



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA DE LA VÍA BLA – CI INDUCE MEMORIAS  
AVERSIVAS A LARGO PLAZO

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

### PRESENTA:

ARTURO HERNÁNDEZ MATIAS

### TUTOR PRINCIPAL

DR. DANIEL OSORIO GÓMEZ  
Instituto de Fisiología Celular (IFC)

### MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. FRANCISCO XAVIER SOTRES BAYÓN  
Instituto de Fisiología Celular (IFC)

DR. RUDOLF MARINUS BUIJS  
Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO)

Ciudad de México, Julio 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México, y apoyado por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA-PAPIIT (IA201420 e IA202922).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Universidad, por todo lo que me sigue dando y por el empeño en hacer de mí un mejor ser humano.

A los miembros del Comité Tutor y del jurado por sus valiosos comentarios y aportes al proyecto, así como por el tiempo dedicado a la revisión del mismo.

Al Dr. Daniel Osorio Gómez, por brindarme la oportunidad de continuar mi formación profesional bajo su tutoría y por el tenaz acompañamiento académico en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por todas las facilidades proporcionadas en su laboratorio para la realización de los experimentos y por su contribución al enriquecimiento conceptual del proyecto.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por el enorme apoyo administrativo que permitió mi ingreso, permanencia y egreso de la maestría.

A la M.V.Z. Claudia Verónica Rivera Cerecedo, responsable de la Unidad del Bioterio del IFC, por su apoyo en el alojamiento, mantenimiento y cuidado de los animales empleados en este proyecto.

Al Dr. Abraham Rosas Arellano, técnico académico de la Unidad de Imagenología del IFC, por su gran asistencia técnica y paciencia sin las cuales, la obtención de las imágenes de microscopía no hubiera sido posible.

A mi familia, por creer siempre en mí, por su amor, por su sabiduría, por su fuerza, por todo. Este logro también es de ustedes.

A Karla y Lesly, porque mi vida dentro y fuera del laboratorio es mejor con su amistad.

A Daniela, por seguir tomando mi mano y compartirme de su luz. Por ser mi inspiración y la culpable de tanta felicidad. Por dejarme ver todo lo maravilloso que hay en ella y darle a mi existencia toda la dicha que alguna vez soñé. Te amo y te agradezco siempre.

# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>6</b>
1.1 Aspectos generales del aprendizaje y la memoria .....	6
1.2 Condicionamiento clásico: Su importancia y estudio .....	6
1.3 Aversión condicionada y el papel de los estímulos gustativos .....	8
1.4 Bases neuroanatómicas del Condicionamiento de Aversión al Sabor .....	10
1.5 La Corteza Insular.....	11
1.6 La Amígdala .....	12
1.7 Un diálogo entre estructuras.....	14
1.8 La reactivación y su importancia en la consolidación de la memoria .....	16
<b>II. Justificación.....</b>	<b>19</b>
<b>III. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>21</b>
3.1 Hipótesis.....	21
3.2 Objetivo general .....	21
3.3 Objetivos específicos .....	21
<b>IV. Método.....</b>	<b>21</b>
4.1 Animales .....	21
4.2 Procedimientos quirúrgicos.....	22
4.3 Evaluación conductual .....	23
4.4 Microdiálisis .....	25
4.5 Evaluación electrofisiológica .....	28
4.6 Análisis histológicos .....	30
4.7 Presentación de datos y análisis estadísticos.....	31
<b>V. Resultados.....</b>	<b>34</b>
5.1 Expresión del vector viral en las proyecciones BLA – CI.....	34
5.2 Establecimiento de CAS mediante reactivación amígdalo-cortical .....	36
5.3 Liberación de neurotransmisores en la CI.....	40
5.4 Inducción de LTP dependiente de reactivación.....	43
<b>VI. Discusión .....</b>	<b>53</b>
<b>VII. Conclusiones .....</b>	<b>69</b>
<b>VIII. Referencias .....</b>	<b>70</b>

## Resumen

La amígdala basolateral (BLA) y la corteza insular (CI) son estructuras anatómicamente conectadas que participan en la formación y expresión del Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS). Existe evidencia que sugiere que después de la asociación de un estímulo gustativo novedoso con malestar gástrico, ocurre una modulación neuroquímica de la BLA sobre la CI; dicha modulación es determinante para la consolidación del CAS. Para entender el rol funcional de la interacción específica BLA – CI en el establecimiento de memorias aversivas, utilizamos una aproximación optogenética en la que se estimularon las proyecciones amígdalo-corticales en experimentos conductuales, neuroquímicos y electrofisiológicos. Para ello, ratas Wistar macho fueron infectadas bilateralmente en la BLA con un vector viral que permite la expresión de la proteína fotosensible *channelrhodopsin-2* (ChR2); así mismo, se implantaron férulas con fibra óptica en la CI para posteriormente aplicar pulsos de luz azul (473 nm, 20 Hz, 10 min) en un protocolo de doble estimulación tras el consumo de sacarina, esto con el objetivo de emular la actividad observada durante la adquisición y post-adquisición del CAS. Bajo este protocolo, la evaluación de la memoria a largo plazo mostró una reducción en la preferencia por la sacarina similar a la observada en la aversión condicionada con malestar gástrico. El monitoreo de la liberación de neurotransmisores en la CI indicó que las fotoestimulaciones incrementan los niveles extracelulares de glutamato. Adicionalmente, el registro de los potenciales postsinápticos excitatorios de la vía BLA – CI reveló que la doble estimulación genera potenciación a largo plazo (LTP); este aumento sostenido en la comunicación sináptica es abolido con el bloqueo farmacológico de receptores NMDA antes de la segunda fotoestimulación. De acuerdo con estos datos, para que la consolidación de la memoria y los cambios plásticos puedan ocurrir, se requiere de la activación recurrente de los circuitos neuronales involucrados en el aprendizaje incluso después de la codificación de los estímulos. En el caso de la memoria de aversión gustativa, estas activaciones involucran a la neurotransmisión glutamatérgica desde la BLA hacia la CI.

## **I. Introducción**

### **1.1 Aspectos generales del aprendizaje y la memoria**

El aprendizaje y la memoria son conceptos difíciles de separar pues, en su definición, cada uno entraña implícitamente el significado del otro. Por un lado, el aprendizaje es un cambio duradero en la respuesta conductual como resultado de la experiencia; este cambio es posible mediante la adquisición de información proveniente del entorno (Sara, 2016). En tanto, la memoria puede definirse en términos generales como la retención de la información aprendida, que eventualmente será recuperada en respuesta a demandas o señales del ambiente (Eichenbaum, 2016). Estas concepciones permiten reconocer al aprendizaje y la memoria como dos fenómenos cognitivos que están estrechamente relacionados y que no pueden existir de forma aislada.

La formación de una memoria requiere tiempo para transitar desde una fase denominada de corto plazo, a una de largo plazo que es dependiente de la síntesis de proteínas y que dura horas, días o más (Medina et al., 2008; Squire et al., 2015). Esta transición es lo que se conoce como consolidación, proceso por el cual la información adquirida es gradualmente transformada de un estado lábil a una memoria estable y duradera (McGaugh, 2000).

La concepción predominante de este proceso es que involucra cambios estructurales y moleculares que permiten a las redes neuronales estabilizarse y dar soporte al almacenamiento a largo plazo (Martin et al., 2003; Medina et al., 2008). Así, después del aprendizaje se producen modificaciones en los patrones de actividad neuronal, principalmente en la fuerza de las conexiones sinápticas (Vishnoi et al., 2016).

### **1.2 Condicionamiento clásico: Su importancia y estudio**

Gran parte del aprendizaje se basa en eventos del mundo que no son hechos aislados; muchas de nuestras experiencias consisten más bien en secuencias predecibles y organizadas de estímulos

(Clark, 2004). Estas relaciones causales aumentan la probabilidad de que ciertos eventos ocurran en combinación con otros, por lo que es importante aprender a predecir los acontecimientos en el medio y qué estímulos suelen ocurrir juntos para adaptar nuestra conducta de acuerdo a las demandas del ambiente (Bouton & Moody, 2004).

El condicionamiento clásico es una forma de aprendizaje por el que los organismos establecen este tipo de relaciones, permitiendo tomar ventaja de la secuencia ordenada de sucesos que ocurren en su entorno para posteriormente iniciar una respuesta conductual apropiada en anticipación a lo que está a punto de suceder (Dickinson & Mackintosh, 1978). El hecho de que esta forma de aprendizaje se encuentre altamente conservada en la naturaleza refleja la relevancia que tiene para la supervivencia, y ha despertado un enorme interés de conocer cómo se establecen las asociaciones entre estímulos.

El estudio formal del condicionamiento clásico comienza con el trabajo del fisiólogo ruso Ivan Pavlov, quien al estudiar los procesos digestivos en perros, descubrió que los animales salivaban no sólo en respuesta a la presentación de comida, sino también ante la presencia de la persona encargada de alimentarlos y de otros estímulos que antecedían a la comida. Estos estímulos son denominados estímulos condicionados (EC), pues en principio no son capaces de provocar la salivación por sí solos, sino que dependen del emparejamiento con la presentación de la comida, la cual funciona como un estímulo incondicionado (EI) al no requerir de ningún entrenamiento previo para inducir la salivación. Esta respuesta provocada por los estímulos condicionados y en ausencia de comida se denomina respuesta condicionada, mientras que la respuesta generada normalmente por el alimento se conoce como respuesta incondicionada. Enunciado de una manera más formal, en el condicionamiento clásico, la presentación de un EC que es contingente y contiguo a un EI

tiene como resultado la generación de respuestas condicionadas, originalmente atribuidas al EI, ante la sola presentación del EC (Maren, 2001; Welzl et al., 2001).

A partir de estas observaciones, Pavlov reconoció en el condicionamiento clásico una forma de estudiar los mecanismos que subyacen al aprendizaje asociativo (Gaddum, 1937), y desde entonces, la investigación se ha extendido a una importante diversidad de especies y sistemas de respuesta (Welzl et al., 2001).

### **1.3 Aversión condicionada y el papel de los estímulos gustativos**

Luego del trabajo de Watson y Rayner (1920) en el que se condicionó una respuesta de miedo en un bebé de nueve meses ante la presencia de una rata y objetos inanimados, gran parte de las investigaciones sobre el aprendizaje pavloviano centraron su atención en el condicionamiento de las reacciones emocionales. En este contexto, la aversión aprendida supone un recurso cognitivo de alto valor adaptativo entre diferentes organismos, pues permite identificar estímulos que les son perjudiciales o dañinos para generar patrones de respuesta que les faciliten anticiparse a situaciones de riesgo (Izquierdo et al., 2016). A nivel experimental, los estudios basados en el condicionamiento del miedo emplean principalmente estímulos auditivos, visuales o un conjunto de señales contextuales como ECs, mientras que el EI suele ser una descarga eléctrica, la cual resulta aversiva y produce una respuesta de inmovilización o congelamiento, una conducta de defensa típica en varias especies (Izquierdo et al., 2016; Krabbe et al., 2018).

Además de estos estímulos, la ingestión de alimentos también ofrece oportunidades para el estudio del aprendizaje pavloviano de asociaciones aversivas. En 1955, John García y sus colegas describieron por primera vez lo que en la actualidad se conoce como Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS). En ese reporte, los autores diseñaron un experimento de condicionamiento

en el que algunos grupos de ratas tuvieron acceso a bebederos con sacarina a una baja concentración mientras eran expuestos a una fuente de radiación gamma. Tres días después, al evaluar el consumo de sacarina en ausencia de radiación, los investigadores encontraron que éste disminuyó de manera significativa sólo en aquellos grupos en los que la presentación de sacarina fue emparejada con la exposición a radiación. La evitación de la sacarina duró hasta 30 días, siendo más acentuada con dosis más altas de radiación (García et al., 1955).

De esta manera, en el CAS se aprende una aversión condicionada a un sabor novedoso cuando el consumo de éste es seguido por una consecuencia negativa, como la indigestión o intoxicación. Años más tarde, García junto con su equipo de trabajo continuaron con la caracterización conductual de este protocolo, empleando diferentes estímulos y diseños experimentales (García & Koelling, 1966; Revusky & Garcia, 1970). En la actualidad, un procedimiento típico de CAS consiste en al menos dos fases: adquisición y prueba. En la fase de adquisición, los animales (previamente privados de agua) consumen un estímulo gustativo novedoso (EC) con un sabor distintivo, y después se les administra alguna sustancia capaz de provocar malestar gástrico (EI), siendo el cloruro de litio (LiCl) intraperitoneal uno de los más utilizados. En la sesión de prueba, se presenta nuevamente el EC en ausencia del EI; como resultado de la asociación de estímulos, se espera que los animales hayan adquirido una aversión al EC y disminuyan su consumo (Welzl et al., 2001).

Como protocolo conductual, el CAS posee ciertas características que proporcionan algunas ventajas metodológicas. A diferencia de otras tareas de condicionamiento aversivo, es posible establecer una asociación fuerte entre el EC y el EI en un solo ensayo de adquisición (Rabin & Hunt, 1986). Además, es un condicionamiento de huella, ya que incluso se observa una aversión si el EI es aplicado horas después de la presentación del EC (García et al., 1966; Revusky & Garcia, 1970).

En el CAS, la asociación EC – EI es tan fuerte que la respuesta de aversión puede durar días e incluso semanas (García et al., 1955; Welzl et al., 2001).

#### **1.4 Bases neuroanatómicas del Condicionamiento de Aversión al Sabor**

Al igual que otros estímulos del entorno, la señalización de eventos de relevancia biológica se codifica en el sistema nervioso para guiar la selección de las conductas más adecuadas y preparar una respuesta óptima de anticipación en el futuro. El amplio estudio que se ha realizado en torno al CAS llevó consecuentemente a la caracterización de los correlatos neuroanatómicos que sustentan esta forma de aprendizaje, incluyendo las entradas sensoriales de los estímulos gustativos y viscerales.

La codificación del trazo de memoria gustativa inicia con la transducción química del sabor novedoso en la cavidad oral. Dicha información llega a la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) principalmente a través de los nervios craneales facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X). En seguida, las neuronas del NTS proyectan de forma ipsilateral a la porción posteromedial del núcleo parabraquial (PBN); desde esta estructura, hay proyecciones al hipotálamo lateral, al núcleo del lecho de la estría terminal, a las porciones central y basolateral de la amígdala, así como a la parte parvocelular del núcleo ventral posteromedial del tálamo. Finalmente, este núcleo proyecta a la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004).

