control SAL 1 Exp.) (Fig. 12).

Sin soslayar la contribución de los estudios previos al nuestro, consideramos importante enfatizar que el método que utilizamos tanto para el condicionamiento como para probar el grado de aversión en nuestro estudio, tiene ventajas respecto a los otros; la más importante de ellas es una gran sensibilidad aun para detectar aversiones muy sutiles.

### *EXPERIMENTO 3*

#### *3.1 Atenuación de la neofobia con el modelo de consumo con libre elección (ANLE), a distintas concentraciones de solución de sacarina*

El reconocimiento de un sabor incluye procesos cerebrales que permiten la evocación de experiencias pasadas, donde un estímulo gustativo ha sido asociado con las consecuencias de su ingesta. Algunos mamíferos, muestran una disposición innata para aceptar alimentos dulces mientras que rechazan aquellos con sabores amargos; además de esto, tienen la capacidad de desarrollar respuestas alimenticias basadas en sus propiedades orosensitivas y las consecuencias post ingesta; de este modo, el consumo de algunos estímulos gustativos induce una respuesta apetitiva llevando al desarrollo de una preferencia por dicho sabor, misma que se evidencia con el incremento en su consumo (Nuñez-Jaramillo *et al.*, 2010; Yamamoto y Ueji, 2011).

Dos mecanismos fundamentales de regulación de la conducta alimenticia para evitar consumir alimentos potencialmente tóxicos, son el CAS y la *neofobia*. Como hemos visto, el CAS ocurre por la asociación de un sabor con un malestar visceral y puede darse aún con IIEs muy largos, en tanto que la neofobia es una reacción innata que consiste en el consumo cauteloso y moderado

de un sabor desconocido, mismo que va incrementándose a medida que se vuelve familiar o seguro (*atenuación de la neofobia, AN*) (Bures *et al*, 1998; Morón y Gallo, 2007; Yamamoto y Ueji, 2011). Por tal motivo el CAS y la AN se han propuesto como procesos de aprendizaje opuestos, i.e., el aprendizaje de un sabor peligroso vs. un sabor seguro.

La neofobia se considera una primera línea de defensa en las ratas debido a su carencia de reflejo emético y por tanto su incapacidad para vomitar, lo cual pudo haber permitido el desarrollo de otros mecanismos para evaluar si un alimento es seguro o no (Neath, Limebeer, Parker y Reilly, 2010). La función principal de la neofobia, es evitar el consumo de grandes cantidades de alimentos potencialmente tóxicos, incrementando así sus posibilidades de supervivencia (Reilly y Trifunovic, 2001; Lin y Reilly, 2012; Ramos, 2015). Una vez que el sabor del alimento ingerido ha sido asociado con una sensación de bienestar o malestar, los organismos reaccionan ante exposiciones posteriores incrementando o disminuyendo su consumo respectivamente (Yamamoto y Ueji, 2011); así, cuando el consumo aumenta se dice que la neofobia ha sido atenuada, pues se ha aprendido que el alimento en cuestión es seguro (Bures *et al*, 1998) y se le “etiqueta” como tal (aprendizaje de lo seguro) (Yamamoto y Ueji, 2011), a la vez que se genera una memoria apetitiva para dicho sabor (Miranda, 2012).

Estudios iniciales han sugerido que la AN y el CAS son procesos distintos, debido a que intervenciones realizadas con descargas electroconvulsivas, anestesia e hipotermia, entre otros, suelen afectar de manera desigual a estos dos tipos de aprendizaje (Buresova y Bures, 1980). Asimismo, la sensibilidad diferencial de la AN y el CAS ante condiciones de interferencia, sugiere que ambos procesos son independientes y por lo tanto, llevados a cabo por mecanismos neuronales distintos (Buresova y Bures, 1980; Miller y Holzman, 1981).

Así, estudios más recientes sostienen que las memorias apetitivas y aversivas se adquieren mediante mecanismos neuronales diferentes, los cuales, probablemente durante las etapas iniciales de reconocimiento del sabor, comparten procesos en la representación neural del mismo (Nuñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

Sin embargo, debido a que durante el desarrollo de la MLP de un sabor, éste es “etiquetado”, dependiendo de sus consecuencias post ingestivas, como familiar-aversivo o familiar-apetitivo, otros autores han sugerido que ambas memorias pueden ser formadas y/o almacenadas en paralelo en distintas estructuras cerebrales, siendo dos extremos de un continuo (Nuñez-

Jaramillo *et al.*, 2010). En relación a esto, la hipótesis del “aprendizaje seguro” (Rozin y Kalat, 1971; Kalat y Rozin, 1973; Nachman y Jones, 1974) sostiene que la AN y el CAS son dos fases del mismo proceso, puesto que un sabor nuevo es almacenado en una memoria de corto plazo donde permanece disponible para su asociación con señales viscerales de envenenamiento; si esto ocurre, sobreviene la conversión a un engrama permanente de aversión. Sin embargo, en ausencia de consecuencias viscerales adversas, esta huella de memoria se almacena de manera permanente como una señal neutral o apetitiva.

Como hemos visto, la exposición repetida a un sabor novedoso reduce su rechazo neofóbico a la vez que disminuye su asociabilidad con un posible efecto tóxico o de envenenamiento (Buresova y Bures, 1980); ante este hecho, se ha considerado a la neofobia como un requisito necesario para que pueda desarrollarse un CAS, dado que la novedad de un sabor facilita la adquisición robusta de éste, a diferencia de cuando es familiar (Lin *et al.*, 2009).

Otra característica que sugiere que ambos fenómenos se encuentran relacionados por lo menos en sus fases iniciales es, que ambos emplean la traza de memoria gustativa de corto plazo como la entrada de los mecanismos asociativos que los conectan ya sea con la ausencia de consecuencias aversivas (en el caso de la AN) o con síntomas viscerales de envenenamiento (en el caso del CAS) (Buresova y Bures, 1980).

En vista de que se considera a la AN como uno de los mejores ejemplos de selección de alimentos y el desarrollo de preferencias y, debido a los hallazgos en el experimento 2, en donde se observó una falta de preferencia por el sabor, así como la ausencia de aversión en el CAS con IIEs de 240 y 300min., se llevó a cabo una prueba de AN para determinar cómo es que se desarrolla la preferencia por la sacarina bajo las mismas condiciones del experimento anterior (número de bebederos, concentración de solución, agua y sacarina disponibles al mismo tiempo). Debido a la posibilidad a los sujetos de elegir entre agua y sacarina, llamamos a este método “AN con consumo voluntario o de libre elección (ANLE)”, mismo que permite, al igual que en nuestro modelo de CAS, detectar preferencias o aversiones muy sutiles debido a que los animales no son forzados a consumir el líquido saborizado.



## **Antecedentes**

El estímulo comúnmente utilizado para llevar a cabo los estudios de AN es una solución concentrada de sacarina: 0.3% (Ramos, 2015) y 0.5% (Gutiérrez *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Neath *et al.*, 2010; Moraga-Amaro, Cortes-Rojas, Simon y Stehberg, 2014; Ramos, 2015) debido a que incrementa la reacción neofóbica y por tanto el proceso de atenuación es más evidente (Neath *et al.*, 2010).

Con la finalidad de investigar la participación de los receptores muscarínicos presentes en la corteza insular (IC) durante la formación de la memoria segura del sabor, Gutiérrez *et al.* (2003b) llevaron a cabo una prueba de atenuación de la neofobia en ratas Wistar, para lo cual administraron infusiones de escopolamina en la IC 20 minutos antes e inmediatamente después de la primera exposición a una solución de sacarina 0.5% en grupos independientes, misma que se proporcionó nuevamente durante los dos siguientes días a la infusión. Los resultados de este estudio mostraron que la escopolamina impidió la AN de manera temporal, recuperando su desarrollo hacia el tercer día al no presentar diferencias significativas respecto de los grupos controles, mismos que mostraron un incremento en el consumo de sacarina a partir de la segunda exposición. Más tarde, para determinar el efecto del bloqueo de la síntesis de proteínas en la corteza insular durante la evocación de la memoria consolidada, Rodríguez-Ortíz *et al.* (2005) administraron infusiones de Anisomicina en dicha estructura inmediatamente y 24h posteriores al primero, segundo, tercer y sexto día de consumo de una solución de sacarina 0.3%, encontrando una disminución temporal en el consumo de la solución el día posterior a la infusión, después del cual, el consumo de sacarina siguió aumentando hasta alcanzar una meseta, indicadora de la formación de una memoria segura del sabor similar a la observada en el grupo control, sugiriendo que aun cuando la memoria está propensa a modificarse, parte de ésta no depende de la síntesis de proteínas, permitiendo el desarrollo normal de AN. Posteriormente, Lin *et al.* (2009) llevaron a cabo un experimento con ratas lesionadas en corteza insular (ICX) para determinar el efecto de la lesión sobre la AN. Para ello presentaron a los organismos una solución de sacarina 0.5%, durante cuatro días consecutivos. Los resultados mostraron que durante los primeros dos días, el grupo lesionado tuvo una respuesta neofóbica mucho menor que la observada en el grupo control no lesionado, sin embargo, hacia la tercera exposición, no se encontraron diferencias significativas en los consumos de ambos grupos

observándose atenuación de la neofobia (AN). En el 2012, Lin *et al.*, realizaron una serie de pruebas con ratas lesionadas ipsilateral y contralateralmente en la corteza gustativa (GC) y la amígdala basolateral (BLA). En este experimento se empleó como estímulo de sabor, una solución de sacarina 0.5%, que fue presentada a los organismos durante cinco días consecutivos. Se encontró que la respuesta neofóbica en ratas lesionadas contralateralmente en BLA-GC, es menor que la observada en el grupo con lesión ipsilateral y en el no lesionado, sin embargo hacia la tercera exposición no se encontraron diferencias significativas en los consumos de los tres grupos, observándose el desarrollo una AN. Más recientemente, Ramos (2015) determinó el efecto de lesiones neurotóxicas en la corteza perirhinal sobre la atenuación de la neofobia, utilizando soluciones de sacarina a concentraciones de 0.3%, 0.5% y 0.7%. que fueron presentadas a los sujetos durante 15 minutos por un periodo de 2, 3 y 5 días consecutivos. Los resultados mostraron que los grupos con sacarina 0.3% y 0.5%, lesionados en corteza perirhinal, incrementaron significativamente el consumo de la solución respecto de los controles durante la primera exposición; sin embargo los consumos al segundo y tercer día no mostraron diferencias significativas observándose AN en ambos grupos; contrario a estos grupo, el grupo con sacarina 0.7% no mostró disminución de la respuesta neofóbica durante la primera exposición, pero sí, un incremento paulatino del consumo desarrollando AN hacia el 5° día.