En cuanto al procesamiento de la estimulación visceral aversiva, existen al menos dos vías por las que la información alcanza el sistema nervioso central: la información proveniente de aquellos estímulos que irritan directamente el sistema gastrointestinal es procesada por el nervio vago (X), o bien, si los agentes de malestar viajan por el torrente sanguíneo, éstos alcanzan el área postrema, una región en donde la barrera hematoencefálica es especialmente permeable. Ambas vías proyectan a la parte caudal del NTS para luego alcanzar la subdivisión lateral externa del PBN y más

adelante proyectar a la amígdala central y al núcleo paraventricular del hipotálamo; además, desde la porción lateral del PBN, existen proyecciones dirigidas al tálamo ventral posterolateral (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Cabe resaltar que las aferencias gustativas y viscerales proyectan a regiones separadas del NTS, por lo que no convergen en el mismo lugar dentro de esta estructura (Bermúdez-Rattoni, 2004; Scott, 2005). Sin embargo, existen otras regiones cerebrales, como la corteza insular y la amígdala, en donde sí es posible la convergencia e integración de los estímulos condicionado e incondicionado, y por lo tanto también lo es la asociación del gusto y el malestar visceral para crear un trazo de memoria.

### **1.5 La Corteza Insular**

Entre las principales estructuras cerebrales que han sido estudiadas en relación con la formación de la memoria gustativa se encuentra la corteza insular (CI), también conocida como ínsula. En primates, la CI está plegada en el interior del surco lateral de cada hemisferio, oculta entre los lóbulos frontal, parietal y temporal, mientras que en especies como ratones y ratas, queda expuesta en la superficie lateral de los hemisferios, principalmente a lo largo del surco rinal y atravesada por la arteria cerebral media (Bermudez-Rattoni, 2014). Esta estructura comprende tres áreas citoarquitectónicamente diferentes: las subdivisiones granular, disgranular y agranular, que están fuertemente interconectadas a lo largo de los ejes dorso-ventral y rostro-caudal (Gogolla, 2017).

La CI es considerada un centro de integración neuroanatómica, con una gran conectividad a una amplia red de regiones cerebrales con funciones sensoriales, emocionales, motivacionales y cognitivas, como estructuras del sistema límbico y regiones frontales. Además, recibe proyecciones neuromoduladoras por parte de aferencias colinérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas (Gogolla, 2017). La amplia conectividad de la CI le permite involucrarse en una extensa

gama de funciones. Se ha descrito que la estimulación eléctrica directa de la ínsula genera respuestas asociadas a sensaciones somatosensoriales, respuestas viscerales, sensaciones auditivas, gustativas y olfativas, ilusiones vestibulares e incluso reacciones motoras (Mazzola et al., 2019). Se sabe también que hay una organización bifuncional de esta estructura, siendo la ínsula posterior la encargada de procesar información relacionada con la somatosensación (principalmente la percepción al dolor), mientras que la parte anterior es asociada con funciones viscerales (Mazzola et al., 2019; Rolls, 2016).

Aunado a lo anterior, diversas investigaciones le atribuyen a la ínsula una participación que se extiende a aspectos emocionales y procesos cognitivos (Namkung et al., 2017). Siguiendo la línea de la función cognitiva, la especificidad de la ínsula para la formación de la memoria gustativa ha sido ampliamente demostrada, ya que existen experimentos en los que la lesión de la CI antes del ensayo de adquisición del CAS lleva a deficiencias para desarrollar aversión hacia el EC (Kiefer & Braun, 1977). De manera similar, Desgranges y colaboradores en 2009 inactivaron la CI con inyecciones de lidocaína antes de la presentación del EC, observando una disminución en la aversión durante la evaluación de la memoria a largo plazo 48 horas después; un efecto similar fue observado con el bloqueo de la síntesis de proteínas en esta misma estructura (Desgranges et al., 2009). Finalmente, si bien las lesiones en la corteza insular afectan la formación del trazo de memoria gustativa, éstas parecen no alterar la percepción de los estímulos gustativos (Grill & Norgren, 1978).

## **1.6 La Amígdala**

Por su parte, la amígdala es una estructura subcortical que forma parte del sistema límbico y que está compuesta por diversos núcleos que están organizados en dos grandes regiones: la corti-

comedial, que incluye a los núcleos cortical, medial y central, y la basolateral, en la que se encuentran los núcleos lateral, basal y basal accesorio (Zhang et al., 2021). De estas subdivisiones, la porción lateral es la que recibe el mayor número de aferencias, provenientes de sistemas sensoriales, mientras que el resto de los núcleos reciben proyecciones de áreas como el hipocampo, la corteza entorrinal, cortezas de asociación polimodal, corteza prefrontal y bulbo olfatorio. Por su parte, el núcleo central es la región que envía la mayor parte de eferencias, dirigidas principalmente a la sustancia gris periacueductal, hipotálamo y sistemas neuromoduladores (LeDoux, 2007).

La amígdala puede considerarse como un área ‘silente’, pues contiene gran cantidad de células que establecen conexiones con interneuronas inhibitorias y que mantienen la actividad celular espontánea en niveles bajos, evitando que las células disparen potenciales de acción ante estímulos irrelevantes, aunque bajo ciertas condiciones, esta inhibición puede ser interrumpida (Gallagher & Chiba, 1996). Un factor que contribuye a lo anterior es el hecho de que la mayoría de las aferencias que llegan a la amígdala (sobre todo a la región basolateral) involucran vías excitatorias que usan glutamato como neurotransmisor y que hacen sinapsis con otras neuronas excitatorias que transmiten las señales a distintas regiones dentro o fuera de la amígdala. Además, el flujo de información a través de los circuitos de la amígdala se modula por otros sistemas de neurotransmisión que incluyen norepinefrina, dopamina, serotonina y acetilcolina, así como por actividad endocrina de glucocorticoides y estrógeno (LeDoux, 2007; Olucha-Bordonau et al., 2015; Pape & Pare, 2010).

Las lesiones en la amígdala generan alteraciones en el procesamiento emocional, siendo el miedo la manifestación que más se asocia con esta estructura (Davis & Reijmers, 2018). Dada su compleja organización en diferentes núcleos, es de suponer que esté involucrada en un amplio rango de funciones. En este sentido, se ha demostrado incluso la participación de la amígdala en el procesamiento de la recompensa y estados emocionales asociados con conductas de agresión,

maternidad y de ingesta (Fox et al., 2015; Janak & Tye, 2015), por lo que la actividad amigdalina tiene que ver con un amplio rango de respuestas que involucran componentes emocionales independientemente de su valencia.

El funcionamiento de la amígdala también se ha relacionado con la regulación de diversas funciones cognitivas, como atención, percepción y memoria; a través de la codificación del significado emocional de los estímulos externos, como por ejemplo, cuando un estímulo novedoso es presentado en asociación con un evento significativo, como ocurre en el caso del CAS. Como muestra de la relevancia de la amígdala en la formación del CAS, Miranda et al. (2003) encontraron que el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos específicamente en la porción basolateral de la amígdala (BLA) antes de la inyección de cloruro de litio impedía la adquisición del CAS de manera dosis-dependiente. En tanto, Molero-Chamizo et al. (2017) realizaron lesiones electrolíticas en los núcleos central y medial, así como en el complejo basolateral, y después evaluaron sus efectos en el desempeño del condicionamiento de aversión al sabor, observando que únicamente las lesiones realizadas en la BLA disminuyeron la aversión a la sacarina asociada previamente con LiCl. De manera similar, las lesiones electrolíticas en la BLA produjeron una reducción en la latencia para consumir una solución dulce incluso después de haberse presentado minutos antes de la inyección de LiCl (Rollins et al., 2001). Así, estos hallazgos indican que la porción basolateral de la amígdala es importante para el establecimiento de memorias gustativas de aversión.

### **1.7 Un diálogo entre estructuras**

Como ya se mencionó, la participación tanto de la CI como de la BLA es importante para el desarrollo del CAS, lo que sugiere que estas estructuras no actúan de manera aislada. La evidencia indica que existe una comunicación neuroanatómica directa entre ellas, la amígdala central y basolateral proyectan densamente a las regiones granular y disgranular de CI, la cual a su vez envía

eferencias a estos mismos núcleos y a la amígdala lateral (Krettek & Price, 1974; Nasser et al., 2018). Con este antecedente y la evidencia conductual, se propone que la proyección BLA – CI es una vía crucial para el establecimiento de memorias gustativas de carácter aversivo. Los primeros antecedentes que exponen la relevancia de la comunicación amígdala – ínsula para los procesos de aprendizaje provienen de los estudios electrofisiológicos de potenciación a largo plazo realizados por Escobar et al. (1998).

La potenciación a largo plazo (*Long-Term Potentiation*, LTP) se define como un aumento persistente en la comunicación sináptica entre neuronas como consecuencia de una estimulación eléctrica de alta frecuencia (Lüscher & Malenka, 2012). Dada su capacidad para modificar la fuerza de la comunicación sináptica, este fenómeno ha sido considerado como una forma de plasticidad sináptica que se asemeja a los mecanismos celulares y moleculares responsables de diferentes tipos de aprendizaje y memoria (Lynch, 2004).

La gran mayoría de los estudios sobre LTP se han llevado a cabo en circuitos de la formación hipocampal (Baudry et al., 2015). Sin embargo, Escobar et al. (1998) encontraron que al aplicar trenes de estimulación de alta frecuencia en la amígdala basolateral produce un cambio en la eficiencia sináptica en la ínsula; este cambio posee las características típicas de la LTP generada en hipocampo, pues consiste en un aumento sostenido en los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (*field Excitatory Postsynaptic Potentials*, fEPSPs). Dentro de este estudio también se encontró que los receptores glutamatérgicos tipo NMDA son responsables de la inducción de potenciación a largo plazo en la vía BLA – CI, ya que la administración de antagonistas para los receptores NMDA impidió el cambio en las respuestas evocadas de la ínsula tras la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.

Asimismo, se pueden encontrar estudios en los que la inducción de cambios plásticos tiene efectos observables en la conducta. En otro trabajo realizado también por Escobar y Bermúdez-Rattoni (2000), se demostró que la inducción de LTP en la proyección BLA – CI realizada antes de la adquisición del CAS mejora la retención de dicha tarea, ya que el porcentaje de consumo de sacarina asociada a LiCl durante las sesiones de extinción es más bajo que el de animales sin LTP. Estos bajos niveles de consumo se mantienen en las sesiones posteriores de extinción. En cambio, una disminución sostenida en la comunicación sináptica (conocida como Depresión a Largo Plazo o LTD) en esta misma vía lleva a una facilitación de la extinción de la memoria aversiva (Rodríguez-Durán et al., 2017).

### **1.8 La reactivación y su importancia en la consolidación de la memoria**

Uno de los aspectos más relevantes del trazo de memoria es su persistencia a lo largo del tiempo (Viola et al., 2014). La concepción actual de la consolidación de la memoria es que, tras la adquisición, la información no se almacena en una forma definitiva, por lo que un solo evento molecular desencadenado durante el aprendizaje podría no ser suficiente para explicar la persistencia de la memoria en el cerebro, dando pie a la idea de que recurrentes oleadas de actividad son requeridas para la estabilización, transformación y la persistencia de la memoria a largo plazo (Bekinschtein et al., 2007; Tambini & Davachi, 2019).

Estos eventos posteriores a la adquisición han sido agrupados en la literatura bajo el nombre de reactivaciones, fenómenos en los que los patrones de actividad neural expresados durante el aprendizaje son reexpresados en momentos posteriores, no relacionados directamente con la ejecución de la tarea (Wilson & McNaughton, 1994).

La primera evidencia de reactivaciones vino de registros electrofisiológicos en roedores en los que las tasas de disparo de neuronas hipocampales durante la conducta correlacionan con las tasas

de disparo de las mismas neuronas durante el sueño subsecuente (Pavlidis & Winson, 1989; Wilson & McNaughton, 1994).

Manipulaciones optogenéticas han revelado que la reactivación inducida en circuitos específicos activados durante la realización de una tarea (pero sin la presentación de los estímulos que desencadenaron la actividad) es suficiente para generar conductas asociadas al aprendizaje previo (De Sousa et al., 2019). Así mismo, se han observado oleadas de actividad en muchas áreas corticales en humanos (Maquet et al., 2000; Peigneux et al., 2004) y que correlacionan con las expresiones objetivas de la memoria (Favila et al., 2020). Además, el grado o intensidad de la reactivación determina la eficiencia de la recuperación de la información, pues una estimulación considerada moderada en los circuitos activados durante el aprendizaje resulta en una recuperación deficiente de la información, mientras que la estimulación fuerte permite la correcta evocación de la memoria (Detre et al., 2013; Norman et al., 2007). Esto sugiere que la reactivación no se trata de un epifenómeno, sino que se relaciona con el fortalecimiento de las experiencias de aprendizaje.

Los ejemplos anteriores nos hablan de reactivaciones endógenas o bien, emulación de las mismas. Sin embargo, es importante hacer la distinción de otro tipo de reactivación que naturalmente es exógena. En este caso, el proceso de evocación por sí mismo puede reactivar el trazo de memoria y por lo tanto, volverlo lábil y nuevamente sensible a manipulaciones ambientales, farmacológicas, etc. (Agren, 2014; Forcato et al., 2014; Schiller et al., 2009), dando lugar a la reconsolidación o actualización del trazo original.

A partir de la evidencia que indica que los periodos de descanso tras la codificación de información contribuyen a una mejor retención de la memoria (De Sousa et al., 2019), gran parte del estudio de la reactivación endógena se ha enfocado en manipulaciones realizadas en condiciones de reposo o durante el sueño (Schlichting & Preston, 2014; Tambini & Davachi, 2013). Así, se

sugiere que los periodos en los que el cerebro no está procesando explícitamente los estímulos que le llegan del exterior promoverían dinámicas de reactivación y consolidación, en contraste con estados de compromiso externo que pudieran ser benéficos para la adquisición de nueva información (Hasselmo & McGaughy, 2004; Mednick et al., 2011).

Dentro del estudio de las interacciones entre la ínsula y la amígdala así como de los eventos posteriores a la adquisición del CAS, Guzmán-Ramos y colaboradores (2010) realizaron estudios con microdialisis en libre movimiento en la CI para identificar los neurotransmisores liberados en el medio extracelular durante la adquisición del CAS. Inicialmente, observaron incrementos significativos en las concentraciones extracelulares de dopamina tras la presentación novedosa de sacarina (EC), indicando que este neurotransmisor podría estar involucrado en la señalización de la novedad de los estímulos. Así mismo, reportaron un aumento de glutamato tras la presentación de cloruro de litio (EI) pero no así con cloruro de sodio, por lo que la actividad glutamatérgica fue relacionada con la respuesta de malestar visceral.

Un fenómeno interesante, pero desconocido hasta ese momento, fue la identificación de segundas oleadas de liberación tanto de dopamina como de glutamato en la CI, tiempo después de la asociación entre el EC y el EI. Estos incrementos en la concentración extracelular de neurotransmisores, observados en la post-adquisición del CAS, están ausentes en animales no condicionados y son suprimidos en el grupo condicionado si después de la inyección de LiCl se inactiva a la amígdala con la administración de tetrodotoxina, un agente neurotóxico que impide la propagación de los potenciales de acción mediante el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje. A nivel conductual, la inactivación de la amígdala impide que los animales desarrollen aversión a largo plazo hacia el estímulo condicionado (Guzmán-Ramos et al., 2010), sugiriendo una modulación amigdalina sobre la ínsula. Este trabajo respalda, por un lado, los hallazgos de Escobar et al.

(1998) y otros autores (Bermúdez-Rattoni et al., 1997; Fonzo et al., 2021) sobre la comunicación entre la corteza insular y la amígdala; por otro lado, propone la importancia de los eventos posteriores a la adquisición en la CI para el establecimiento de memorias aversivas gustativas. Datos adicionales del mismo grupo de investigación muestran que en la amígdala también ocurren incrementos en la concentración extracelular de neurotransmisores tras el entrenamiento en CAS, con oleadas tardías de liberación de glutamato y norepinefrina. De forma interesante, si se administran antagonistas glutamatérgicos (NMDA) o noradrenérgicos ( $\beta$ -adrenérgicos) en el tiempo correspondiente a estas liberaciones, se observa un desempeño deficiente durante la evaluación a largo plazo del CAS, pues los animales incrementan su consumo de sacarina aun cuando ésta fue previamente asociada con el malestar gástrico del LiCl (Guzmán-Ramos et al., 2012). En resumen, existen eventos discretos que ocurren después del aprendizaje y que son esenciales para la consolidación de la memoria aversiva en amígdala y corteza insular.

## **II. Justificación**

Considerando la relevancia que tiene la aversión aprendida para la supervivencia, es importante seguir avanzando en el conocimiento de los mecanismos que la sustentan. El condicionamiento de aversión al sabor es un paradigma conductual que puede emplearse experimentalmente para el estudio de estos procesos, pues se trata de un protocolo bien establecido desde hace varias décadas y que es muy fácil de implementar, ya que no requiere de más de un ensayo de entrenamiento y genera asociaciones muy robustas entre los estímulos (García & Koelling, 1966; Revusky & García, 1970). Además, la amplia literatura sobre los correlatos neuroanatómicos del CAS permite

identificar regiones o estructuras cerebrales específicas que resultan imprescindibles para el establecimiento de la aversión condicionada (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gogolla, 2017; LeDoux, 2007).

Sin embargo, el estudio del funcionamiento de circuitos neuronales concretos no siempre constituye un objetivo fácil debido a la heterogeneidad y gran número de neuronas y conexiones sinápticas presentes en todas las estructuras cerebrales. En el caso de la ínsula, su complejidad está dada por su papel como centro de integración multimodal: al estar densamente comunicada con otras estructuras, está involucrada en múltiples funciones de tipo sensorial, emocional y cognitivo. En cuanto a la amígdala, como ya se mencionó, se trata de un conjunto de varios núcleos, cada uno de los cuales establece conexiones específicas con otras regiones del cerebro. Si bien ya existe literatura que propone una relación funcional entre la CI y la BLA, las aproximaciones hasta ahora hechas no permiten descartar la influencia de otras estructuras –que también establecen comunicación con la corteza insular y la amígdala basolateral– en la aversión condicionada a sabores, por lo que sigue siendo necesario generar conocimiento que contribuya a una caracterización más puntual y exacta de la vía BLA – CI para determinar cómo su funcionamiento es importante para el establecimiento de memorias como el CAS. Siguiendo esta línea, las reactivaciones endógenas parecen ser fenómenos indispensables para la consolidación de la memoria que si bien, han sido ampliamente identificados en la literatura, se conoce muy poco sobre los mecanismos o procesos que ponen en marcha para estabilizar la información aprendida y mantenerla a largo plazo.

### **III. Hipótesis y objetivos**

#### **3.1 Hipótesis**

La activación y reactivación de las proyecciones amígdalo-corticales tendrán como resultado el establecimiento de una memoria gustativa aversiva a largo plazo, cambios en los patrones de liberación de neurotransmisores, así como modificaciones en la comunicación sináptica en esta vía.

#### **3.2 Objetivo general**

Identificar la participación funcional de los eventos posteriores al aprendizaje que transcurren en la vía amígdala basolateral (BLA) – corteza insular (CI) y que contribuyen al establecimiento de la memoria de aversión gustativa a largo plazo.

#### **3.3 Objetivos específicos**

- Evaluar los efectos conductuales de la activación y reactivación optogenética de la vía BLA – CI tras la presentación de un estímulo gustativo novedoso.
- Monitorear los niveles extracelulares de neurotransmisores en la proyección de interés durante la activación y reactivación.
- Determinar si el fenómeno de reactivación en la proyección BLA – CI conduce a la generación de cambios en la comunicación sináptica.

### **IV. Método**

#### **4.1 Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de entre 300 y 320 gramos al momento de las cirugías, generados en la Unidad del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron alojados de forma

individual en cajas de acrílico con agua y comida *ad libitum* (excepto en los experimentos conductuales que requirieron privación de agua) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas de 06:00 a 18:00 horas) y a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Todos los procedimientos experimentales se desarrollaron durante el periodo de luz y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IFC (CICUAL, protocolo DOG159-20).

#### **4.2 Procedimientos quirúrgicos**

Los animales fueron anestesiados con una dosis combinada de ketamina (70 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y colocados en un aparato estereotáxico. Posteriormente se les aplicó vía subcutánea 0.3 ml de lidocaína con epinefrina 2% v/v (PiSA Agropecuaria, México) en la parte superior de la cabeza y se realizó una incisión en la zona para exponer cráneo. Mediante un atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 2007), se determinaron las coordenadas de ubicación correspondientes a la amígdala basolateral (BLA), las cuales fueron: Antero-Posterior: - 2.8 mm, Medial-Lateral:  $\pm 5$  mm y Dorso-Ventral: - 8.2 mm, tomando Bregma como referencia (Figura 1).

Bajo estas coordenadas, se realizaron perforaciones en el cráneo que permitieran la introducción de microinyectores, esto con el fin de infundir bilateralmente un vector que consiste en un virus adenoasociado (AAV) que contiene la secuencia que codifica a la proteína fotosensible *channel-rhodopsin-2* (ChR2) asociada al promotor de calcio/calmodulina cinasa II (CaMKII). ChR2 es un canal catiónico inespecífico que, en contacto con la luz, permite la entrada de iones a las células y provoca la despolarización de las neuronas. Su asociación con el promotor de CaMKII restringe su expresión a neuronas glutamatérgicas (Cui et al., 2020).

La transfección en el grupo experimental se realizó con un vector viral que permite la expresión de la opsina y de la proteína reportera fluorescente EYFP (rAAV5/CaMKII $\alpha$ -hChR2-EYFP), mientras que a los animales del grupo control se les infectó con un vector que únicamente contiene

la secuencia para la expresión la proteína reportera, sin la opsina pero bajo el mismo promotor (rAAV5/CaMKII $\alpha$ -EYFP). Para los experimentos de electrofisiología, se consideró adicionalmente un grupo de animales en los que se infundió el vector rAAV5/CaMKII $\alpha$ -eArch3.0-EYFP para permitir la expresión de *archaerhodopsin* (Arch), una proteína fotoreceptora que transfiere protones del interior al exterior de las células, promoviendo la hiperpolarización en el caso de las neuronas y en consecuencia, la inhibición de las mismas. En todas las infecciones, el volumen del vector infundido fue de 0.5  $\mu$ l/hemisferio a una velocidad de 0.1  $\mu$ l/min.

Al término de la infusión del virus, se retiraron los inyectores del tejido y, para los experimentos de electrofisiología y microdiálisis, se suturó la herida, se aplicaron antibióticos de uso tópico y se estableció un periodo de 21 días para permitir tanto la recuperación de los animales como la expresión del vector viral.

En el caso de los experimentos conductuales, después de la inoculación en la BLA se implantaron fibras ópticas acopladas a férulas de metal o cerámica en la capa granular de la CI de forma bilateral y de acuerdo con las siguientes coordenadas estereotáxicas: Antero-Posterior: + 1.2 mm, Medial-Lateral:  $\pm$  5.5 mm y Dorso-Ventral: -5 mm (Figura 1). Las férulas se fijaron al cráneo con tornillos quirúrgicos, pegamento y cemento acrílico dental.

### **4.3 Evaluación conductual**

Tres semanas después de los procedimientos quirúrgicos, se privó a los animales de agua por 24 horas y posteriormente tuvieron acceso al líquido a través de dos bebederos que se colocaron en sus cajas hogar durante 15 minutos, dos veces al día. Este esquema de consumo se realizó durante tres días con el fin de tener un registro de la ingestión basal de agua.

En el cuarto día se aplicaron las fotoestimulaciones. Esta sesión se diseñó considerando los tiempos de inyección de cloruro de litio y de reactivación observados durante la adquisición del

CAS, descritos por Guzmán-Ramos et al. (2010, 2012). Se les presentaron a los animales dos bebederos con sacarina 0.1 % m/v (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), permitiéndoles beber durante 15 minutos y registrando su consumo total; al término del periodo de consumo, transcurrieron 15 minutos más para que iniciara la primera estimulación, en la que a través de cables conectados en un extremo a un láser y fijados en el otro extremo a las férulas, se hicieron incidir durante 10 minutos, pulsos de luz azul (longitud de onda = 473 nm) con una potencia mínima de 10 mW y a una frecuencia de 20 Hz, de tal manera que la duración de cada pulso fue de 50 mseg en los que el láser se mantenía encendido 5 mseg y apagado 45 mseg (Gil-Lievana et al., 2020). Al finalizar la primera estimulación, transcurrió un lapso de 30 minutos antes de realizar la segunda estimulación, bajo los mismos parámetros de duración, potencia y frecuencia.

Además de este protocolo de doble estimulación en animales infectados con el vector viral que permite la expresión de *channelrhodopsin* (ChR2 OS (*Optic Stimulation*) + ROS (*Replayed Optic Stimulation*), n = 8), se establecieron otras condiciones experimentales con grupos independientes (Figura 2):

- *No stimulation* (n = 8): Expresión de *channelrhodopsin*, sin estimulaciones.
- *ChR2 OS* (n = 6): Expresión de *channelrhodopsin* y aplicación solamente de la primera estimulación (*Optic Stimulation*) 15 minutos después del consumo de sacarina.
- *ChR2 ROS* (n = 6): Expresión de *channelrhodopsin* y aplicación solamente de la segunda estimulación (*Replayed Optic Stimulation*) 55 minutos después del consumo de sacarina.
- *ChR2 EOS* (n = 6): Expresión de *channelrhodopsin* y una estimulación prolongada con duración equivalente a dos estimulaciones de 10 minutos (*Extended Optic Stimulation*).
- *EYFP OS + ROS* (n = 8): Expresión sólo de EYFP y aplicación de dos estimulaciones (*Optic Stimulation + Replayed Optic Stimulation*).

- *LiCl* (n = 8): Sin infección, únicamente inyección de cloruro de litio 0.15 M 15 minutos después del consumo de sacarina.

En los dos días posteriores a las estimulaciones (Días 5 y 6), los animales tuvieron acceso a agua dos veces al día para restablecer los niveles basales de consumo. La sesión de prueba o evaluación de la memoria a largo plazo ocurrió en el Día 7 y consistió en presentar a los animales un bebedero con sacarina 0.1 % y otro con agua, permitiéndoles beber durante 15 minutos (Figura 1). Para el análisis de los datos obtenidos, se calculó el índice de preferencia por el bebedero de sacarina dividiendo el volumen de consumo de sacarina entre el volumen total de consumo (agua + sacarina).

#### **4.4 Microdiálisis**

Para estos experimentos, se consideraron dos grupos: animales transfectados con la secuencia que codifica a ChR2 (n = 8) o únicamente a la proteína reportera EYFP (n = 7). Se utilizaron sondas de microdiálisis (CMA 12 MD Probe, CMA Microdialysis) con una longitud de membrana de 3 mm y un tamaño de poro de 20 kDa, la cual, previo al inicio de las diálisis, se perfundió con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 19 mM y glucosa 3.3 mM, pH a 7.4) filtrado y a temperatura ambiente; para tal efecto, se empleó una microbomba de infusión (CMA 100, CMA Microdialysis) con una jeringa conectada a una tubería de plástico, la cual a su vez estaba unida a la tubería de entrada de la sonda. Se hizo pasar LCR a través de la tubería a una velocidad de 4 µl/min durante 30 minutos y se verificó la ausencia de burbujas en el dispositivo.

La sonda de microdiálisis se acopló a un adaptador en el que se colocó una férula con fibra óptica, de tal manera que se permitiera realizar la estimulación de las proyecciones BLA – CI y recolectar las muestras de dializado en el mismo sitio simultáneamente.