## **Método**

Para la prueba de AN se utilizaron sujetos y cajas de prueba con las características ya descritas. Dado que la prueba de CAS en el Experimento 1 se realizó utilizando solución de sacarina 0.1%, se empleó para esta prueba la misma concentración agregando además dos grupos de sacarina 0.3% y 0.5% (por ser éstas las más utilizadas en los trabajos publicados sobre AN) así como quinina 0.003% (sustancia innatamente muy aversiva también utilizada en experimentos de AN). Del mismo modo se mantuvieron las mismas condiciones respecto al número y posición de los bebederos, así como la posibilidad de elegir entre agua y la solución de sacarina. Los animales privadas de agua 24h, fueron colocados de manera aleatoria en 4 grupos independientes a los que se les asignó una solución específica de sacarina 0.1%, 0.3% ó 0.5% y quinina 0.003%. *El Día 1 (Habitación)* los sujetos fueron pesados y llevados de manera individual a la caja de pruebas en donde se les proporcionó agua durante 10 min., registrando

los consumos de cada bebedero, con la finalidad habituarlos a las condiciones experimentales. Los *Días 2 a 5 (Atenuación de la neofobia)* los sujetos se pesaron y llevaron a las cajas de prueba, en las que se colocaron de manera alternada, 8 bebederos llenos con la solución asignada y 8 más con agua. Se permitió a los sujetos beber durante 10 min. con la posibilidad de elegir entre ambas soluciones (Fig. 13). Los consumos fueron registrados obteniendo el IP. Los datos fueron procesados y graficados con el programa Graph Pad Prism analizando estadísticamente con ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey.

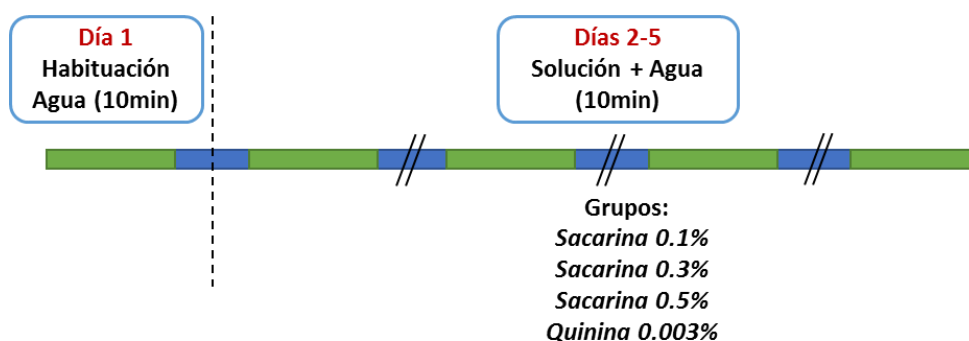
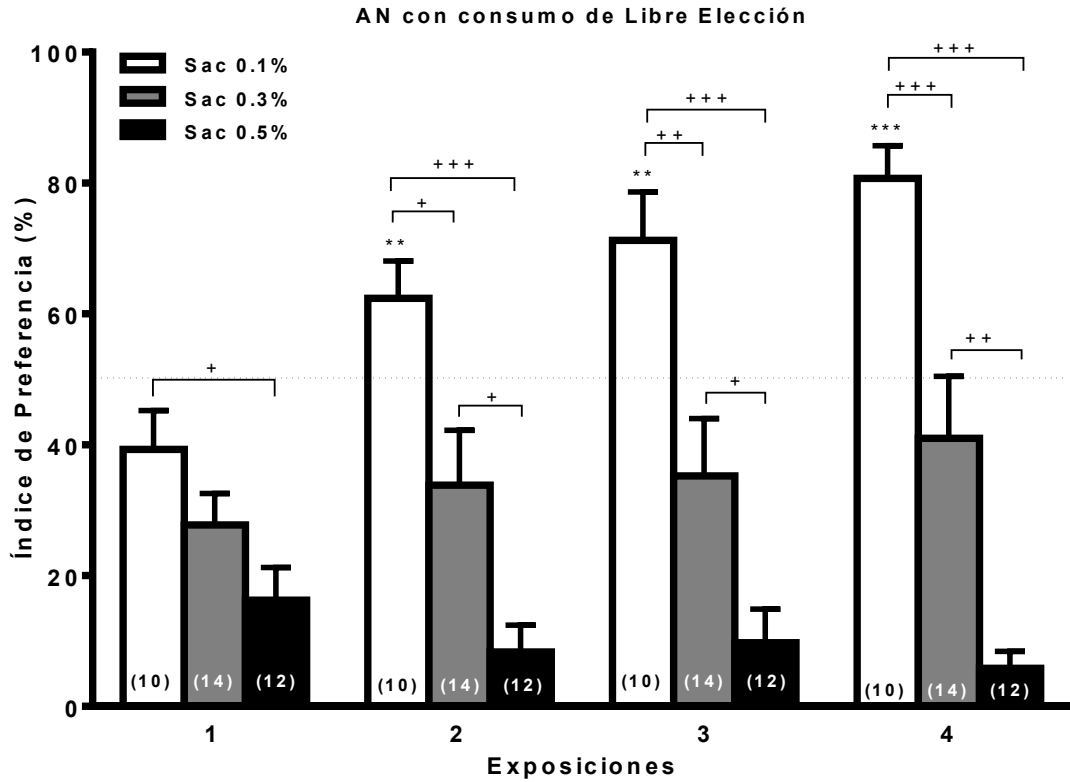


Figura 13. Método de atenuación de la neofobia con consumo de libre elección (ANLE).

## Resultados

Sorprendentemente se observó el desarrollo paulatino de AN, únicamente en el grupo al que se proporcionó la concentración más baja de sacarina (0.1%), en tanto que, contrario a lo reportado en otros estudios, el grupo al que se le dio la concentración más alta (sacarina 0.5%) no desarrolló AN, pudiendo observarse incluso, una tendencia a disminuir el consumo a partir de la segunda exposición, sugiriendo con ello cierto grado de aversión a dicha solución. Del mismo modo, el grupo sacarina 0.3%, no mostró ningún cambio en el consumo de la solución, manteniéndose sobre los mismos valores a lo largo de la prueba (Figs. 14 y 15).



*Figura 14.* Índices de preferencia (IP) obtenidos con el modelo de atenuación de la neofobia con libre elección (ANLE). Se emplearon soluciones de Sacarina al 0.1%, 0.3% y 0.5% Vs Agua. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y prueba de Tukey (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Se muestran media y  $\pm$  E.E.M. +Diferencias entre concentraciones. \*Diferencias entre exposiciones dentro de una misma concentración de sacarina respecto de la 1ª exposición. Número de sujetos por grupo (n) indicado entre paréntesis.

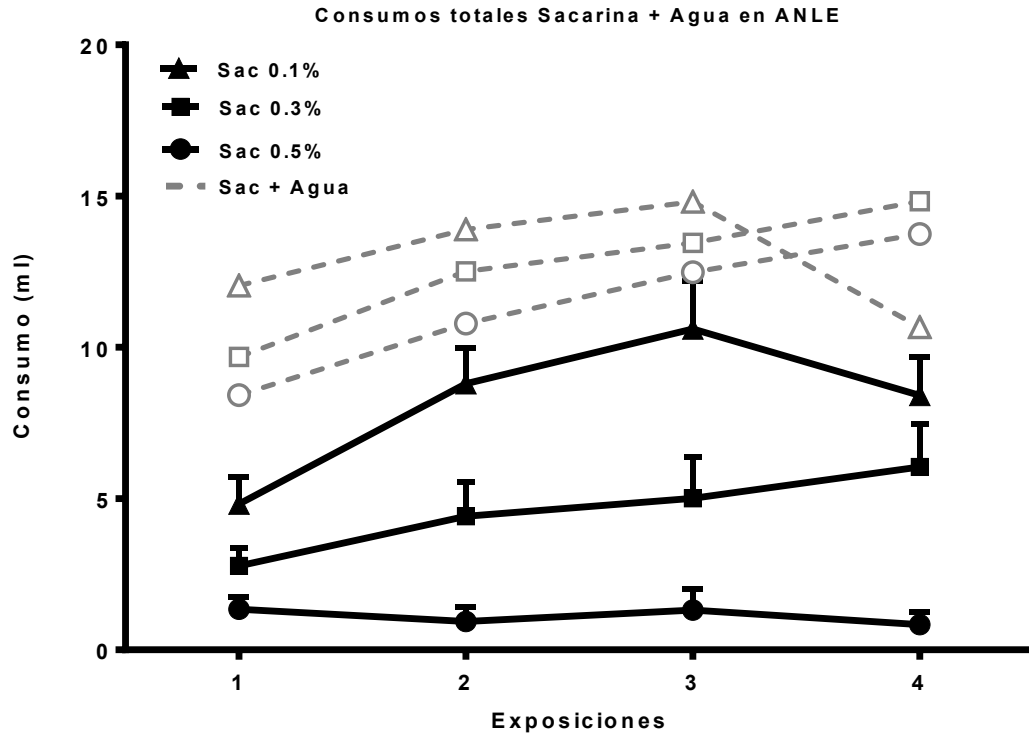


Figura 15. Consumos de sacarina (línea continua) y consumos totales (sacarina+agua) (línea punteada) obtenidos con el modelo de atenuación de la neofobia con consumo de libre elección (ANLE). (n=fig.14).

En cuanto a los resultados obtenidos con quinina 0.003%, al ser una sustancia innatamente aversiva se registraron consumos por debajo de 0.5ml., por lo que no fue posible observar el desarrollo de AN bajo este modelo (Fig. 19, línea punteada).

### 3.2 Atenuación de la neofobia bajo el modelo de consumo forzado (ANF), a distintas concentraciones de solución de sacarina

Como se mencionó con anterioridad, los estudios previos han reportado AN cuando se emplean concentraciones elevadas de sacarina (0.3% y 0.5%); sin embargo, los hallazgos del experimento anterior, en donde no se observó el desarrollo de AN con tales concentraciones, nos llevan a conducir el método tradicional de AN mediante consumo forzado (ANF).

## Método

Para este experimento se llevó a cabo el procedimiento descrito para la prueba de AN con consumo voluntario, con la diferencia de que no se proporcionó agua sino únicamente los bebederos con la solución asignada a cada grupo (sacarina 0.1%, 0.3% y 0.5% y quinina 0.003%), por lo que llamamos a este procedimiento Atenuación de la Neofobia con Consumo Forzado (ANF) (Fig. 16).