Usando una velocidad de perfusión de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , se introdujo la sonda de forma unilateral en la corteza insular mientras los animales se encontraban anestesiados y colocados en un aparato estereotáxico, de acuerdo a las siguientes coordenadas: Antero-Posterior: + 1.2 mm, Medial-Lateral:  $\pm$  5.5 mm y Dorso-Ventral: -7.5 mm. Después de la colocación de la sonda en la CI, se estableció un periodo de estabilización de 40 minutos después del cual inició la recolección de muestras provenientes de la tubería de salida de la sonda. Esta recolección se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml con 1  $\mu\text{l}$  de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.27 mM y ácido acético 0.1 M) en su interior para evitar la descomposición de las moléculas en la muestra; la duración de cada toma de muestra o fracción fue de 4 minutos, por lo que en cada tubo se recolectaron 4  $\mu\text{l}$  de dializado. Con el propósito de establecer una línea basal de los niveles extracelulares de neurotransmisores en la ínsula, se tomaron tres fracciones en las que no se realizó ninguna estimulación. Las estimulaciones ocurrieron bajo los mismos tiempos y parámetros que los establecidos en la evaluación conductual (pulsos de luz a 473 nm y 20 Hz por 10 minutos, intervalo entre estimulaciones de 30 minutos). En total se consideraron 16 muestras de dializado, cuya recolección concluyó 5 minutos después de la segunda estimulación (Figura 1). Las muestras se almacenaron en un ultracongelador a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

Las fracciones obtenidas se sometieron a un proceso de derivatización en el que, mediante una reacción química, se modifica la estructura de los compuestos a analizar para hacerlos susceptibles a su detección por fluorescencia inducida por láser. Para ello, se les añadió a las muestras 6  $\mu\text{l}$  de 3-(2-furoil) quinolin-2-carboxaldehído (FQ), 2  $\mu\text{l}$  de cianuro de potasio (KCN) 25 mM y 1  $\mu\text{l}$  de estándar interno (O-metil-L-treonina) 7.5 mM, permitiendo que la mezcla reaccionara en condiciones de oscuridad a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos. FQ es un compuesto fluorogénico que reacciona en presencia de KCN con el grupo amino primario de las moléculas presentes en la muestra mediante

una reacción de sustitución nucleofílica, lo que permite derivatizar tanto catecolaminas como aminoácidos; el estándar interno es un aminoácido que no se encuentra de manera natural en la muestra y que sirve como referencia para corregir la variabilidad en la reacción de derivatización.

El análisis posterior requirió de un equipo de electroforesis capilar (P/ACE MDQ Glycoprotein system, Beckman Coulter) que permite la identificación y cuantificación de analitos al acoplarse a un detector adecuado. Dichos analitos se encuentran suspendidos en una solución electrolítica y, al aplicar voltaje dentro de un capilar de diámetro muy pequeño, éstos se separan en función de sus cargas. Sin embargo, los productos resultantes de la reacción de derivatización son de carácter hidrofóbico, por lo que fue necesario emplear una modalidad de electroforesis capilar denominada cromatografía electrocinética micelar para separar los compuestos de acuerdo a sus características electroforéticas y a través de la formación de micelas.

Se prepararon los reactivos necesarios para la separación e identificación de las muestras en el equipo de electroforesis capilar. Se utilizó buffer de corrida 2X (buffer de boratos 25 mM,  $\beta$ -ciclodextrina 5 mM y dodecilsulfato de sodio (SDS) 35 mM, pH final de 9.6), del cual se tomaron 5 ml y se adicionaron 2 ml de urea 5 M y 1.7 ml de metanol, aforando a un volumen final de 10 ml con agua mili Q. Por cada método de análisis, se requirió de tres viales con buffer, uno con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M y uno con agua mili Q. Estos reactivos se colocaron junto con las muestras –a las que se les agregaron 10  $\mu$ l de aceite mineral– en el equipo; las muestras fueron inyectadas hidrodinámicamente a 0.5 psi por 5 segundos en un capilar de 75  $\mu$ m, después la separación se realizó a 25 kV. De manera conjunta, se empleó un sistema de detección de fluorescencia inducida por un láser de ionización de argón con una longitud de onda de 488 nm para identificar a las moléculas de interés.

La respuesta de detección para las moléculas presentes en cada muestra se registró automáticamente en una gráfica denominada electroferograma, en la que se pueden observar los patrones de migración de dichas moléculas. Los datos obtenidos se hicieron coincidir con electroferogramas previos establecidos para cuatro neurotransmisores: dopamina (DA), glutamato (GLU), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y norepinefrina (NE), y se calculó el área bajo la curva (ABC) de los picos generados en el electroferograma de la muestra, realizando las correcciones con respecto al ABC del estándar interno. Los valores obtenidos se convirtieron a porcentaje de liberación respecto a la línea basal (LB) mediante la siguiente fórmula:  $\% LB = \text{concentración de analito} \times 100 / \text{promedio de las concentraciones de las tres primeras fracciones}$ .

#### **4.5 Evaluación electrofisiológica**

Para este conjunto de experimentos, se requirió de animales intactos ( $n = 8$ ) e infectados con el vector viral para la expresión de *channelrhodopsin* (ChR2,  $n = 37$ ), *archaerhodopsin* (Arch,  $n = 5$ ) o bien, únicamente con la proteína reportera (EYFP,  $n = 7$ ). Se anestesió a las ratas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg, Laboratorios Aranda, México), aplicando dosis adicionales de 10 mg/kg en intervalos de una hora para mantener un nivel adecuado de anestesia a lo largo de todo el procedimiento.

Después del montaje de los animales en un aparato estereotáxico, se realizaron perforaciones a la altura de la capa granular de la corteza insular (coordenadas estereotáxicas: Antero-Posterior: + 1.2 mm; Medial-Lateral:  $\pm 5.5$  mm; Dorso-Ventral:  $- 5.5 \text{ mm} \pm 0.2$ ) para la colocación unilateral de un electrodo monopolar de registro de acero inoxidable y unido a una férula de estimulación, mientras que en la amígdala basolateral (coordenadas estereotáxicas: Antero-Posterior:  $- 2.8$  mm; Medial-Lateral:  $- 5$  mm; Dorso-Ventral:  $- 8.5 \text{ mm} \pm 0.2$ ) se introdujo un electrodo bipolar de estimulación. A partir de la aplicación de una descarga de estimulación eléctrica unilateral en la BLA

con corriente constante (300 – 600  $\mu$ A, pulsos monofásicos de 0.25 mseg de duración), se registraron las respuestas evocadas de la CI en forma de potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs); estas respuestas se amplificaron y almacenaron para su posterior análisis mediante el software BrainWave (DataWave, Broomfield, CO).

Las respuestas de la CI se midieron calculando la pendiente de los fEPSPs registrados de 1 a 3 mseg después de la estimulación en la BLA. Después de un monitoreo de la actividad basal durante 15 minutos para permitir la estabilización de la señal, a los animales intactos se les aplicaron 10 trenes de estimulación eléctrica de alta frecuencia (*High-Frequency Stimulation*, HFS: 100 Hz, intervalo entre trenes de 20 segundos) y al finalizar, se hizo nuevamente el registro de los fEPSPs durante una hora. Se consideró la inclusión de animales con LTP inducida mediante HFS para tener un punto de referencia en cuanto a la cinética e intensidad de la señal que típicamente se observan en registros de este tipo y en esta vía.

En un grupo de animales inoculados con el vector que expresa ChR2 (n = 8), tal como ocurrió en los experimentos anteriores, se realizó el mismo protocolo de doble estimulación optogenética a través de una férula acoplada al electrodo de registro en la CI. Después de la segunda fotoestimulación, las respuestas evocadas de la ínsula se registraron por una hora más. Además, se consideraron grupos adicionales de animales que sólo recibieron una estimulación optogenética, pudiendo ser la correspondiente a la primera activación (n = 8), sólo la segunda activación (n = 6), o una estimulación prolongada de 20 minutos (n = 8). Se incluyó también un grupo de ratas expuestas a la doble fotoestimulación y a las que se les administró ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (APV, 10 mg/ml, Tocris Bioscience, Bristol, UK), un antagonista de receptores NMDA (n = 7); la infusión del fármaco se realizó en la corteza insular 10 minutos antes de la segunda estimulación para bloquear la actividad glutamatérgica.

En el grupo de animales con EYFP ( $n = 7$ ) se aplicaron dos fotoestimulaciones, mientras que en el caso de ratas transfectadas con el vector que expresa Arch ( $n = 5$ ), inicialmente se indujo LTP mediante HFS (10 trenes de 100 Hz, intervalo entre trenes de 20 seg) y se registró la señal potenciada durante 30 minutos; después de este periodo se realizó la inhibición de las proyecciones BLA – CI mediante la estimulación de la opsina con luz amarilla (longitud de onda = 589 nm, potencia mínima = 10 mW) constante por 10 minutos y se registraron los potenciales evocados resultantes por 1 hora (Figura 1). En todos los casos, los datos se graficaron como porcentaje de cambio con respecto a la pendiente de los fEPSPs registrados antes de la estimulación eléctrica u optogenética. Para ello, se obtuvo el promedio de la pendiente de los potenciales durante el registro basal, dicho promedio representa el 100%; el cálculo de los porcentajes a lo largo del registro se obtuvo multiplicando cada valor de la pendiente del fEPSP registrado por 100 y dividiendo el resultado entre el promedio de la pendiente basal.

#### **4.6 Análisis histológicos**

Al término de los experimentos, se aplicó a los animales una sobredosis de pentobarbital sódico para proceder a perfundirlos de forma transcardial con solución salina (NaCl) 0.9% y paraformaldehído 4%. Se extrajeron los cerebros y se fijó el tejido con paraformaldehído durante 24 horas para posteriormente exponerlos a un gradiente de sacarosa (10 %, 20 % y 30 % m/v); la sacarosa se disolvió en buffer de fosfatos salino (PBS). A partir de estos cerebros se recolectaron cortes coronales de la CI y de la BLA con un grosor de 30  $\mu\text{m}$  mediante un criostato (Leica CM520) y se depositaron en pozos con PBS filtrado.

Posteriormente, se sometió a los cortes a tres lavados (5 min c/u) con PBS filtrado, luego se mantuvieron en incubación con 4',6-diamidino-6-fenilindol (DAPI) 300 nM durante 30 minutos en condiciones de oscuridad para teñir los núcleos celulares. Después se realizaron tres lavados

más y los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados a los que se les agregó medio de montaje y un cubreobjetos, el cual se fijó al portaobjetos colocando barniz en los bordes. La señal de fluorescencia emitida por DAPI y por la proteína reportera EYFP tanto en la ínsula como en la amígdala basolateral se observó a través de un microscopio confocal (ZEISS LSM 800).

#### **4.7 Presentación de datos y análisis estadísticos**

Los datos obtenidos en los experimentos conductuales se representaron como promedio del volumen total de consumo (ml) por grupo en las sesiones de estimulación(es) y de memoria a largo plazo; por cada sesión, las comparaciones entre grupos se realizaron con el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Los datos de la última sesión se graficaron también como media del índice de preferencia por grupo y se compararon entre sí utilizando el estadístico ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey. Además, se realizaron comparaciones individuales de cada índice contra un valor de 0.5 mediante la prueba *t* de student para una muestra.

La representación de la concentración extracelular de neurotransmisores durante la estimulación de la vía BLA – CI se llevó a cabo promediando el porcentaje de liberación de cada neurotransmisor (glutamato, GABA, norepinefrina y dopamina) respecto a la liberación basal por grupo. Cada valor graficado es el promedio de tres fracciones recolectadas, de tal manera que la liberación basal y las estimulaciones están representadas, cada una, por un valor en la gráfica; el periodo interestimulación (que abarcó 6 fracciones) comprende dos valores, mientras que en el último valor de cada gráfica se representa una sola fracción. El análisis estadístico de la liberación de cada neurotransmisor se realizó mediante un ANOVA de dos factores (Tiempo y Grupo) con la prueba *post hoc* de Bonferroni para identificar las posibles diferencias entre medias.

En el caso de los experimentos de electrofisiología, el registro de la pendiente de los fEPSPs se obtuvo cada 4 segundos, por lo que se promediaron 5 valores para visualizar el registro completo

en periodos de 20 segundos; se realizó una gráfica por cada grupo experimental. Adicionalmente y para el tratamiento estadístico, en cada grupo se promedió por separado el porcentaje de cambio de la pendiente de los fEPSPs durante los últimos 10 minutos del registro basal, del periodo interestimulación (para el caso de los grupos que recibieron dos estimulaciones o en los que únicamente se consideró el tiempo que transcurre entre ellas) y del registro posterior a la estimulación eléctrica en animales intactos o al último periodo de fotoestimulación en animales infectados. La comparación entre dos periodos de registro dentro del mismo grupo se realizó mediante el estadístico  $t$  para muestras relacionadas, mientras que en grupos con tres periodos de registro se utilizó la prueba ANOVA de un factor y la prueba *post hoc* de Tukey de comparaciones múltiples.