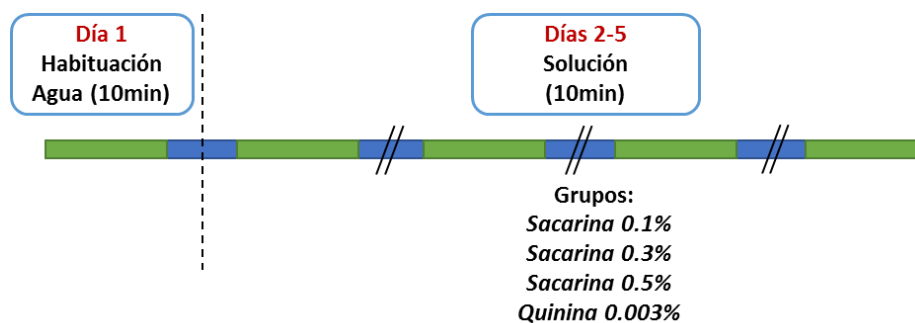
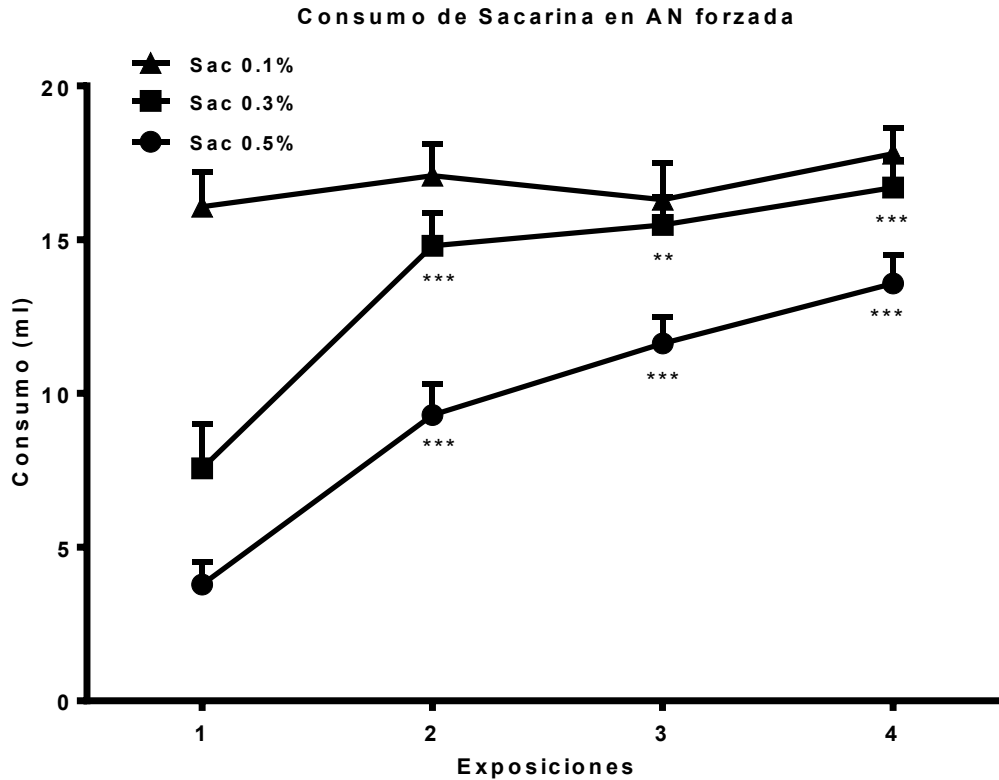


Figura 16. Método de atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF).

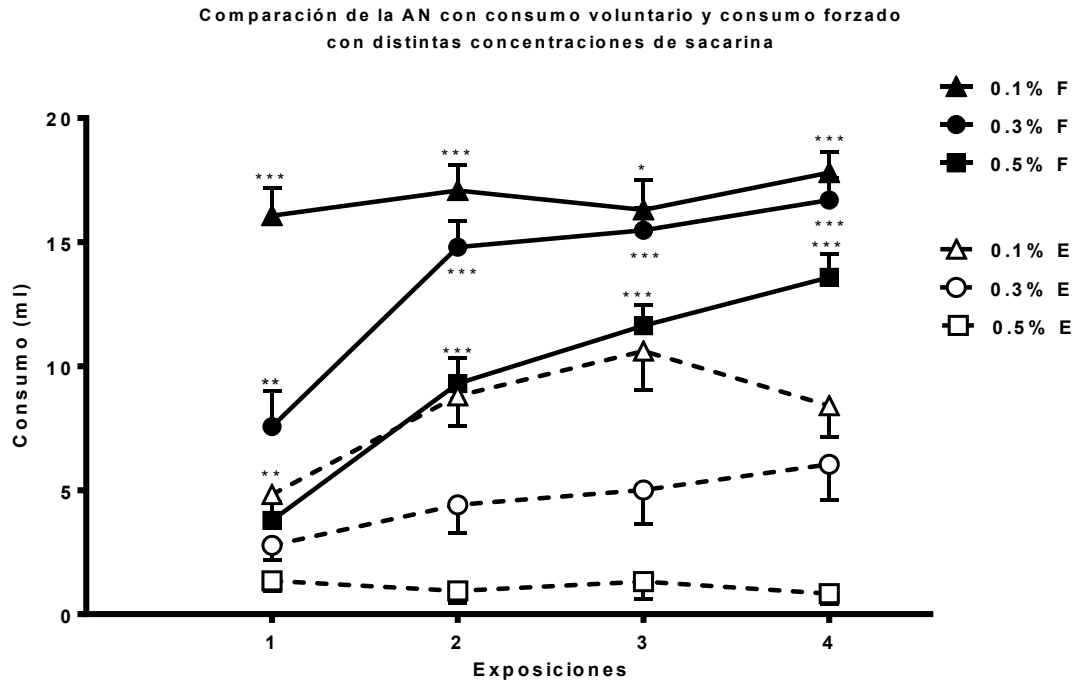
## Resultados

De manera general se observaron diferencias significativas en los consumos iniciales del grupo sacarina 0.1% respecto de los grupos sacarina 0.3% y 0.5%, siendo mayor el consumo registrado en el primer grupo, el cual se mantuvo elevado sin presentar diferencias significativas a lo largo de la prueba. Contrario a este, en los grupos sacarina 0.3% y sacarina 0.5%, se observó el desarrolló AN, registrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto del consumo inicial, a partir del segundo día de exposición (Fig. 17). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el experimento anterior llevado a cabo con consumo con libre elección, ya que ante esta situación de consumo forzado, sí es posible lograr el desarrollo de AN con concentraciones elevadas de sacarina, coincidiendo con lo reportado previamente por otros autores.



*Figura 17.* Consumo de sacarina (ml) obtenido bajo el modelo de atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF). Se emplearon soluciones de sacarina al 0.1%, 0.3% y 0.5%. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey (\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Se muestran media y  $\pm$  E.E.M. \*Diferencias entre exposiciones a la misma concentración de sacarina. <sup>+</sup>Diferencias entre concentraciones. Número de sujetos por grupo:  $n=6$ .

Para determinar las diferencias entre los modelos de ANLE y la ANF, se compararon los consumos de sacarina en sus distintas concentraciones (Fig. 18). Se observaron diferencias significativas entre ambos métodos siendo mayores los consumos registrados en el método de ANF para las tres concentraciones (\*\*\*  $P < 0.001$ ). Del mismo modo, se encontró un efecto significativo dependiendo del número de exposiciones ( $P=0.0015$ ) y a la concentración empleada ( $P < 0.0001$ ).



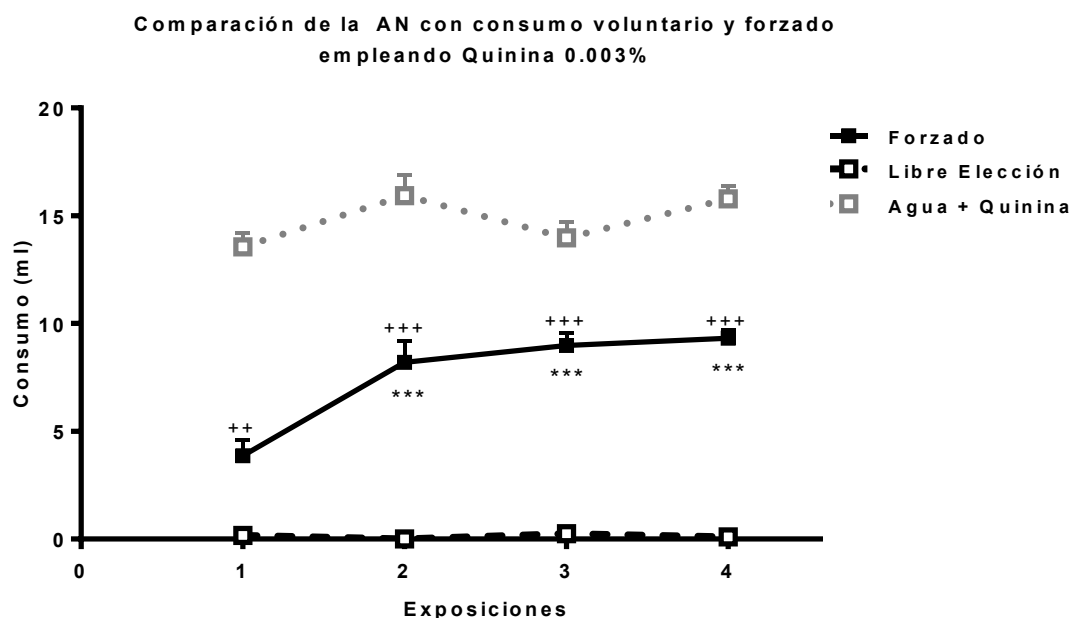
*Figura 18.* Comparación del método de ANLE (línea punteada) y ANF (línea continua). Se emplearon soluciones de sacarina al 0.1%, 0.3% y 0.5. Vs Agua para el consumo con libre elección, y únicamente las soluciones de sacarina para el consumo forzado. Se aplicó ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples de Sidak (\* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Se muestran media y  $\pm$  E.E.M. \*Diferencias entre exposiciones para cada concentración. Número de sujetos por grupo en consumo forzado:  $n=6$ ; número de sujetos en consumo con libre elección:  $n=10$  (sac. 0.1%),  $n=14$  (sac. 0.3%),  $n=12$  (sac. 0.5%).

Con la finalidad de establecer si las diferencias en los resultados que obtuvimos dependiendo del método de ingesta se presentan con otras soluciones que se han utilizado para provocar AN, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito de ANLE y ANF empleando solución de quinina 0.003%, misma que de manera innata produce aversión debido a su sabor amargo.

Los resultados obtenidos con el consumo de quinina (Fig. 19) muestran que aun con soluciones aversivas de manera innata, es posible observar diferencias significativas entre ambos métodos de AN (\*\*\*  $P < 0.001$ ). Así, con el modelo de consumo voluntario, las cantidades ingeridas a lo largo del estudio son prácticamente nulas o se encuentran por debajo de 0.5ml, lo cual era de esperarse debido a la aversión innata hacia dicho sabor y la posibilidad de elegir beber agua. Sin



embargo, con el modelo de consumo forzado fue posible observar AN a partir de la segunda exposición a la solución. Es importante destacar que si bien los consumos en este último modelo incrementaron, estos nunca alcanzaron a los consumos totales (quinina + agua) del modelo con libre elección, mismos que consideramos, serían los requeridos para saciar la sed de los sujetos.



*Figura 19.* Comparación del método de ANLE (línea punteada) y ANF (línea continua) empleando quinina 0.003%. Se aplicó Anova de una vía y prueba de Tukey (++)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ ). Se muestran media y  $\pm$  E.E.M. \*Diferencias respecto de la primera exposición; +Diferencias entre métodos por exposición. (n=6).

### ***3.3 Análisis de la ANF y la ANLE en el mismo grupo experimental***

El postulado principal de la AN es, que el desarrollo de preferencia por el sabor se debe a que el sujeto aprende que es un sabor seguro, por lo menos en aquellos que de manera innata son apetitivos como los sabores dulces. Bajo este supuesto y ante las diferencias observadas entre los métodos empleados anteriormente en las pruebas de AN, se realizó la AN tanto con consumo forzado como con consumo de libre elección aplicados de manera consecutiva en un mismo grupo de sujetos, de tal manera que, si durante la ANF el sabor es catalogado como seguro y/o preferido, como se ha reportado de manera tradicional y que en un principio sugiere nuestro

experimento, entonces el consumo se mantendrá sin cambios significativos al pasar al modelo de consumo voluntario.

## Método

Se siguieron los procedimientos descritos en los experimentos 2.1 y 2.2, con la diferencia de que ambos métodos de AN fueron probados en el mismo grupo de manera secuencial, es decir, cada grupo fue habituado durante el primer día a la caja de prueba y posteriormente sometido durante 8 días consecutivos a la prueba de AN, los primeros 4 días los sujetos tuvieron acceso durante 10 min., únicamente a la solución asignada (consumo forzado) y los 4 últimos días además de la solución, tuvieron acceso a agua de manera simultánea (consumo con libre elección) (Fig. 20).