Todos los datos se representaron como media  $\pm$  error estándar (SEM) y se analizaron con el software GraphPad Prism versión 8. En todos los experimentos, un valor de  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

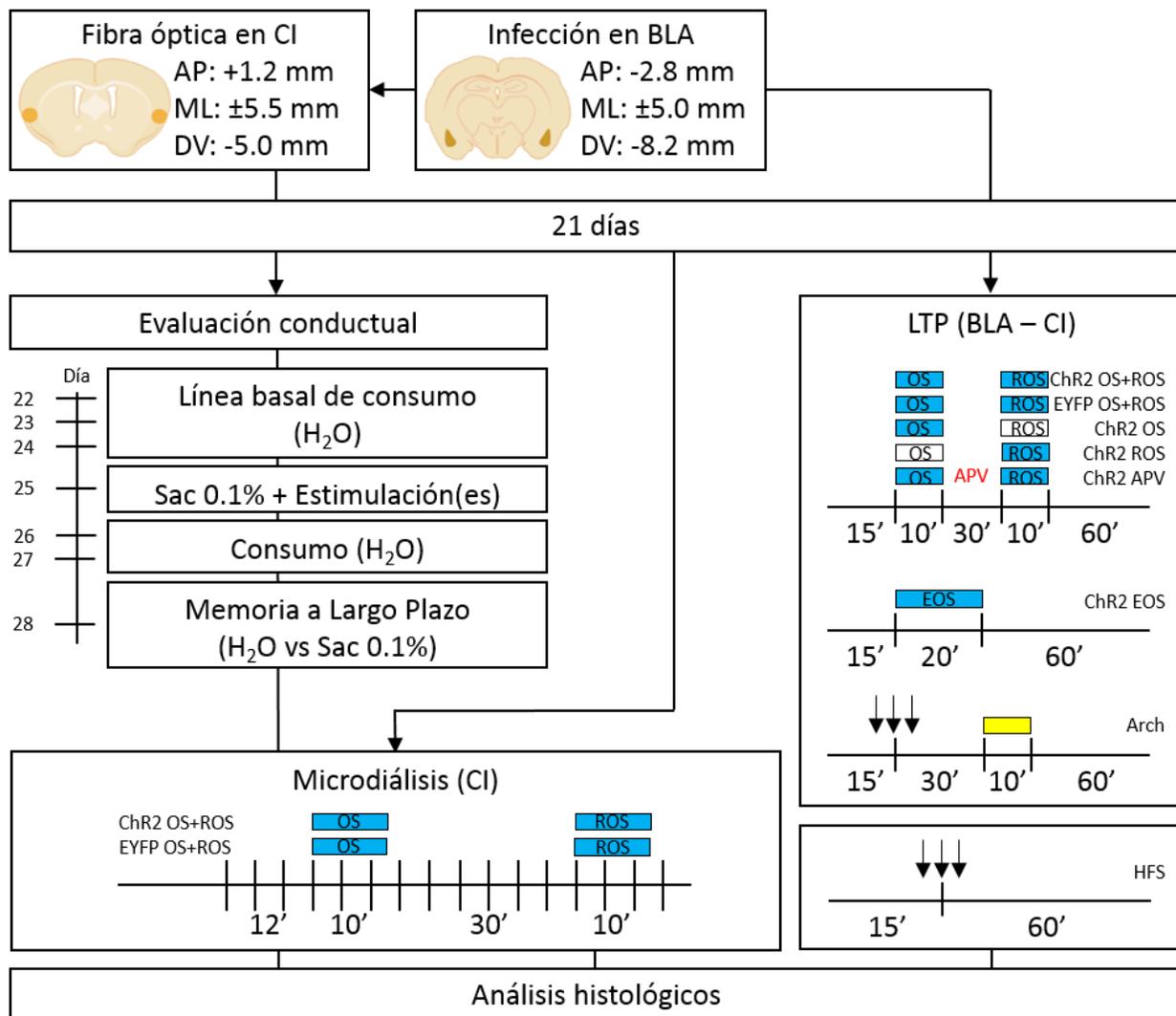


Figura 1. Representación esquemática de los procedimientos experimentales realizados. Las evaluaciones conductuales, microdiálisis y registros electrofisiológicos (LTP) se llevaron a cabo en grupos independientes tres semanas después de los procedimientos quirúrgicos. En todos los casos, las estimulaciones optogenéticas (rectángulos azules y amarillo) se realizaron en las proyecciones de BLA hacia CI. En los experimentos de LTP, las flechas negras indican la aplicación de trenes de estimulación eléctrica de alta frecuencia en BLA. CI = Corteza Insular, BLA = Amígdala Basolateral, AP = Antero-Posterior, ML = Medial-Lateral, DV = Dorso-Ventral, Sac = Sacarina, ChR2 = Channelrhodopsin-2, EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein, OS = Optic Stimulation, ROS = Replayed Optic Stimulation, LTP = Long-Term Potentiation, APV = ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico, EOS = Extended Optic Stimulation, Arch = Archaelhodopsin, HFS = High-Frequency Stimulation.

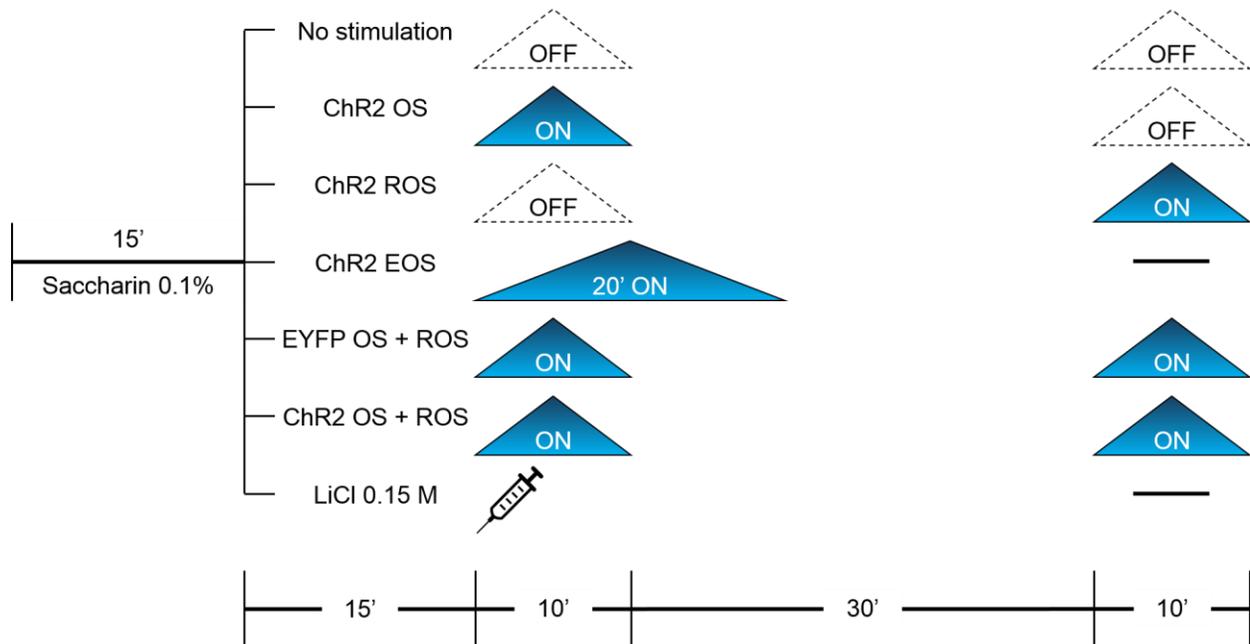


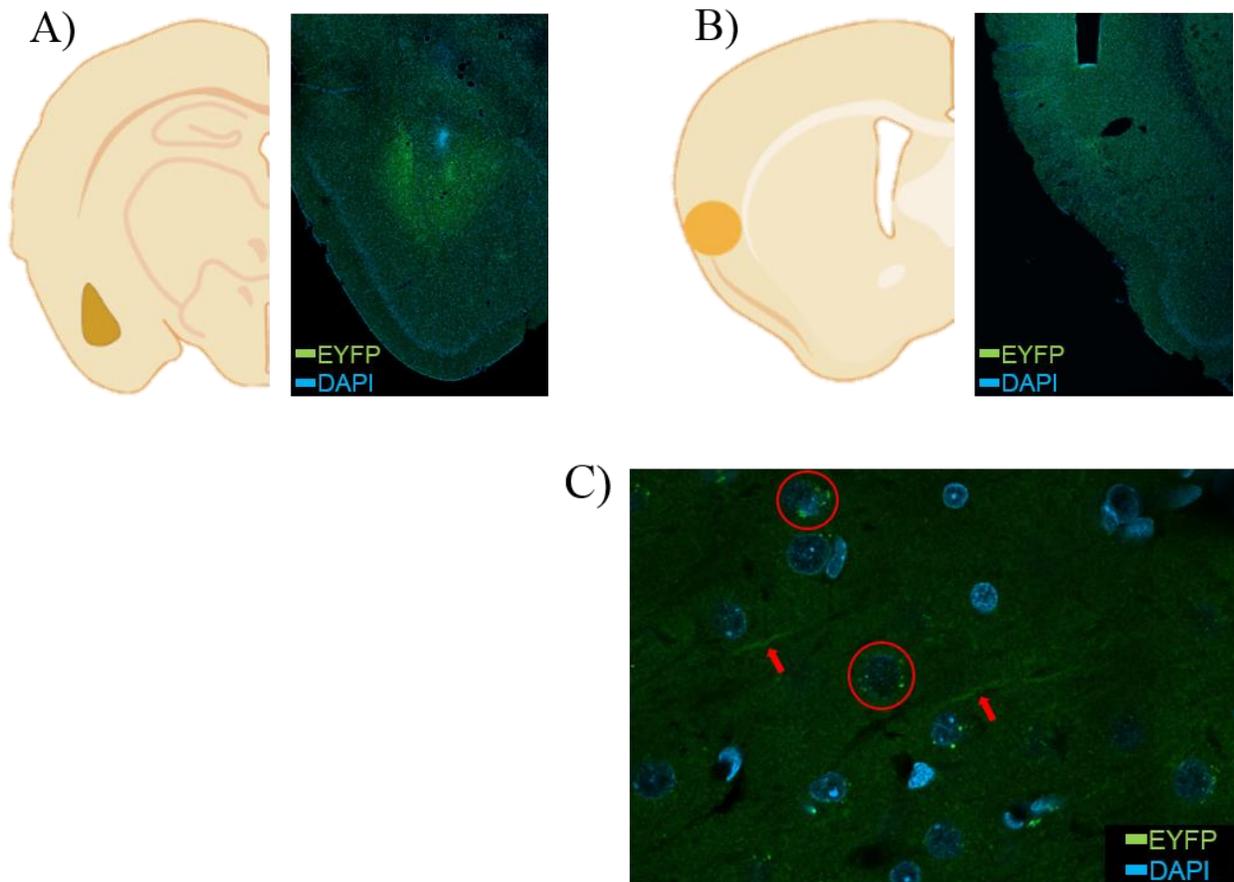
Figura 2. Representación esquemática de los protocolos de estimulación empleados para cada grupo en los experimentos conductuales. Los parámetros de estimulación optogenética y la descripción detallada de todos los grupos pueden consultarse en la sección 4.3 del Método. Los triángulos indican la ocurrencia (azul, bordes continuos) o ausencia (blanco, bordes discontinuos) de fotoestimulaciones en animales conectados al láser, mientras que la jeringa representa la administración i.p. de LiCl en animales intactos. ChR2 = Channelrhodopsin-2, EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein, LiCl = Cloruro de litio, OS = Optic Stimulation, ROS = Replayed Optic Stimulation, EOS = Extended Optic Stimulation, ON = Láser encendido, OFF = Láser apagado.

## V. Resultados

### 5.1 Expresión del vector viral en las proyecciones BLA – CI

En la Figura 3 se observan cortes coronales representativos de las regiones de interés. En la imagen A (lado derecho), la fluorescencia emitida por EYFP (verde) proviene de los somas de la amígdala basolateral, región en la que se inoculó a los animales con los vectores virales. De lado derecho de la imagen B, se aprecia únicamente la lesión provocada por la implantación de la fibra óptica en la corteza insular. Para poder identificar la señal de fluorescencia de las proyecciones en la CI, se realizó una magnificación de B y que se observa en la imagen C. En este caso, la expresión de EYFP se localiza en filamentos y puntos fluorescentes alrededor de los somas, cuyos núcleos

están teñidos con DAPI (azul). Con estos resultados histológicos se comprueba el proceso de infección en la BLA, la existencia de proyecciones provenientes de esta estructura y que establecen contacto con la ínsula, y que las fotoestimulaciones incidieron en dichas proyecciones.



*Figura 3. Imágenes de cortes representativos en los que se muestra la localización del núcleo basolateral de la amígdala (BLA) y la corteza insular (CI). En A (izquierda) se observa la localización de la BLA en un plano coronal (AP: -2.8 mm; ML:  $\pm$ 5.0 mm; DV: -8.2 mm) y la correspondiente expresión en somas de la proteína reportera EYFP (verde) de lado derecho. En B (lado superior derecho) se aprecia el sitio de implantación de la fibra óptica en la CI (AP: +1.2 mm; ML:  $\pm$ 5.5 mm; DV: -5.0 mm). C corresponde a una magnificación 40x de B en la que se distinguen las proyecciones provenientes de la amígdala (flechas) y que establecen conexión con las neuronas de la ínsula (círculos). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein, DAPI = 4',6-diamidino-6-fenilindol.*

## 5.2 Establecimiento de CAS mediante reactivación amígdalo-cortical

En la sesión de estimulación(es) se registró el volumen total de sacarina consumida previamente. Tales volúmenes de consumo se graficaron por grupo, tal como se muestra en la Figura 4. Para determinar la existencia de diferencias en el volumen total de consumo antes de las estimulaciones y que pudieran predisponer a los animales a una mayor o menor ingesta en la prueba de memoria a largo plazo, se realizó la comparación entre grupos mediante la prueba ANOVA de una vía, la cual indicó que el volumen consumido fue el mismo en todos los casos, al no hallarse diferencias estadísticamente significativas ( $F_{(6,41)} = 1.697, p = 0.1461$ ). De este resultado se puede concluir que el consumo previo a la estimulación optogenética no se ve afectado por la condición experimental de los animales.

Para la evaluación de la memoria a largo plazo, se graficó el índice de preferencia hacia el bebedero de sacarina con respecto al bebedero de agua (Figura 5). Se determinó la existencia de una preferencia si el índice de cada grupo era significativamente mayor a 0.5, valor que indica un consumo indistinto de agua y sacarina; en tanto, si el índice es menor a 0.5, éste puede interpretarse como una disminución en la preferencia o una aversión. En este experimento, el grupo de animales no estimulados (No stim  $\bar{x} = 0.7225, t_{(7)} = 2.738, p = 0.0229$ ), estimulados por un periodo de 20 minutos (ChR2 EOS  $\bar{x} = 0.6704, t_{(5)} = 3.636, p = 0.0150$ ), así como el grupo infectado con el vector que permite la expresión EYFP y que recibió dos estimulaciones (EYFP OS+ROS  $\bar{x} = 0.7159, t_{(7)} = 2.680, p = 0.0315$ ), presentaron altos índices de preferencia por la sacarina que fueron estadísticamente mayores que 0.5, de acuerdo con el estadístico  $t$  para una muestra. Los animales que expresaban ChR2 y que recibieron una estimulación mostraron un consumo indistinto de agua y sacarina, tanto en el caso de recibir la primera estimulación (ChR2 OS  $\bar{x} = 0.6360, t_{(5)} = 0.9615, p = 0.3805$ ) como la segunda (ChR2 ROS  $\bar{x} = 0.6489, t_{(5)} = 1.101, p = 0.3326$ ). En cambio, sólo

los animales que expresan la proteína ChR2 y que recibieron la doble estimulación (ChR2 OS+ROS  $\bar{x} = 0.2421$ ,  $t_{(7)} = 5.72$ ,  $p = 0.0007$ ), así como aquellos que fueron inyectados con LiCl 0.15 M después del consumo de sacarina ( $\bar{x} = 0.1580$ ,  $t_{(7)} = 14.14$ ,  $p < 0.0001$ ), disminuyeron significativamente y de forma similar su preferencia. El análisis de la varianza de una vía indicó que las medias de los grupos son diferentes entre sí, al arrojar un valor  $F_{(6,44)} = 9.173$ ,  $p < 0.0001$ . Todas las comparaciones hechas por la prueba de Tukey muestran que la doble estimulación en animales con ChR2 y la inyección de LiCl 0.15 M disminuyen significativamente la preferencia por la sacarina respecto al resto de los grupos.