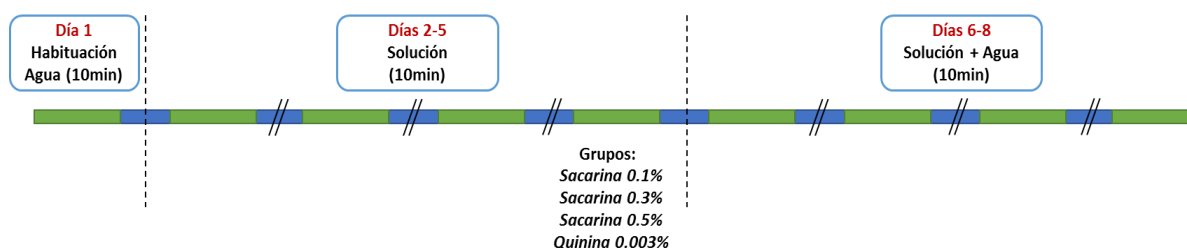


Figura 20. Método de atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF) y consumo con libre elección (ANLE) aplicados de manera consecutiva en un mismo grupo.

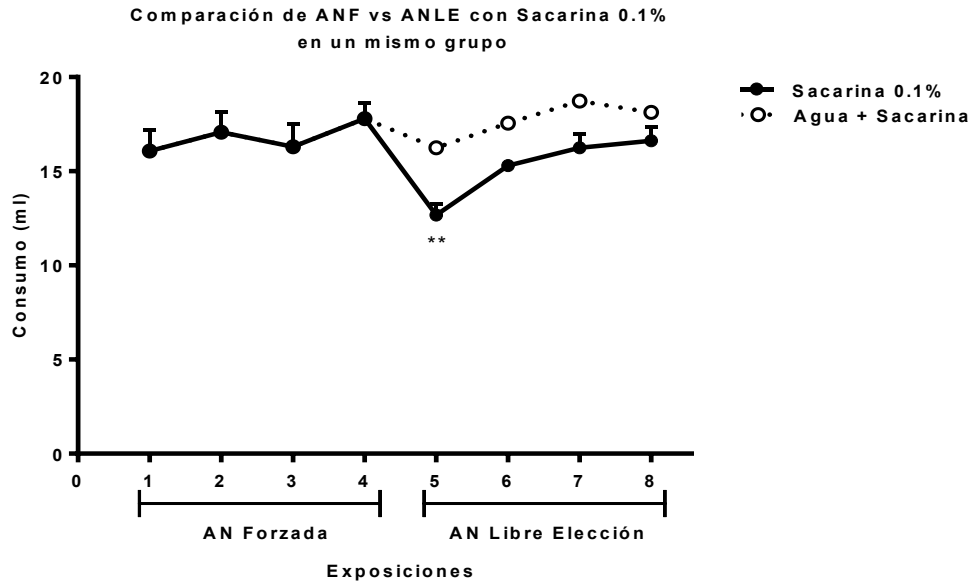
## Resultados

Los resultados mostraron que el cambio de un modelo a otro (forzado a libre elección) implica la disminución significativa del consumo de la solución, sin embargo, la intensidad y duración de dicha disminución depende en gran medida de la concentración empleada. El grupo sacarina 0.1% (Fig. 21) mostró diferencias significativas (\*\*  $P < 0.01$ ) entre la última exposición forzada (4ª exp.) y la primera exposición con libre elección (5ª exp.), observándose una disminución en su consumo; sin embargo estas diferencias durante la ANLE no fueron significativas en relación al 1er consumo registrado durante todo el experimento, lo cual puede ser un indicador de que

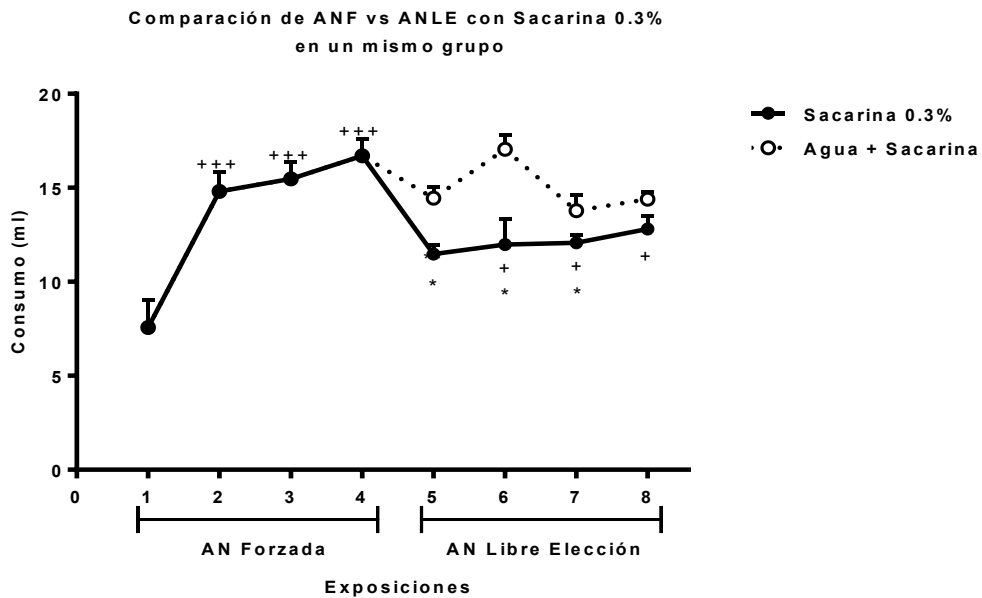
dicho sabor fue “etiquetado” como seguro. Asimismo, no se observaron diferencias entre los consumos totales durante la ANF y los consumos totales (sacarina+agua) de la ANLE, indicando con ello, el desarrollo de preferencia por la solución de sacarina 0.1%.

Respecto a los grupos con las concentraciones elevadas de sacarina 0.3% y 0.5% (Figs. 22 y 23), se observaron diferencias significativas entre la 1ª exposición y las subsecuentes tanto del modelo de ANF como del modelo de ANLE, i.e., los consumos en ambos modelos de AN fueron superiores al consumo inicial, observándose disminución de neofobia hacia dichas concentraciones, una vez que el sabor ha sido “catalogado” como seguro. Sin embargo, es importante señalar que los consumos registrados en el modelo de libre elección, disminuyeron significativamente en ambos grupos con relación a la última exposición forzada, lo que sugiere que, aun cuando este sabor parece haber sido etiquetado como seguro, esto no es suficiente para que se desarrolle una preferencia por el mismo, siendo más evidente en el grupo sacarina 0.5%.

Estas mismas diferencias entre la 1ª exposición y las subsecuentes, así como entre la última exposición de consumo forzado respecto de las exposiciones al consumo voluntario, se registraron en el grupo quinina 0.003% (Fig. 24), sin embargo, la disminución en el consumo de ésta durante la ANLE fue aún más evidente, llegando incluso por debajo del consumo inicial. Este grupo es de especial importancia en las interpretaciones que se han realizado sobre la AN así como de los métodos empleados para conseguirla, ya que si bien es posible observar AN tanto en sabores apetitivos como en aquellos que no lo son, este hecho, contrario a lo que pudiera pensarse, no implica necesariamente la formación de una memoria segura por un sabor, ni tampoco el desarrollo de la preferencia por el mismo.

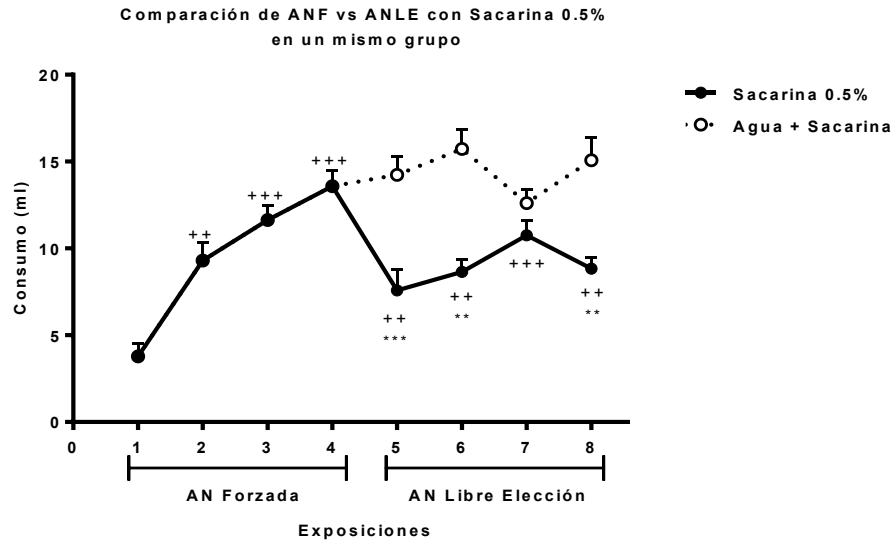


*Figura 21.* Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de sacarina 0.1%. Se aplicó ANOVA de una vía y Prueba de Tuckey (\*\* $P < 0.01$ ). Se grafica media  $\pm$  E.E.M. \*Diferencias respecto a la 4<sup>a</sup> exposición. La línea punteada indica los consumos totales (agua+sacarina registrados en el modelo de ANLE. (n=6).



*Figura 22.* Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de sacarina 0.3%. Se aplicó ANOVA de una vía y Prueba de Tuckey (\* $P < 0.05$ ; +++ $P < 0.001$ ). Se grafica media  $\pm$  E.E.M. +Diferencias respecto a la 1<sup>a</sup> exposición, \*Diferencias

respecto a la 4ª exposición. La línea punteada indica los consumos totales (agua+sacarina) registrados en el modelo de ANLE. (n=6).



*Figura 23.* Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de sacarina 0.5%. Se aplicó ANOVA de una vía y Prueba de Tuckey (\*\*P<0.01; \*\*\* P<0.001). Se grafica media  $\pm$  E.E.M. <sup>+</sup>Diferencias respecto a la 1ª exposición, \*Diferencias respecto a la 4ª exposición. La línea punteada indica los consumos totales (agua+sacarina) registrados en el modelo de ANLE. (n=6).

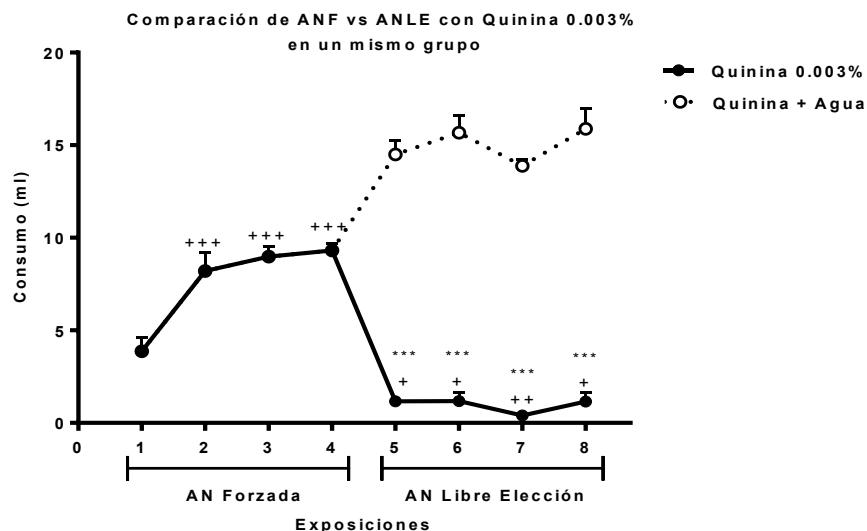


Figura 24. Comparación de ambos métodos de AN aplicados de manera secuencial a un mismo grupo de sujetos, empleando solución de quinina 0.003%. Se aplicó ANOVA de una vía y Prueba de Tuckey ( $^+P<0.05$ ;  $^{++}P<0.01$ ;  $^{***}P<0.001$ ). Se grafica media  $\pm$  E.E.M.  $^+$ Diferencias respecto a la 1ª exposición,  $^*$ Diferencias respecto a la 4ª exposición. La línea punteada indica los consumos totales (agua+quinina) registrados en el modelo de ANLE. (n=6).