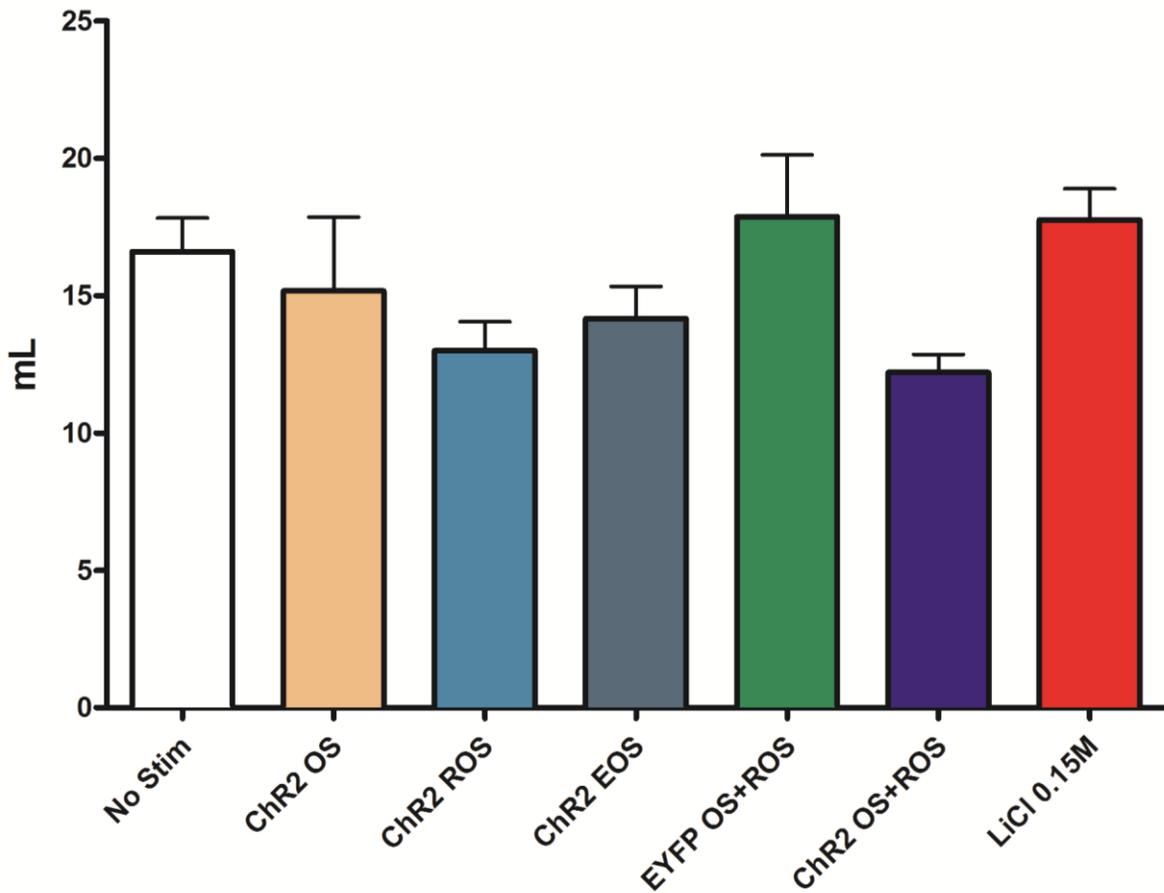


Figura 4. Consumo total en mililitros de sacarina durante la adquisición del CAS, previo al inicio de las estimulaciones. No se detectaron diferencias estadísticas en ninguno de los grupos. Datos representados como media de consumo en mililitros  $\pm$  SEM. No stim = Animales infectados sin estimulación ( $n = 8$ ),

*ChR2 OS = Animales infectados expuestos a la primera estimulación (n = 6), ChR2 ROS = Animales infectados expuestos a la segunda estimulación (n = 6), ChR2 EOS = Animales infectados expuestos a una estimulación prolongada de 20 minutos (n = 6), EYFP OS+ROS = Animales infectados con vector control expuestos a doble estimulación (n = 8), ChR2 OS+ROS = Animales infectados expuestos a doble estimulación (n = 8), LiCl 0.15 M = Animales sin estimulación que recibieron cloruro de litio i.p. después del consumo de sacarina (n = 8).*

Estos datos muestran que es únicamente a partir de la activación y reactivación de la vía BLA – CI que se puede inducir un condicionamiento de aversión gustativa a largo plazo en ausencia de estimulación visceral. Estos segundos eventos de activación parecen ser necesarios para el establecimiento de una memoria, ya que una sola estimulación no es suficiente para generar CAS, pues los índices de preferencia de los grupos con estimulación única no son diferentes del azar, observándose incluso una tendencia al incremento del consumo de sacarina. De forma igualmente importante, se requiere de una separación temporal entre activaciones, ya que si se realiza una estimulación de mayor duración (20 minutos), equivalente a las dos estimulaciones juntas, tampoco es posible llegar a la inducción de CAS. Además, se descarta que haya un efecto asociado al paso de luz, pues animales infectados con el vector viral que contiene la secuencia de expresión de EYFP sin la opsina y que también recibieron doble estimulación, mostraron altos índices de preferencia hacia la sacarina.

En la Figura 6 se muestra el volumen total de consumo (agua + sacarina) para cada grupo en la sesión posterior a las estimulaciones. Tal como ocurrió con el consumo inicial de sacarina (Figura 4), la prueba ANOVA no señaló diferencias entre grupos ( $F_{(6,41)} = 1.589, p = 0.175$ ), descartando la posibilidad de que el bajo índice de preferencia por la sacarina, observado en el grupo de animales que expresan la opsina y que recibieron dos estimulaciones (ChR2 OS+ROS, Figura 5), se deba a una disminución generalizada del consumo.

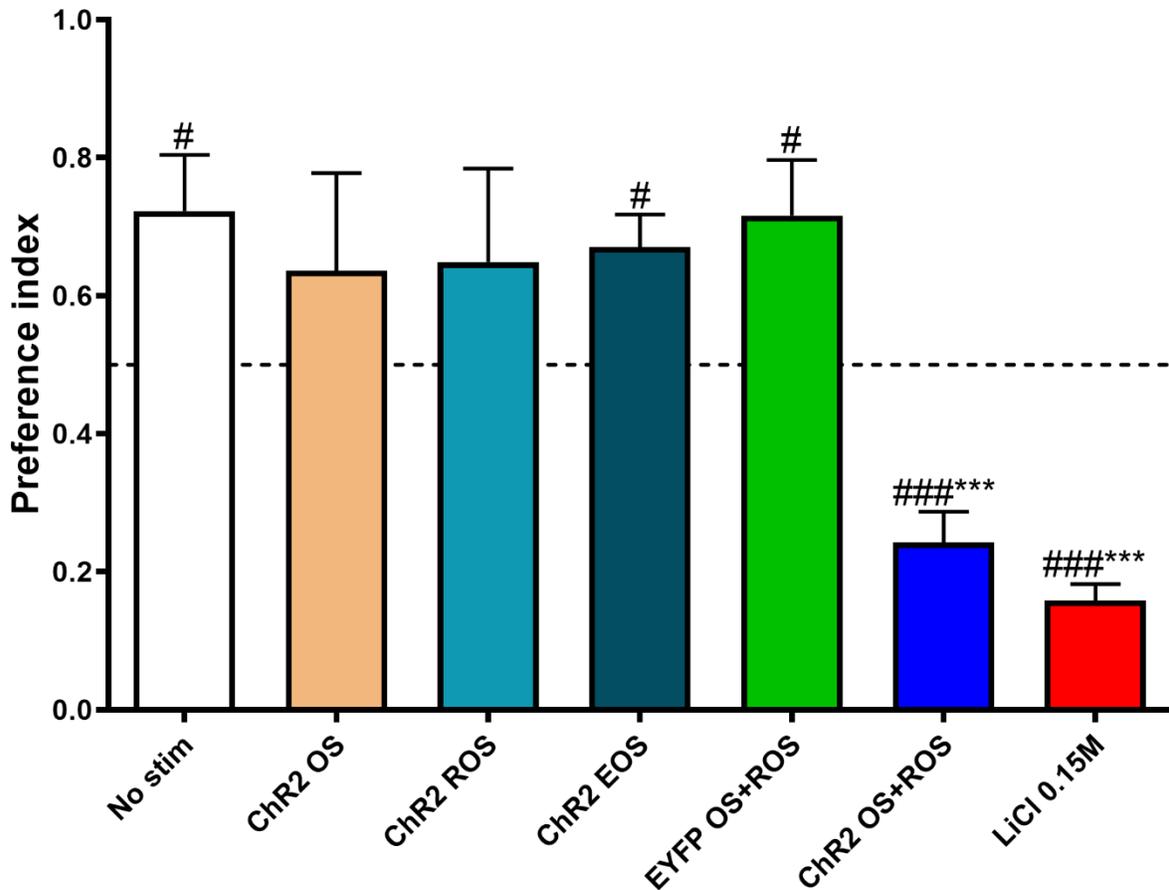


Figura 5. Evaluación a largo plazo de la preferencia por sacarina 72 horas después de la(s) estimulación(es). Se observa que únicamente la doble estimulación de las proyecciones BLA – CI que expresan ChR2 (grupo ChR2 OS+ROS) genera una disminución significativa de la preferencia de forma similar a lo observado con la administración intraperitoneal de LiCl tras el consumo de sacarina. Datos representados como media del índice de preferencia  $\pm$  SEM. No stim = Animales infectados sin estimulación ( $n = 8$ ), Chr2 OS = Animales infectados expuestos a la primera estimulación ( $n = 6$ ), Chr2 ROS = Animales infectados expuestos solamente a la segunda estimulación ( $n = 6$ ), Chr2 EOS = Animales infectados expuestos a una estimulación prolongada de 20 min ( $n = 6$ ), EYFP OS+ROS = Animales infectados con vector control expuestos a doble estimulación ( $n = 8$ ), Chr2 OS+ROS = Animales infectados y expuestos a doble estimulación ( $n = 8$ ), LiCl 0.15 M = Animales sin estimulación que recibieron cloruro de litio i.p. después del consumo de sacarina ( $n = 8$ ).

#  $p < 0.05$  respecto a 0.5

###  $p < 0.001$  respecto a 0.5

\*\*\*  $p < 0.001$  respecto al grupo No Stim

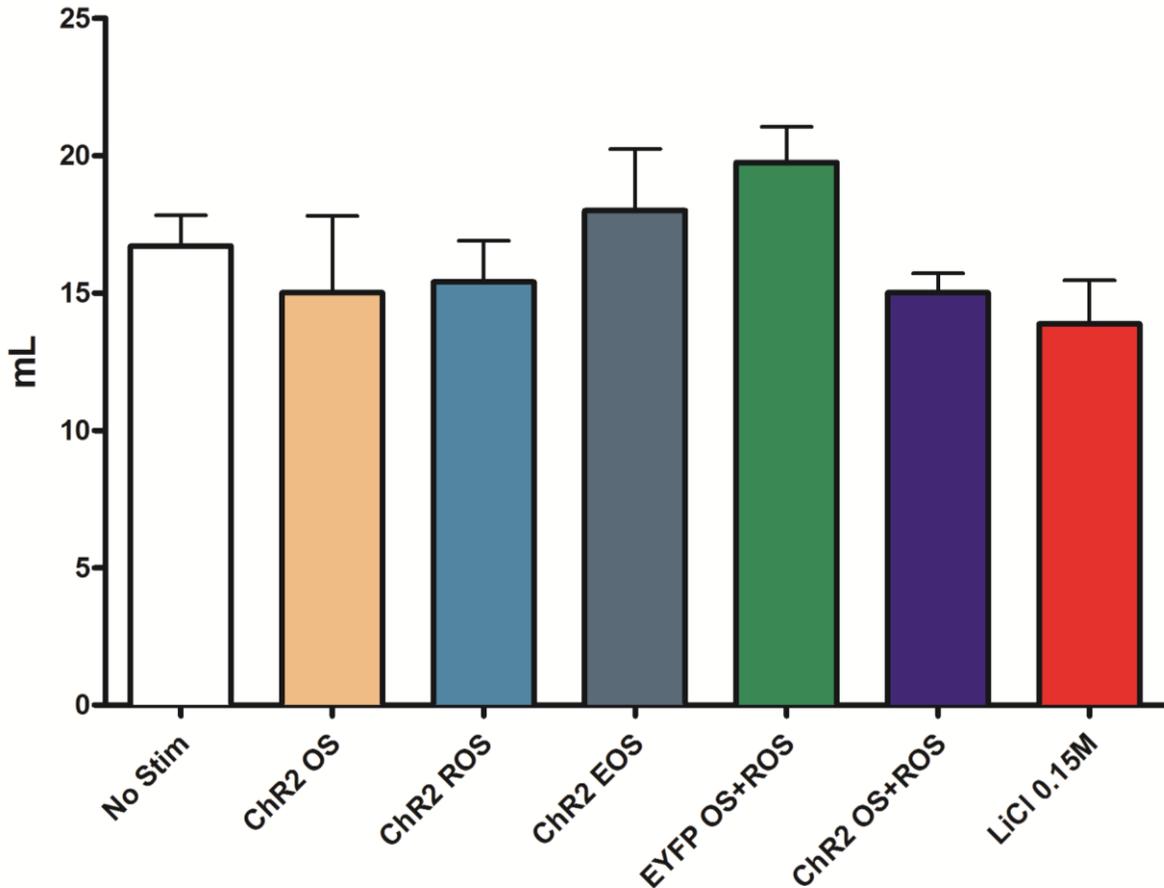


Figura 6. Consumo total de agua y sacarina durante la evaluación a largo plazo (72 horas después de la(s) estimulación(es)). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas en ninguno de los grupos. Datos representados como media de consumo en mililitros  $\pm$  SEM. No stim = Animales infectados sin estimulación ( $n = 8$ ), ChR2 OS = Animales infectados expuestos a la primera estimulación ( $n = 6$ ), ChR2 ROS = Animales infectados expuestos a la segunda estimulación ( $n = 6$ ), ChR2 EOS = Animales infectados expuestos a una estimulación prolongada ( $n = 6$ ), EYFP OS+ROS = Animales infectados con vector control expuestos a doble estimulación ( $n = 8$ ), ChR2 OS+ROS = Animales infectados y expuestos a doble estimulación ( $n = 8$ ), LiCl 0.15 M = Animales sin estimulación que recibieron cloruro de litio i.p. después del consumo de sacarina ( $n = 8$ ).