## Discusión

Las diferencias en los resultados encontrados utilizando el método de ANLE respecto del método de ANF, tanto en este como en otros estudios reportados recientemente (Gutiérrez *et al.*, 2003a; Rodríguez-Ortiz, *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2012; Ramos, 2015; Moraga-Amaro *et al.*, 2014), sugieren la existencia de factores que pueden influir de manera significativa en las cantidades de solución consumida y que no han sido considerados en dichos estudios, particularmente en la interpretación de los resultados.

En este sentido, nuestros resultados sugieren que la sed es uno de los factores no considerados que puede tener un efecto en las cantidades de solución consumida y por tanto, dar lugar a una interpretación imprecisa de lo observado, especialmente en pruebas realizadas con un método de consumo forzado. Este efecto de la sed en el modelo de ANF, es más evidente en soluciones donde las concentraciones son más elevadas (sacarina 0.5%) o que presentan cierto grado de aversión innata (quinina 0.003%) ya que si bien, los consumos en el modelo de ANF

incrementaron a lo largo de la prueba, estos nunca alcanzaron a los consumos totales (solución+agua) registrados en el modelo con libre elección, consumos que evidentemente, son los requeridos para saciar la sed de los sujetos.

Debido a esto, aun cuando los consumos registrados son suficientes para observar una AN, es necesario reconsiderar si este incremento en el modelo forzado se debe a que la neofobia ha sido atenuada realmente y se ha formado una memoria segura del sabor, o si ha sido producto únicamente de la necesidad de consumir líquido para supervivir, aun cuando la única solución disponible sea aversiva.

Es importante recordar que la AN no está determinada únicamente por la novedad del estímulo (Lin *et al.*, 2012) puesto que existen sabores como la Policosa 30% y en nuestro caso, Sacarina 0.1%, que no producen una respuesta neofóbica. Neath *et al.* (2010) sugieren que la palatabilidad de un sabor, así como otros factores motivacionales (habitación al contexto, sed), pueden influir en la tendencia de una rata a acercarse o no a una botella y beber. Esto último, apoya nuestra observación sobre el rol que puede desempeñar la sed como un factor motivante fundamental para el incremento paulatino del consumo en el modelo de ANF.

Lin *et al.*, (2012) sostienen que una vez alcanzada la seguridad por un sabor debido a la ausencia de consecuencias negativas post-ingesta, la palatabilidad de éste aumenta y con ella su consumo, sugiriendo que dicha palatabilidad puede ser mantenida de manera permanente. Sin embargo, como se observó en el experimento 3.3 en el que se expuso a los sujetos a un consumo forzado y posteriormente a uno con libre elección (Ver Figs. 21-24), esta condición de permanencia de la palatabilidad y del consumo, se mantiene únicamente con concentraciones bajas de sacarina (0.1%), en tanto que se a concentraciones elevadas se ve disminuida y, en el caso de la quinina, desaparece por completo. Lo anterior sugiere que, para que permanezca la palatabilidad del sabor, es necesario que se cumplan condiciones tales como el consumo de un sabor de manera forzada; sin embargo, debido a la posibilidad de generar interpretaciones erróneas con este método, consideramos al consumo voluntario como la alternativa más confiable y precisa para la interpretación del modelo de AN, ya que, coincidiendo con Kassil, Vataeva y Makukhina (1998), la neofobia considerada en términos de consumo y no como una acción de selección, no provee bases adecuadas para la evaluación de este fenómeno.

## *EXPERIMENTO 4*

### ***4.1 Efecto del consumo con libre elección y el consumo forzado sobre la inhibición latente (IL)***

Se sabe que la novedad de un sabor influye en la adquisición del CAS, siendo más fácil desarrollar aversión cuando el estímulo condicionado (EC) (sabor) es novedoso, que cuando es familiar (Lin *et al.*, 2009; Miranda, 2012). En ausencia de reforzamiento, la pre-exposición pasiva al EC genera una memoria apetitiva del sabor, que da lugar a un aumento en su consumo y disminuye su habilidad para asociarse con un estímulo incondicionado (EI) (malestar); es decir, la robustez de la aversión disminuye significativamente, en comparación con la que se adquiere cuando el sujeto no ha sido expuesto previamente al EC; a este fenómeno se le ha denominado inhibición latente (IL) (Best, 1975; De la Casa y Lubow, 1995; Dwyer, Gasalla y López, 2013; Moraga *et al.*, 2014 y Gaztañaga, Aranda-Fernández, Díaz-Cenzano y Chotro, 2015)

Debido a las diferencias observadas en relación al “etiquetado” de un sabor, que depende del método de presentación del mismo (forzado vs libre elección) consideramos relevante analizar si existen diferencias en el grado de inhibición latente (IL) producida por ambos métodos; bajo el supuesto de que, el método que permita el desarrollo de una AN verdadera, favorecerá una IL más evidente.

#### **Antecedentes**

Hoffman y Spear (1989) realizaron un estudio de preferencia espacial por el olor, empleando ratas de 10-18 días de edad, a las que pre-expusieron durante 15 o 45 min. por dos días consecutivos a distintos olores (limón y menta), y condicionadas dos horas después de la 2ª pre-exposición al olor mediante una descarga eléctrica en las patas. Sus resultados mostraron una facilitación del condicionamiento en el grupo pre-expuesto durante 15 min., en tanto que con 45min de pre-exposición, no se observó dicha facilitación. Años más tarde Roman y Reilly (2007) determinaron el efecto de la lesión en CI de ratas Sprague-Dawley sobre la adquisición del CAS; para ello pre-expusieron durante 15 min. a una solución de sacarina 0.15%, a ratas lesionadas y ratas SHAM durante 5 días consecutivos; posteriormente, en los días 6, 9, 12, 15 y



18 de la prueba y 30 min. después de la presentación del sabor, los sujetos fueron inyectados i.p. con LiCl 0.15M (1.3ml/100g p.c.). Sus resultados hacia el día 21 mostraron la presencia de respuesta neofóbica en los grupos SHAM durante la primera exposición, mientras que en los grupos lesionados no se presentó dicha respuesta. Por otro lado, el grupo SHAM pre-expuesto, desarrolló aversión más lentamente que su contraparte no pre-expuesta, en tanto que ambos grupos lesionados desarrollaron aversión al mismo tiempo independientemente de si el sabor era novedoso o familiar, concluyendo que la CI interrumpe la neofobia por el sabor, lo que retarda la adquisición del CAS debido a un efecto similar a la inhibición latente. Más recientemente, Gastañaga *et al.* (2015) pre-expusieron a ratas Wistar pre destete, durante 1 y 3 veces, a infusiones intraorales de solución de sacarina 0.15%, condicionándolas con una dosis baja (0.15M) y una dosis alta (0.30M) de LiCl i.p. Estos autores encontraron que la exposición previa al EC (sacarina), puede actuar como retardante o como facilitadora del condicionamiento, dependiendo del número de pre-exposiciones, de la dosis de EI empleada y del número de condicionamientos. En el caso de ratas adultas Bennet, Tremain y Mackintosh, (1996) las preexpusieron a 1ml y 4ml de una solución de glutamato monosódico-quinina-sucrosa, y las condicionaron hacia el día 11, con una inyección i.p. de LiCl 0.15M (10 ml/kg); sus resultados mostraron facilitación del condicionamiento en los grupos que bebieron una pequeña cantidad (1ml) en un solo entrenamiento, sugiriendo que dicho fenómeno de facilitación del CAS, ocurre sólo bajo condiciones específicas, i.e. ante sabores compuestos y una pre-exposición corta.

## **Estímulos**

Para la prueba de inhibición latente (IL) se utilizaron soluciones de sacarina 0.1% y 0.5%, así como solución de quinina 0.003%.

## **Método**

El *Día 1* se llevó a cabo la *habitua*ción de los sujetos a las cajas experimentales empleando el procedimiento descrito en los experimentos previos y se dividió a los sujetos en 5 grupos: tres grupos para sacarina 0.5%: 1) IL con consumo forzado (IL F)-CAS Forzado (CAS F), 2) ILF-CAS libre elección (CAS LE) y 3) IL con consumo con libre elección (IL LE) -CAS LE; 1 grupo

para sacarina 0.1% (IL F-CAS LE) y un grupo para quinina 0.03%. (IL F-CAS LE) (Fig. 25). En los *Días 2-4* se llevó a cabo la *pre-exposición* al sabor, para lo cual se proporcionaron durante 10 minutos las distintas soluciones de acuerdo al método asignado para cada grupo. El *Día 5* se realizó el *condicionamiento* mediante el método ya descrito, empleando un IIE de 30min. El *Día 6* fue de *recuperación* proporcionando únicamente agua durante 10min. y el *Día 7* se llevó a cabo la *evocación* de la MLP.

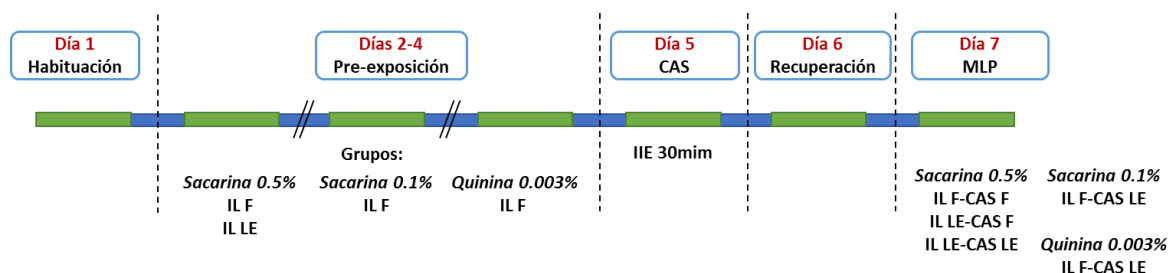


Figura 25. Metodología empleada para la prueba de inhibición latente (IL) bajo condiciones de consumo forzado y consumo con libre elección.

## Resultados

Los datos obtenidos empleando solución de sacarina 0.5% (Fig. 26), mostraron la presencia de memoria aversiva en los grupos pre-expuestos a la solución bajo el método de consumo forzado (IL F), independientemente del método utilizado (forzado vs voluntario) durante la prueba de evocación (\*\* $P < 0.001$ ). Por otro lado, se observó el desarrollo de inhibición latente (IL) únicamente en el grupo donde la evocación de la memoria aversiva se realizó bajo condiciones de consumo forzado (CAS F) ( $*P < 0.05$ ).

### Efecto de la pre-exposición forzada a sacarina 0.5%

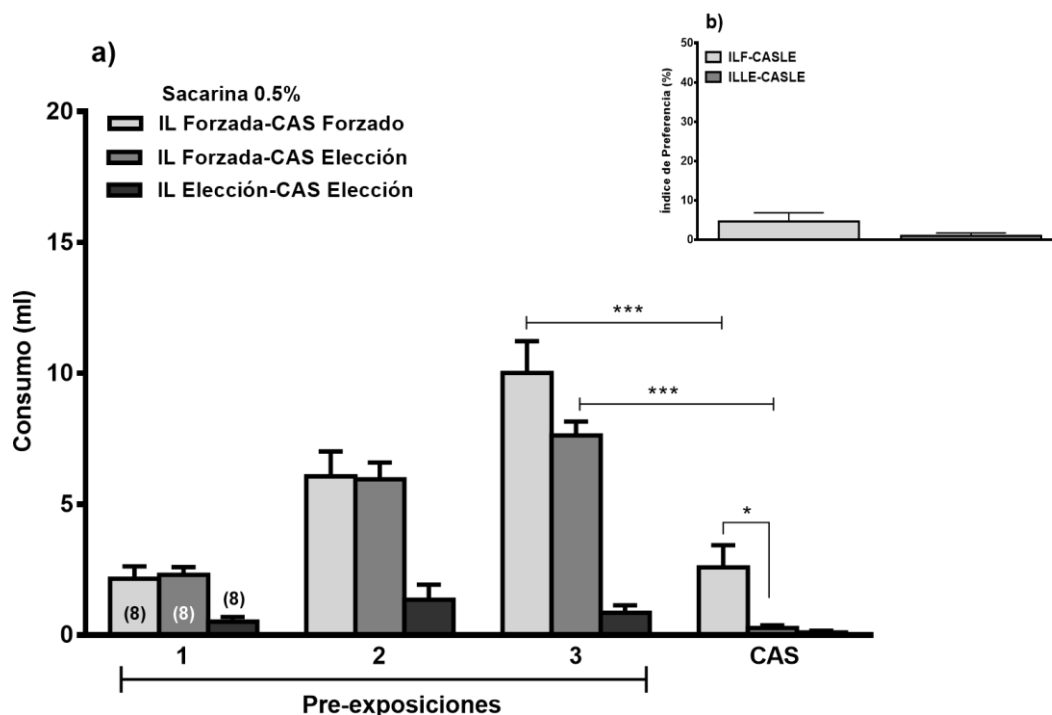


Figura 26. a) Efecto de la pre-exposición a Sacarina 0.5% de manera forzada vs con libre elección y la evocación de memoria aversiva a largo plazo (CAS) de manera forzada vs con libre elección en el modelo de IL. b) Índices de preferencia (IP) registrados en los grupos evocados con libre elección (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Número de sujetos por grupo (n) indicado entre paréntesis.

En cuanto al grupo sacarina 0.1%, se observó aversión por el sabor en el grupo pre-expuesto de manera forzada (IL F-CAS LE) (Fig. 27); sin embargo, a diferencia del grupo sacarina 0.5%, expuesto a las mismas condiciones (IL F-CAS LE), con esta concentración baja sí fue posible observar cierto grado de IL al evocar en condiciones de consumo con libre elección, esto, al comparar contra el grupo control, condicionado aversivamente sin pre-exposición a la solución.

### Efecto de la pre-exposición forzada a sacarina 0.1%

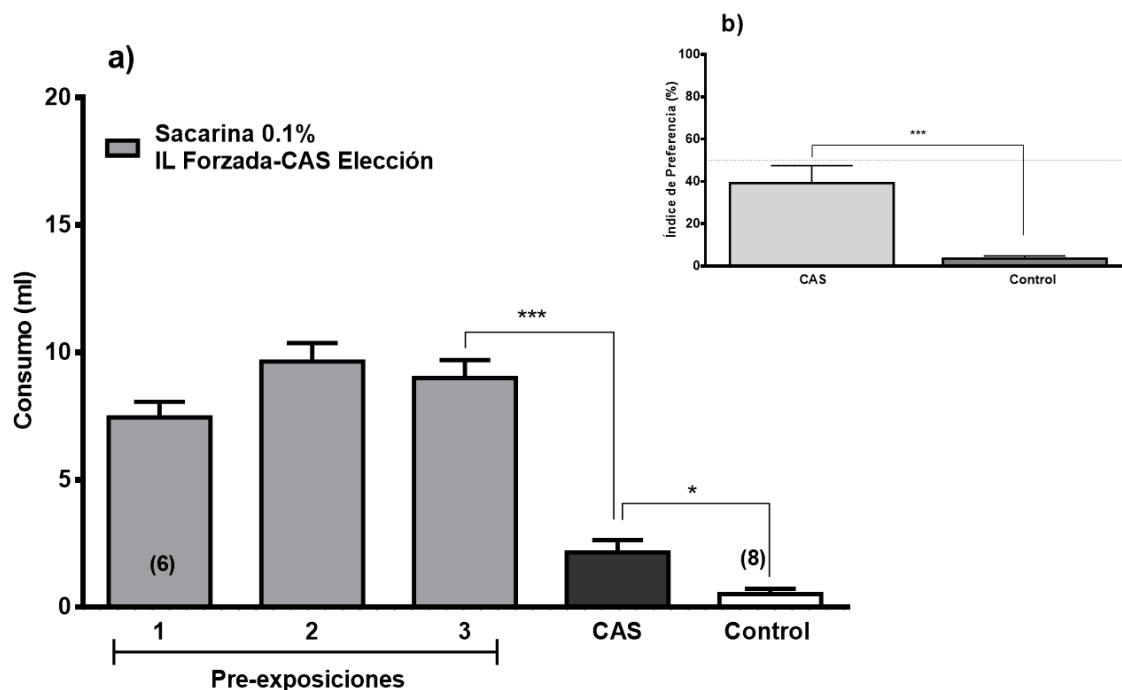


Figura 27. a) Efecto de la pre-exposición forzada a Sacarina 0.1% en la evocación de la memoria aversiva a largo plazo (MLP) con consumo de libre elección. b) Índices de preferencia obtenidos en el grupo condicionado pre-expuesto (CAS) y el grupo control sin pre-exposición (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Número de sujetos por grupo (n) indicado entre paréntesis.

Al comparar a los grupos de ambas concentraciones de sacarina (0.1% y 0.5%) pre-expuestos con consumo forzado y evocados con libre elección (IL F-CAS LE) (Fig. 28), se encontraron diferencias significativas entre ellos, durante los dos primeros días de pre-exposición (\*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  respectivamente), en tanto que, hacia el tercer día, ya no se observaron diferencias. A pesar de que ambas concentraciones parecen haber sido catalogadas como “seguras”, al condicionar y evocar la MLP se observó una aversión más robusta hacia la solución más concentrada (sacarina 0.5%).

Comparación del efecto en CAS de la pre-exposición forzada a sacarina 0.1% y 0.5%

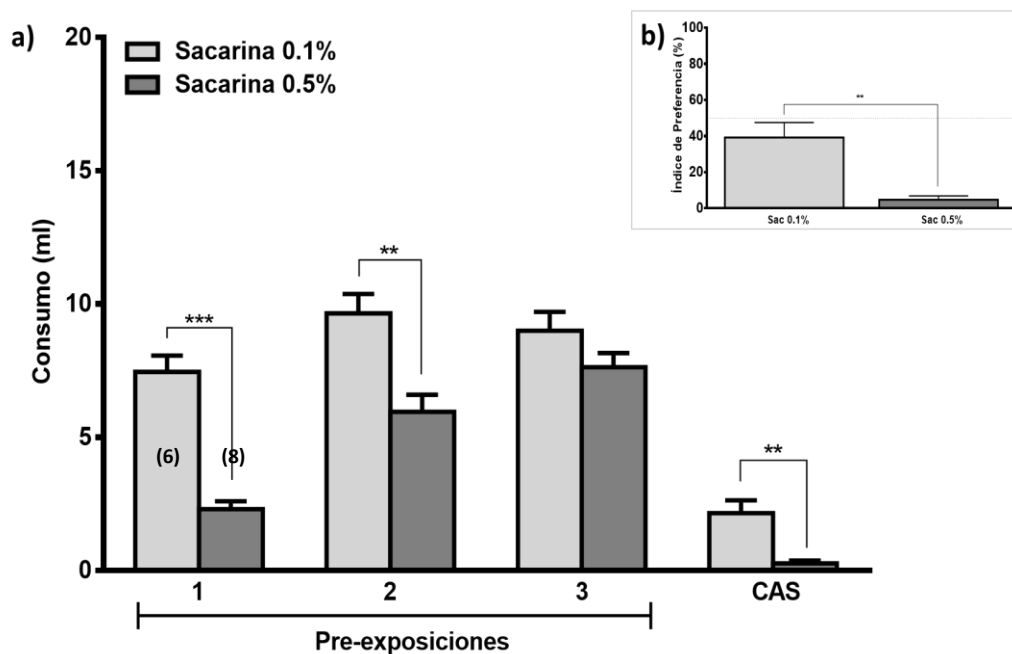


Figura 28. a) Comparación de los consumos registrados en los grupos pre-expuestos de manera forzada a sacarina 0.1% (concentración baja) y sacarina 0.5% (concentración elevada) durante la prueba de IL. b) Consumos expresado en índices de preferencia (IP) para ambas concentraciones durante la evocación de la MLP (b) (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Número de sujetos por grupo (n) indicado entre paréntesis.

Finalmente, tampoco se observó IL al evocar la MLP con el método de consumo voluntario en el grupo pre-expuesto de manera forzada a quinina 0.003% (ILF-CAS LE) aun cuando el incremento en el consumo durante la fase de pre-exposición sugiere que el sabor ha sido “etiquetado” como seguro (Fig. 29). Esto demuestra nuevamente, que dicho aumento en el consumo da lugar a la formulación de conclusiones erróneas sobre fenómenos como la IL y la AN.

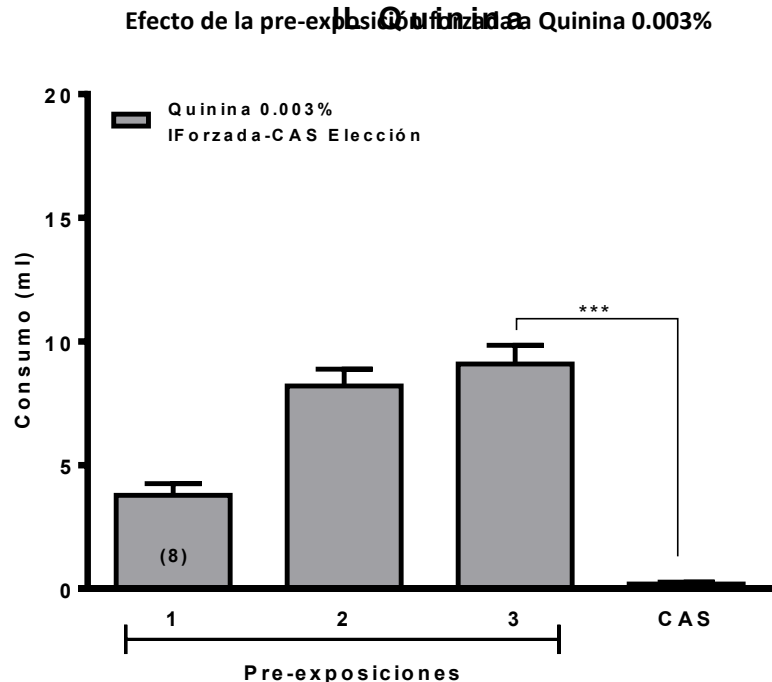


Figura 29. Efecto de la pre-exposición a quinina 0.003% durante tres días, sobre la evocación de la memoria aversiva a largo plazo (CAS) en el modelo de IL (\*\*P<0.001). Número de sujetos (n) indicado entre paréntesis.