### 5.3 Liberación de neurotransmisores en la CI

A partir de los resultados conductuales derivados del hallazgo de que dos estimulaciones concomitantes al consumo de sacarina provocaron una disminución en la ingesta del estímulo gustativo, se diseñó el siguiente objetivo, que consistió en determinar qué mecanismo, desencadenado a partir de la doble activación de la vía, podría explicar la disminución en el consumo de sacarina, que es vista como indicador de inducción de CAS. Para este propósito, se determinaron los niveles

extracelulares de distintos neurotransmisores en la corteza insular durante la estimulación optogenética de las proyecciones provenientes de la amígdala basolateral.

Las cinéticas de liberación de GABA, glutamato, norepinefrina y dopamina antes, durante y después de las estimulaciones se muestran en la Figura 7. En el caso de GABA, norepinefrina y dopamina, el estadístico ANOVA de dos factores no identificó diferencias en las medias atribuibles al grupo (ChR2 vs EYFP; GABA:  $F_{(5,69)} = 0.1765$ ,  $p = 0.6757$ ; NE:  $F_{(5,69)} = 0.1817$ ,  $p = 0.6713$ ; DA:  $F_{(5,69)} = 0.6052$ ,  $p = 0.4396$ ), el tiempo (láser ON vs láser OFF; GABA:  $F_{(5,69)} = 0.6849$ ,  $p = 0.67364$ ; NE:  $F_{(5,69)} = 0.2963$ ,  $p = 0.9133$ ; DA:  $F_{(5,69)} = 0.9187$ ,  $p = 0.475$ ) o la interacción de éstos (GABA:  $F_{(5,69)} = 0.8517$ ,  $p = 0.5181$ ; NE:  $F_{(5,69)} = 0.4209$ ,  $p = 0.8326$ ; DA:  $F_{(5,69)} = 0.0439$ ,  $p = 0.9988$ ). Si bien, no existen diferencias consideradas estadísticamente significativas, se observa una tendencia al aumento en los niveles extracelulares de GABA (ChR2  $\bar{x} = 179.094$  % vs EYFP  $\bar{x} = 91.0692$  %) y norepinefrina ( $\bar{x} = 167.689$  % vs EYFP  $\bar{x} = 81.3413$  %) en el grupo ChR2 ( $n = 8$ ) únicamente durante la segunda estimulación (Figuras 7A y 7B).

En cambio, el mismo tratamiento estadístico mostró diferencias en las medias de porcentaje de liberación de glutamato (Figura 7C), siendo el factor Tiempo ( $F_{(5,145)} = 4.627$ ) y la interacción entre factores Tiempo y Grupo ( $F_{(5,145)} = 2.893$ ) las fuentes de la variación. La prueba *post hoc* de Bonferroni identificó las diferencias durante ambas estimulaciones (Estimulación 1  $p = 0.0192$ , Estimulación 2  $p = 0.0071$ ), siendo el grupo ChR2 ( $n = 8$ ) en donde se observa un incremento en la liberación del neurotransmisor respecto a animales inoculados con el vector que permite únicamente la expresión de la proteína reportera ( $n = 7$ ) en la primera (ChR2  $\bar{x} = 174.74$  %; EYFP  $\bar{x} = 86.23$  %) y en la segunda estimulación (ChR2  $\bar{x} = 177.95$  %; EYFP  $\bar{x} = 72.13$  %).

Estos resultados confirman que la expresión de ChR2 y la fotoestimulación de proyecciones que provienen de neuronas glutamatérgicas en la BLA promueven la liberación de glutamato en la

CI. Además, los datos apuntan a que es a partir de la segunda estimulación que ocurren cambios adicionales en la neurotransmisión, relacionados con el aumento en los niveles extracelulares de GABA y norepinefrina, pero no atribuidos directamente a las proyecciones estimuladas, ya que el vector viral utilizado sólo puede expresarse en neuronas glutamatérgicas. Teniendo en cuenta lo anterior, se sugiere que la reactivación induce un patrón de liberación de neurotransmisores diferente al primer evento de activación, presumiblemente a partir del reclutamiento de otras vías o estructuras. Este podría ser al menos uno de los mecanismos a través de los cuales la reactivación contribuye al establecimiento de memorias gustativas aversivas.

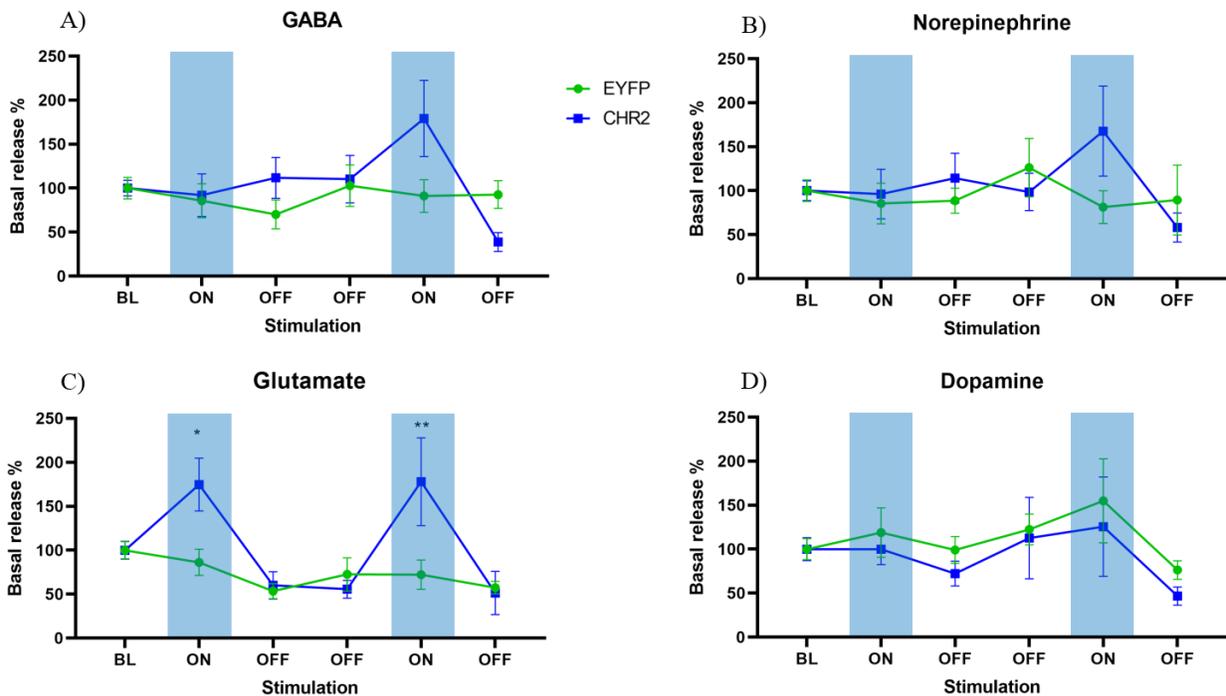


Figura 7. Porcentajes de liberación extracelular de diferentes neurotransmisores en la corteza insular. Al fotoestimar las proyecciones provenientes de la BLA (barras azules) se observa un incremento en los niveles de glutamato (C) en los animales del grupo Chr2 ( $n = 8$ ) respecto al grupo EYFP ( $n = 7$ ), sin apreciarse cambios en la liberación de GABA (A), norepinefrina (B) y dopamina (D). Datos representados como media del porcentaje de liberación respecto a BL (100%)  $\pm$  SEM. BL = Línea basal, ON = Láser encendido, OFF = Láser apagado, GABA = Ácido  $\gamma$ -amino butírico.

\*  $p < 0.05$  respecto al grupo EYFP

\*\*  $p < 0.01$  respecto al grupo EYFP

## 5.4 Inducción de LTP dependiente de reactivación

Inicialmente, se realizaron registros electrofisiológicos en animales intactos ( $n = 8$ ) siguiendo las especificaciones para la inducción de LTP en la vía amígdala – ínsula con estimulación eléctrica de alta frecuencia (HFS), lo cual serviría para tener un marco de referencia y punto de comparación sobre la cinética de la señal basal y la potenciada. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8. Se puede observar que después de la estimulación eléctrica, hay un incremento de alrededor de 50% en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo y que se mantiene a lo largo del tiempo, presentando las características de una LTP. El análisis estadístico de los 10 últimos minutos del registro basal y del registro posterior a la estimulación eléctrica mediante la prueba  $t$  de student para muestras relacionadas indica que hay un aumento significativo en la pendiente de los fEPSPs después de la aplicación de HFS (BASELINE  $\bar{x} = 100.684\%$ ; POST  $\bar{x} = 152.605\%$ ;  $t_{(14)} = 7.231$ ,  $p < 0.0001$ ).

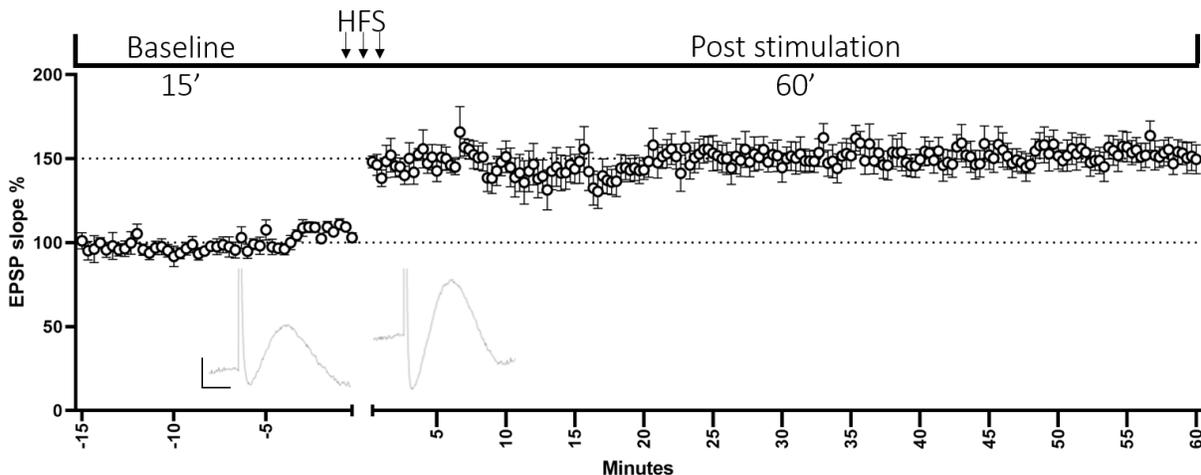


Figura 8. Inducción de Potenciación a Largo Plazo (LTP) en la vía BLA – CI mediante estimulación eléctrica de alta frecuencia en animales intactos ( $n = 8$ ). Después de dicha estimulación se observa un incremento en la pendiente de los potenciales de campo respecto a los niveles basales. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential, HFS = High-Frequency Stimulation. Escala: 5 msec, 0.2 mV.

Al realizar los registros en animales infectados y siguiendo los protocolos de estimulación optogenética empleados en los experimentos conductuales, se obtuvieron los siguientes resultados. En animales que expresan únicamente la proteína reportera EYFP ( $n = 7$ ), la doble fotoestimulación de la proyección BLA – CI no genera cambios en la pendiente de los potenciales de campo, tal como lo indica el estadístico ANOVA de un factor ( $F_{(2, 10)} = 0.8453, p = 0.458$ ); la señal durante el periodo interestimulación y el registro posterior a la segunda estimulación optogenética se mantiene en valores cercanos al 100% como en el registro basal (Figura 9). Sin embargo, es importante mencionar que durante el periodo que transcurre entre las dos fotoestimulaciones, se aprecia una mayor variabilidad de la señal registrada; en términos estadísticos, los resultados de la prueba *post hoc* de Tukey muestran que los valores del registro basal ( $\bar{X} = 101.413 \%$ ) y los del periodo interestimulación ( $\bar{X} = 108.71 \%$ ) no son diferentes entre sí ( $q = 1.588, p > 0.05$ ) ni respecto a los valores del registro hecho después de la doble estimulación (POST  $\bar{X} = 101.369 \%$ ; BL vs POST  $q = 0.009676, p > 0.05$ ; INTER vs POST  $q = 1.597, p > 0.05$ ).

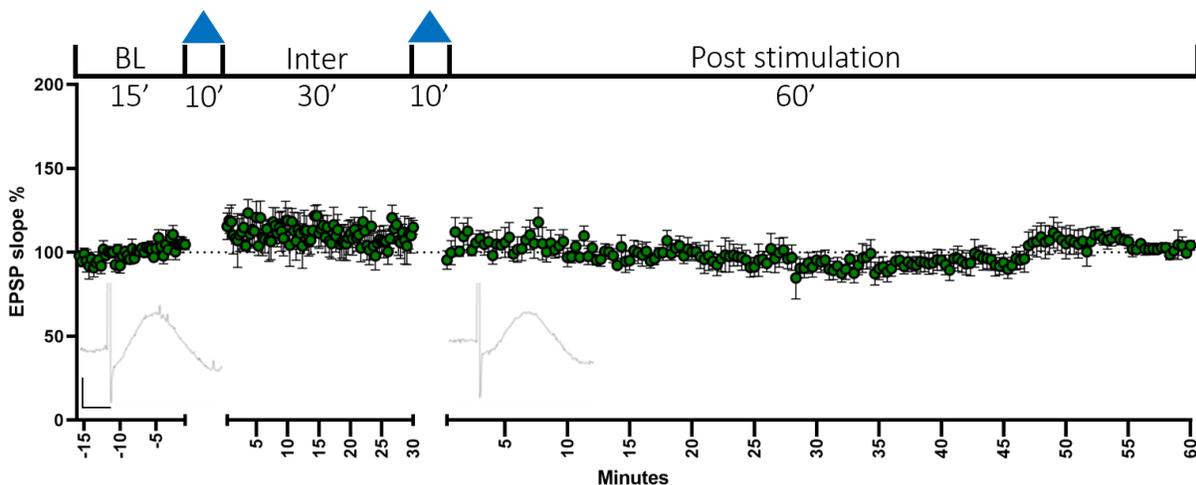


Figura 9. La doble estimulación optogenética de la vía BLA – CI en animales que expresan EYFP ( $n = 7$ ) no genera LTP. Las fotoestimulaciones se encuentran señaladas por los triángulos azules en el esquema superior. Después de la segunda estimulación no se observan cambios en la pendiente de los potenciales de campo respecto a niveles basales. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la

pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential, BL = Baseline, EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein. Escala: 5 mseg, 0.2 mV.