## Discusión

Se ha hipotetizado que en la inhibición latente (IL), el hecho de que los sujetos sean expuestos previamente a un sabor, favorece la formación de una memoria apetitiva que, ante un condicionamiento aversivo posterior, impide la asociación de dicho sabor conocido con las consecuencias viscerales adversas y por lo tanto, la formación de una memoria aversiva hacia ese sabor (Miranda, 2012). Sin embargo los resultados obtenidos en este experimento muestran que el desarrollo de la IL depende de factores como la concentración de la solución y el método con el cual se realiza la prueba de memoria, pues a diferencia de otros estudios en los que se ha reportado IL con concentraciones elevadas de sacarina, en el nuestro únicamente se pudo observar en el grupo evocado empleando el método de consumo forzado; en tanto que los grupos evocados con consumo de libre elección, mostraron aversión al sabor aun cuando los consumos de éste aumentaron gradualmente durante la fase de pre-exposición.

Algunos autores han encontrado, que bajo ciertas condiciones tales como la edad de los sujetos (Hoffman y Spear, 1989), la complejidad del sabor (Bennet *et al.*, 1996), el número y duración de las pre-exposiciones o la dosis empleada de EI (Gastañaga *et al.*, 2015), es posible observar un efecto facilitador del CAS o de la IL; encontrando que ésta se presenta principalmente en ratas jóvenes (Hoffman, 1989; Bennet *et al.*, 1996) y con tiempos cortos de pre-exposición al EC tanto si es gustativo (Bennet *et al.*, 1996) como olfativo (Hoffman y Spear, 1989). Asimismo, se ha reportado este fenómeno de facilitación, cuando se emplean sabores compuestos o complejos (sacarina vs sucrosa) expuestos durante con periodos cortos de tiempo (Bennet *et al.*, 1996; Chotro y Alonso, 2001).

En este estudio con ratas adultas, la metodología empleada para evocar la memoria, se suma a la lista de condiciones que favorecen el desarrollo de CAS, aun cuando el sabor ha sido expuesto previamente. Por otro lado, la aparente IL observada en el grupo sacarina 0.5% evocado de manera forzada, se debe a que dicho consumo no permite observar aversión aun cuando la haya pues los animales no tienen más opción que consumir el único líquido disponible.

Por otro lado, el efecto de la concentración de las soluciones de sacarina empleadas en este estudio, pueden ser equiparables al efecto producido por la complejidad del sabor reportado por autores tales Bennet *et al.* (1996) y Chotro y Alonso (2001), quienes encontraron que, con sabores compuestos se produce una facilitación del condicionamiento aversivo, misma que disminuye al incrementar el tiempo de exposición al sabor o con sabores menos complejos (sabores primarios). Lo anterior puede explicar el hecho de que aunque en el grupo sacarina 0.1% se observó aversión (ver Fig. 27), también fue posible observar cierto grado de IL al comparar con el grupo control no pre-expuesto, mostrando que el desarrollo de la IL es inversamente proporcional a la concentración de la solución empleada (a mayor concentración mayor aversión y por lo tanto menor desarrollo de IL). Este resultado se asemeja al reportado por Rodríguez-Ortiz *et al.*, (2005) quienes observaron la formación de una aversión creciente hacia una solución de sacarina 0.3%, a pesar de haber alcanzado previamente una AN, demostrando con ello, que es posible generar aversión a pesar de que un sabor ha sido etiquetado como seguro.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de la presente tesis muestran la interacción entre el CAS y la AN (resumen en Tabla A), misma que ha sido sugerida en varios estudios anteriormente, en los que se considera que la convergencia de ambos fenómenos se lleva a cabo durante la etapa de adquisición, en la que el sabor percibido debe ser etiquetado de acuerdo a sus consecuencias post-ingesta (seguro o aversivo). Reportes previos han propuesto que es necesario un tiempo de 6h para que el sabor sea etiquetado como seguro y familiar (Gutiérrez *et al*, 2003b) y se ha considerado que tres exposiciones a la solución, son suficientes para poder observar el desarrollo de AN de manera confiable (Lin *et al*, 2009).

Sin embargo, en este estudio el efecto del EI, es decir, la presencia de una memoria aversiva residual, parece afectar dichos parámetros; ya que, a pesar de haber transcurrido 48h (lapso notablemente mayor a las 6h propuestas) posteriores al consumo del sabor (evocación de MLP), en los grupos condicionados con IIEs de 240 y 300min. los consumos no fueron estadísticamente diferentes a los registrados en el grupo control expuesto por única ocasión al sabor. Esto sugiere una respuesta similar a la neofobia (contraria al desarrollo de memoria segura) como consecuencia del CAS con IIE largo, impidiendo a la vez, el desarrollo de preferencia por el sabor, aun después de haber consumido la solución de sacarina por segunda ocasión.

Por otro lado, se ha sugerido que el desarrollo de la AN puede no necesariamente cambiar la percepción de un sabor aversivo como apetitivo, sino únicamente cambiar el grado en que dicho sabor resulta apetitivo para el sujeto (Dwyer *et al.*, 2013).

Esto apoya nuestra crítica hacia los resultados obtenidos en este y en otros reportes, respecto a la utilización del método forzado en pruebas de AN, pues si bien, los consumos de solución de sacarina a altas concentraciones aumentan a lo largo de la prueba, esto no necesariamente implica que el sabor sea considerado como apetitivo, sino que, ante condiciones de privación prolongada de agua y la imposibilidad de elegir qué sustancia beber, el sujeto debe adaptarse a los recursos disponibles consumiendo cantidades elevadas de la solución aversiva, lo que, como ya se mencionó, da lugar a interpretaciones erróneas sobre el fenómeno de AN.



Finalmente, el efecto facilitador del CAS producto de la pre-exposición forzada a concentraciones elevadas de sacarina (0.3% y 0.5%), sustenta el hecho de que si bien, un organismo puede incrementar el consumo de un alimento o sabor, que bajo condiciones de libre elección rechazaría, éste incremento no es un indicador fiable de la formación de una memoria segura del sabor.

*Tabla A.* Interpretación de los eventos conductuales registrados durante las distintas pruebas de condicionamiento aversivo al sabor (CAS), atenuación de la neofobia (AN) e inhibición latente (IL).

<i><b>Prueba</b></i>	<i><b>Hallazgos</b></i>
<b>CAS con “Reactivación”</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El IIE largo no genera una condición de aprendizaje subóptimo, i.e. buena MCP con una MLP deficiente.</li> <li>• La calidad de las MCP y MLP se corresponden una con otra; i.e. el desarrollo de una buena MCP da lugar también a una buena MLP.</li> <li>• La doble evocación de la memoria aversiva (a corto y largo plazo en un mismo grupo) no “reactiva” o mejora a la MLP.</li> <li>• La doble evocación facilita el desarrollo de la preferencia por el sabor.</li> </ul>
<b>CAS con IIEs largos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de memoria aversiva al sabor hasta los 180 min de IIE.</li> <li>• Ausencia de aversión por el sabor a IIEs de 240 y 300min.</li> <li>• Bloqueo de la preferencia por el sabor a partir de los 240 min de intervalo.</li> </ul>
<b>Atenuación de la neofobia con consumo voluntario o de libre elección (ANLE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No se produce AN con concentraciones elevadas de sacarina (0.3% y 0.5%) o soluciones innatamente aversivas (quinina 0.003%).</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo de preferencia y formación de memoria segura con concentraciones bajas de sacarina (0.1%).</li> </ul>
<p><b>Atenuación de la neofobia con consumo forzado (ANF)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo aparente pero no real, de AN con concentraciones elevadas de sacarina (0.3% y 0.5%) o soluciones innatamente aversivas (quinina 0.003%).</li> <li>• Formación aparente, más no real, de memoria segura del sabor.</li> <li>• No hay desarrollo de preferencia.</li> </ul>
<p><b>ANF+ANLE</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El grado de AN con consumo forzado no es permanente.</li> <li>• Disminución significativa en el consumo de soluciones concentradas o innatamente aversivas ante la posibilidad de elección.</li> <li>• Preferencia por el sabor y AN poco confiables.</li> </ul>
<p><b>Inhibición latente (IL)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dependiente del método de presentación del estímulo durante la pre-exposición y la evocación (consumo forzado vs consumo con libre elección).</li> <li>• Desarrollo de CAS con pre-exposición forzada a concentraciones altas de sacarina (0.3% y 0.5%) o soluciones innatamente aversivas (quinina 0.003%).</li> <li>• Desarrollo de IL con concentraciones bajas de sacarina (0.1%).</li> </ul>

## CONCLUSIONES

- El fenómeno de “reactivación” o facilitación de la consolidación de la MLP requiere de condiciones que permitan un aprendizaje subóptimo, mismas que no se pudieron establecer en el modelo de CAS con los parámetros utilizados en este estudio.
- La ausencia de memoria aversiva a corto y largo plazo con IIEs largos en el modelo de CAS, podría deberse a que el intervalo largo favorece la formación de una memoria segura por el sabor y por tanto dificulta la asociación de los estímulos.
- El incremento en el consumo de una solución de manera forzada, no necesariamente es indicativo de la formación de una memoria segura del sabor ni del desarrollo de preferencia por el mismo.
- El método de presentación del estímulo de sabor (consumo forzado vs consumo voluntario) así como la saliencia del mismo, determinan si se favorece la adquisición del CAS o el desarrollo de IL.

## LITERATURA CITADA

- Ambrogi-Lorenzini, C.G.; Baldi, E.; Bucherelli, C.; Sacchetti, B. y Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71:1-18.
- Barot, S.K.; Kyono, Y.; Clark, E.W. y Bernstein, I.L (2008). Visualizing stimulus convergence in Amygdala neurons during associative learning. *National Academy of Sciences of the USA*, 105(52):20959–20963.
- Bear, M.F.; Connors, B.W. y Pardiso, M.A. (2001). *Neuroscience. Exploring the brain*. 2a ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bennett, C.H.; Tremain, M. y Mackintosh, N.J. (1996). Facilitation and retardation of flavour aversion conditioning following prior exposure to the CS. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 49(3):220-230.
- Best, M. R. (1975). Conditioned and latent inhibition in taste-aversion learning: clarifying the role of learned safety. *Journal of Experimental Psychology*, 104(2):97-113.
- Bures, J.; Bermudez-Rattoni, F.; y Yamamoto, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*. New York: Oxford University Press.
- Buresova, O. y Bures, J. (1980). Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats. *Behavioural Brain Research*, 1:299-312.
- Chapuis, J.; Messaoudi, B.; Ferreira, G. y Ravel, N. (2007). Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behavioral Neuroscience*. 121:1383–1392.
- Chotro, M.G. y Alonso, G. (2001). Some parameters of stimulus preexposure that affect conditioning and generalization of taste aversions in infant rats. *International Journal of Comparative Psychology*, 14:43-63.
- Dardou, D.; Datiche, F. y Cattarelli, M. (2007). Does taste or odor activate the same brain networks after retrieval of taste potentiated odor aversion?. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88:186–197.
- Davis, J.L. y Bures, J. (1972). Disruption of saccharin-aversion learning in rats by cortical spreading depression in the CS-US interval. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 80(3):398-402.
- De la Casa, G. y Lubow, R. E. (1995). Latent inhibition and conditioned taste aversion: the role of stimulus frequency and duration and the amount of fluid ingested during preexposure. *Neurobiology of Memory and Learning*, 64-125-132.

- De la Cruz, V.; Rodríguez-Ortiz, C.J.; Balderas, I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *European Journal of Neuroscience*, 28:1377-1381.
- Dwyer, D. M.; Gasalla, P. y López, M. (2013). Nonreinforced flavor exposure attenuates the effects of conditioned taste aversion on both flavor consumption and cue palatability. *Learning & Behavior*, 41:390–401.
- García, J.; Ervin, F.R. y Koelling, R.A. (1966). Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science*, 5(3):121-122.
- García, J.; Hankins, W.G.; Robinson, J.H. y Vogt, J.L. (1972). Baith shyness: Test of CS-US mediation. *Physiology and Behavior*, 8:807-810.
- Gaztañaga, M.; Aranda-Fernández, P. E.; Díaz-Cenzano, E. y Chotro, M. G. (2015). Latent inhibition and facilitation of conditioned taste aversion in preweanling rats. *Developmental Psychobiology*, 57:96–104.
- Gluck, M.A. y Bower, G.H. (1988). From conditioning to category learning: An adaptative network model. *Journal of Experimental Psychology*, 117(3):227-247.
- Gutiérrez, R.; De la Cruz, V.; Rodríguez-Ortiz, C.J. y Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learning & Memory*, 11:95–101.
- Gutiérrez, R.; Rodríguez-Ortiz, C.J.; De La Cruz, V.; Nuñez-Jaramillo, L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003b). Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80: 323–331.
- Gutiérrez, R.; Téllez, L.A. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003a). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, 17:1556-1562.
- Hankins, W.G.; Garcia, J. y Rusiniak, K.W. (1973). Dissociation of odor and taste in baitshyness. *Behavioral Biology*, 8: 407–419.
- Hermann, G.E. y Rogers, R.C. (1985). Convergence of vagal and gustatory afferent input within the parabrachial nucleus of the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 13:1-17.
- Hikida, T.; Morita, M. y Mcpherson, T. (2016). Neural mechanism of the nucleus accumbens circuit in reward and aversive learning. *Neuroscience Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.01.004>
- Hinderliter, C.F.; Musci, J.A.; Pollack, C.A.; Misanin, J.R. y Anderson, M.J. (2004). Hypothermia modifies the effective CS-US interval in conditioned taste aversion in rats. *Neuroscience Letters*, 369: 142-144.

- Hoffman, H. y Spear, N.E. (1989). Facilitation and impairment of conditioning in the preweanling rat after prior exposure to the conditioned stimulus. *Animal Learning & Behavior*, 17(1):63-69.
- Houpt, T.A.; Philopena, J.M.; Joh, T.H. y Smith, G.P. (1996). c-Fos induction in the rat nucleus in the solitary tract correlates with the retention and forgetting of a conditioned taste aversion. *Learning & Memory*, 3:25-30.
- Izquierdo, I.; Medina, J.H.; Vianna, M.R.M.; Izquierdo, L.A. y Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short-and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103:1-11.
- Kalat, J.W. y Rozin, P. (1973). "Learned safety" as a mechanism in long-delay taste-aversion learning in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 83(2):198-207.
- Kandel, E. R.; Schwartz, J. H. y Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th ed., USA, Mc Graw Hill.
- Kassil, V.G.; Vataeva, L.A. y Makukhina, G.V. (1998). Role of the vagus nerves in neophobia and conditioned-reflex taste aversion. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 28(6):678-685.
- Klein, S.B.; Cosmides, L.; Tooby, J. y Chance, S. (2002). Decisions and the Evolution of Memory: Multiple Systems, Multiple Functions. *Psychological Review*, 109(2):306-329.
- Koh, M.T. y Bernstein, I.L. (2005). Mapping conditioned taste aversion associations using c-Fos revealed a dynamic role for insular cortex. *Behavioral Neuroscience*, 119(2):388-398.
- Lattal, K.M y Bernardi, R.E. (2007). Cellular Learning Theory: Theoretical Comment on Cole and McNally. *Behavioral Neuroscience*, 121(5):1140-1143.
- Lin, J. Y.; Amodeo, L. R.; Arthurs, J. y Reilly, S. (2012). Taste neophobia and palatability: The pleasure of drinking. *Physiology & Behavior*, 106:515–519.
- Lin, J. Y.; Roman, C.; St. Andre, J. y Reilly, S. (2009). Taste, olfactory and trigeminal neophobia in rats with forebrain lesions. *Brain Research*, 1251:195-203.
- Lin, J.Y. y Reilly, S. (2012). Amygdala-gustatory insular cortex connections and taste neophobia. *Behavioural Brain Research*, 235:182-188.
- Lin, J.Y.; Roman, C.; St. Andre, J. y Reilly, S. (2008). Taste, olfactory and trigeminal neophobia in rats with forebrain lesions. *Brain Research*, 1251:195-203.
- McLaurin, W.A. (1964). Postirradiation saccharin avoidance in rats as a function of the interval between ingestión and exposure. *Journal of comparative and Physiological Psychology*, 57(2); 316-317.
- Miller, R.R. y Holzman, A.D. (1981). Neophobias and conditioned taste aversions in rats following exposure to novel flavors. *Animal Learning & Behavior*, 9(1):89-100.

- Miranda, M. I. (2012). Taste and odor recognition memory: the emotional flavor of life. *Reviews in the Neuroscience*, 23(5-6): 481–499.
- Misanin, J.R.; Anderson, M.J.; Christianson, J.P.; Collins, M.M.; Goodhart, M.G.; Rushanan, S.G. y Hinderliter, C.F. (2002a). Low body temperature, time dilation and long-trace conditioned flavor aversion in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78:167-177.
- Misanin, J.R.; Collins, M.; Rushanan, S.; Anderson, M.J.; Goodhart, M. y Hinderliter, C.F. (2002b). Aging facilitates long-trace taste aversion conditioning in rats. *Physiology and Behavior*, 75:759-764.
- Misanin, J.R.; Goodhart, M.G.; Anderson, M.J. y Hinderliter, C.F. (2001). The interaction of age and unconditioned stimulus intensity on long-trace conditioned flavor aversion in rats. *Developmental Psychobiology*, 40:131-137.
- Moraga-Amaro, R.; Cortes-Rojas, A.; Simon, F y Stehberg, J. (2014). Role of the insular cortex in taste familiarity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109:37–45.
- Morón, I. y Gallo, M. (2007). Effect of previous taste experiences on taste neophobia in young-adult and aged rats. *Physiology & Behavior*, 90:308-317.
- Nachman, M. y Jones, D.R. (1974). Learned taste aversions over long delays in rats: The role of learned safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(5):949-956.
- Nachman, M. (1970). Learned taste and temperature aversions due to lithium chloride sickness after temporal delays. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 73(1):22-30.
- Neath, K.N.; Limebeer, C.L.; Parker, L.A. y Reilly, S. (2010). Increased licking for a solution is not necessary for the attenuation of neophobia in rats. *Behavioral Neuroscience*, 124(3):398-404.
- Núñez-Jaramillo, L.; Ramírez-Lugo, L.; Herrera-Morales, W. y Miranda, M.I. (2010). Taste memory formation: Latest advances and challenges. *Behavioural Brain Research*, 207:232-248.
- Paller, K.A. (2009). Memory Consolidation. En L.R. Squire, Editor-in-Chief, *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press. 741-749 p.p.
- Paller, K.A. y Voss, J.L. (2004). Memory reactivation and consolidation during sleep. *Learning and Memory*. 11:664–670.
- Ramos, J. M. J. (2015). Differential contribution of perirhinal cortex and hippocampus to taste neophobia: Effect of neurotoxic lesions. *Behavioural Brain Research*, 284:94–102.
- Reilly, S. y Trifunovic, R. (2001). Lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: Neophobia and conditioned taste aversion. *Brain Research Bulletin*, 55(3):359-366.
- Rescorla, R.A. (1988a). Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 11:329-352.

- Rescorla, R.A. (1988b). Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43(3):151-160.
- Revusky, S. y Parker, L.A. (1976). Aversions to unflavored water and cup drinking produced by delayed sickness. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(4):342-353.
- Revusky, S.H. (1968). Aversion to sucrose produced by contingent x-irradiation: Temporal and dosage parameters. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55(1):17-22.
- Rodríguez-Ortiz, C. J; De la Cruz, V.; Gutiérrez, R. y Bermúdez-Roattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning and Memory*, 12: 533-537.
- Roman, C. y Reilly, S. (2007). Effects of insular cortex lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 26:2627–2632.
- Rozin, P. y Kalat, J.W. (1971). Specific hungers and poison avoidance as adaptive specializations of learning. *Psychological Review*, 78(6):459-486
- Rozin, P. y Ree, P. (1972). Long extension of effective CS-US interval by anesthesia between CS-US. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 80(1):43-48.
- Sakai, N. Y Yamamoto, T. (1997). Conditioned taste aversion and c-fos expression in the rat brainstem after administration of various USs. *NeuroReport*, 8:2215-2220.
- Salamon, E. (2002). Mechanisms of knowledge learning and acquisition. *Medical Science Monitor*, 8(7):RA133-139.
- Sánchez, H. A. (2010). *Persistencia de la memoria a largo plazo en un aprendizaje aversivo al olor débil*. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 35pp.
- Schafe, G.E.; Sollars, S.I. y Bernstein, I.L. (1995). The CS-US interval and taste aversion learning: a brief look. *Behavioral Neuroscience*, 109(4): 799-802.
- Smith, J.C. y Roll, D.L. (1967). Trace conditioning with X-rays as an aversive stimulus. *Psychon. Sci.*, 9(1):11-12.
- Smith, J.C.; Morris, D.D. y Hendricks, J. (1964). Conditioned aversion to saccharin solution with high dose rates of X-rays as the unconditioned stimulus. *Radiation Research*, 22: 510.
- Squire, L.R. (1987). *Memory and brain*. New York, USA: Oxford University Press.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Memory and Learning*, 82:171-177.
- Thompson, R. F. y Kim, J.J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:13438-13444.



- Timberlake, W. (1994). Behavior systems, associationism, and Pavlovian conditioning. *Psychonomic Bulletin & Review*, 1(4):405-420.
- Tovar-Díaz, J. (2011). *Participación de los distintos subtipos de receptores muscarínicos en el aprendizaje aversivo al olor*. Tesis Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 104pp.
- Tovar-Díaz, J.; González-Sánchez, H. y Roldán-Roldán, G. (2011). Association of stimuli at long intervals in conditioned odor aversion. *Physiology and Behavior*, 103:144-147.
- Welzl, H.; D'Adamo, P. y Lipp, H-P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125:205-213.
- Wolf, N.J. (1998). A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology*, 55(1): 59-77.
- Yamamoto, T. (2007). Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chemical Senses*, 32:105-109.
- Yamamoto, T. y Ueji, K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5:1-7.