En contraparte, después de aplicar dos estimulaciones optogénéticas en animales que expresan Chr2 ( $n = 8$ , Figura 10), se observa un incremento en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios que además se mantiene a lo largo del tiempo, tal como ocurre con la LTP inducida mediante HFS en la misma vía (Figura 8). De acuerdo con el análisis de la varianza ( $F_{(2, 20)} = 9.12$ ,  $p = 0.0015$ ), existen diferencias entre las medias de los periodos de registro. Específicamente, la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey muestra que las diferencias se encuentran al comparar tanto la señal basal (BL  $\bar{x} = 100.791$  %) como la registrada entre estimulaciones (INTER  $\bar{x} = 107.045$  %) con el registro posterior a la segunda fotoestimulación (POST  $\bar{x} = 142.845$  %; BL vs POST  $q = 5.632$ ,  $p < 0.01$ ; INTER vs POST  $q = 4.631$ ,  $p < 0.05$ ). En cambio, no existen diferencias entre el registro basal y el periodo interestimulación ( $q = 0.8092$ ,  $p > 0.05$ ). En este último, existe una mayor variabilidad de la señal respecto a lo observado en el grupo de animales que expresan EYFP (Figura 9).

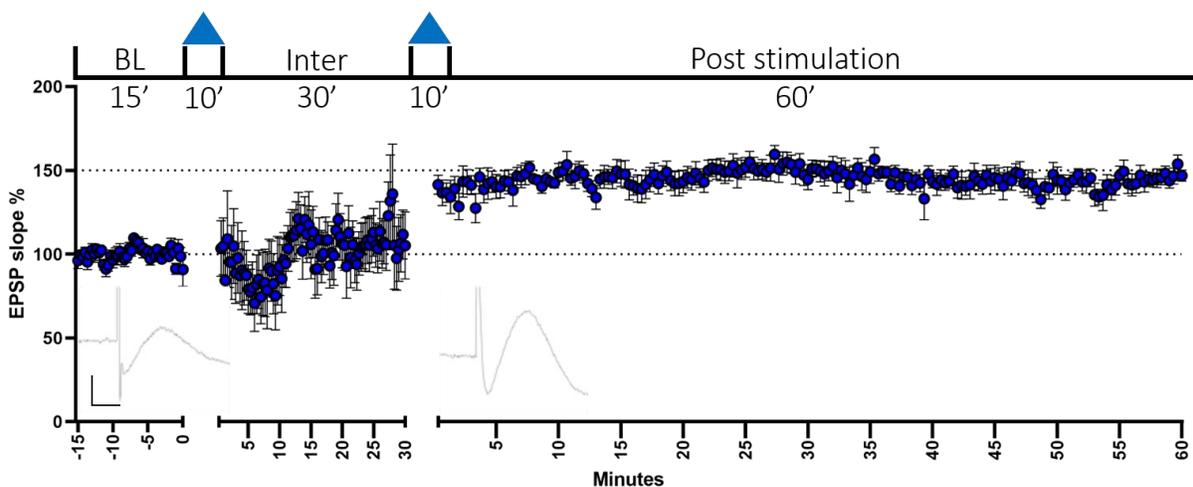


Figura 10. La doble estimulación optogénica de la vía BLA – CI en animales que expresan la proteína Chr2 ( $n = 8$ ) resulta en la inducción de LTP. Las fotoestimulaciones se encuentran señaladas por los

*triángulos azules en el esquema superior. Después de la segunda estimulación, se aprecia un incremento en la pendiente de los potenciales de campo de alrededor de 50%. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential, BL = Baseline. Escala: 5 mseg, 0.2 mV.*

La relevancia de la doble fotoestimulación, y por tanto, de la reactivación en la generación de cambios en la comunicación sináptica de la vía, se aprecia cuando se hace incidir luz en un solo momento en las proyecciones de la BLA que llegan a la CI. En un grupo de animales infectados con el vector que lleva a la expresión de ChR2 ( $n = 8$ ), se realizó una estimulación optogénica después de adquirir la línea basal y se mantuvo el registro de la señal considerando el periodo interestimulación de 30 minutos, el correspondiente a la segunda fotoestimulación (sin la aplicación de los pulsos de luz), y el registro post-estimulación de 1 hora (Figura 11A). En un grupo independiente de ratas inoculadas con el mismo vector viral ( $n = 6$ ), se mantuvieron estos tiempos de registro con la diferencia de que la fotoestimulación no ocurrió tras la línea basal sino en el tiempo en el que se realizaría la segunda aplicación de luz en los experimentos de doble estimulación optogénica (Figura 11B), de tal manera que los registros en ambos grupos tuvieron la misma duración, recibiendo en cada caso una sola fotoestimulación en momentos diferentes.

Los resultados muestran que, en ambos grupos, activar sólo una vez a la proyección BLA – CI no es suficiente para inducir cambios en la eficiencia sináptica. De acuerdo a lo que se aprecia en las Figuras 11A y 11B, ni la primera ni la segunda fotoestimulación por sí solas causan cambios en la pendiente de los potenciales de campo respecto a los niveles basales. El tratamiento estadístico de los datos a través de la prueba ANOVA no identificó diferencias entre medias, de acuerdo a los valores  $F$  y  $p$  obtenidos tanto en el grupo con la primera estimulación optogénica ( $F_{(2, 20)} = 2.515$ ,  $p = 0.1061$ ) como en el grupo que recibió solamente la segunda estimulación ( $F_{(2, 15)} = 0.04617$ ,  $p = 0.955$ ).

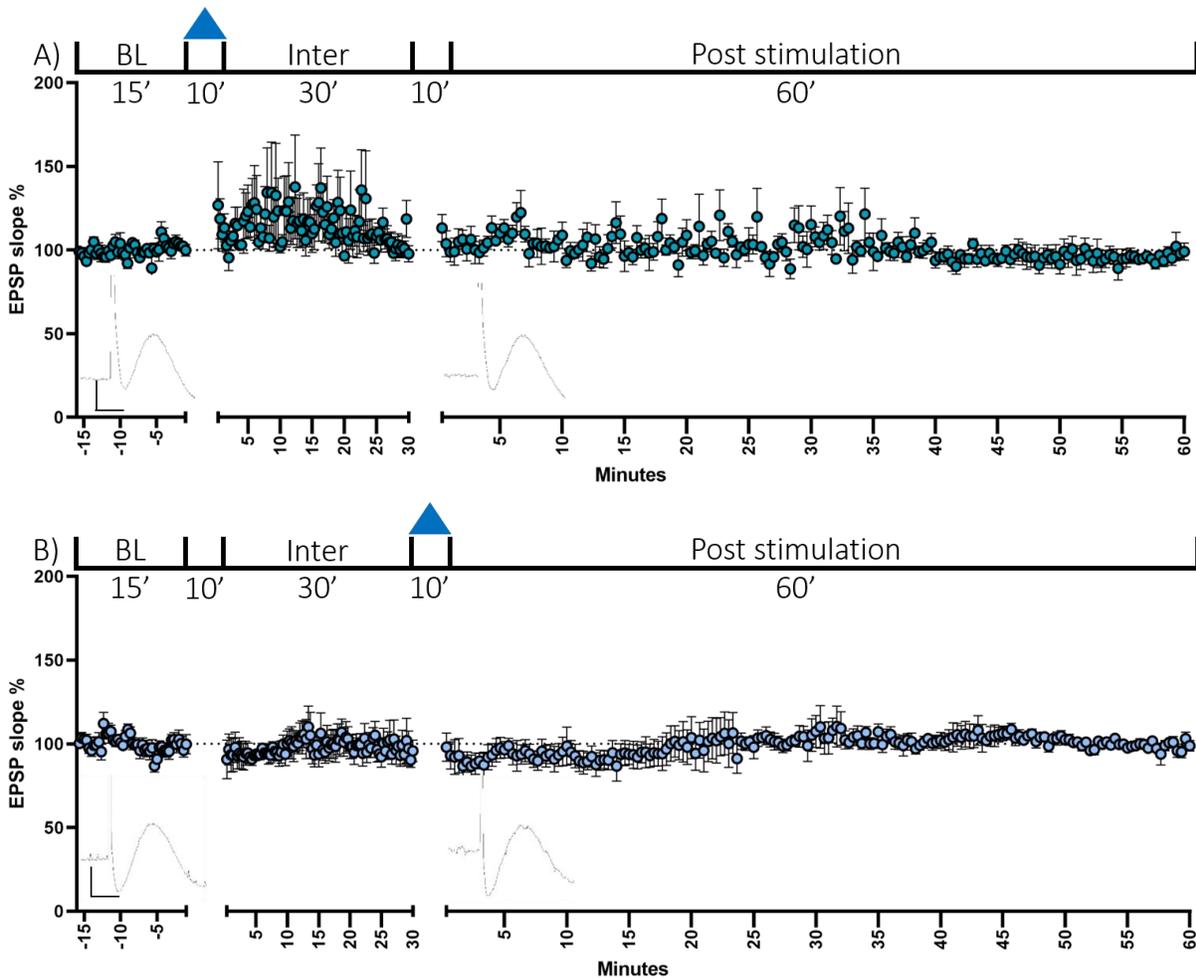


Figura 11. La estimulación optogenética única de la vía BLA – CI no es suficiente para la inducción de LTP. En A ( $n = 8$ ) la fotoestimulación ocurrió después del registro basal de 15 minutos, mientras que en B ( $n = 6$ ) la aplicación de luz se realizó en el tiempo correspondiente a la segunda fotoestimulación. En ambos casos, la estimulación se encuentra señalada por el triángulo azul en el esquema superior de cada gráfica. El registro post-estimulación no muestra cambios en la señal respecto a valores basales. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential, BL = Baseline. Escala: 5 mseg, 0.2 mV.

Como parte de los experimentos de inducción de CAS por estimulación optogenética, se comprobó que entre el momento de la activación y el de la reactivación debe transcurrir tiempo para que ocurran los cambios conductuales (Figura 5), pues la realización de dos estimulaciones consecutivas no disminuye la preferencia por el estímulo gustativo. Para averiguar si la temporalidad de la reactivación también es importante para generar cambios en la comunicación sináptica, se

condujo el registro de los fEPSPs a partir de la fotoestimulación de la vía por 20 minutos. Lo que se observa en la Figura 12 es que esta manipulación no altera la pendiente de los potenciales, ya que a lo largo de todo el registro la señal se mantiene en torno al 100% del nivel basal. El análisis de los 10 últimos minutos del registro basal ( $\bar{x} = 99.96\%$ ) y del registro post-estimulación ( $\bar{x} = 96.16\%$ ) mediante el estadístico  $t$  no halló diferencias significativas ( $t_{(7)} = 0.8541$ ,  $p = 0.4213$ ).

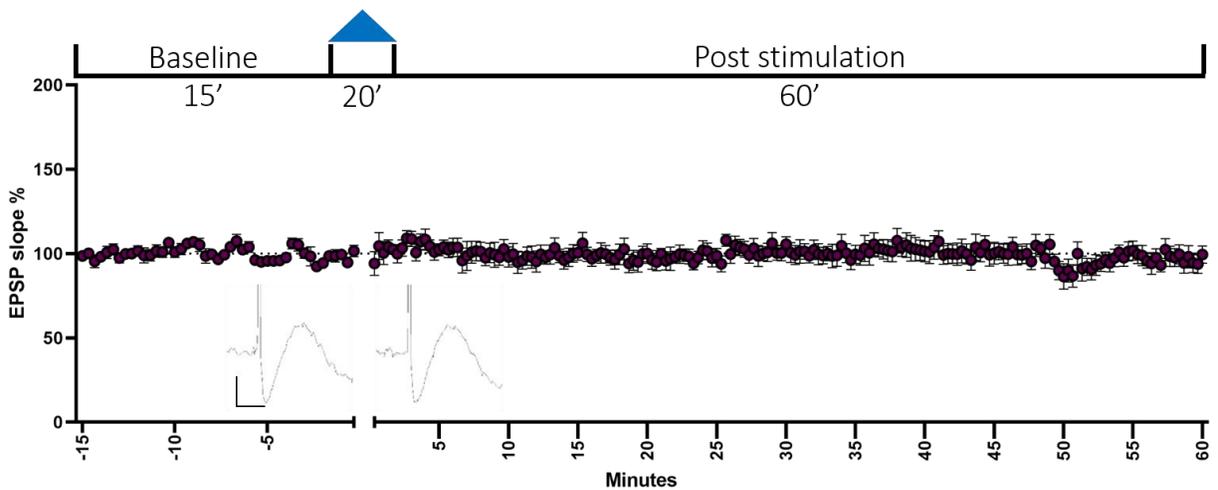


Figura 12. Estimulación optogenética prolongada de las proyecciones BLA – CI. La aplicación de pulsos de luz durante 20 minutos (triángulo azul) en animales que expresan Chr2 ( $n = 8$ ) no genera cambios en la pendiente de los potenciales evocados respecto a niveles basales. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential. Escala: 5 mseg, 0.2 mV.

Los experimentos de esta sección y las anteriores son manipulaciones en las que se busca estimular o activar a las proyecciones BLA – CI. Considerando los resultados obtenidos, se planteó la hipótesis de que la inhibición de las mismas produciría los efectos contrarios. Hablando específicamente de las preparaciones electrofisiológicas, la inhibición impediría la inducción de LTP. Para comprobarlo, en un grupo de animales se indujo la expresión viral de *archaerhodopsin* ( $n = 5$ ) en la BLA y 21 días después iniciaron los registros, en los que se realizó la fotoestimulación de Arch en las proyecciones hacia la ínsula después de haber generado LTP mediante HFS.

Contrario a los resultados esperados, esta manipulación optogenética de la vía no modifica la señal previamente potenciada por estimulación eléctrica de alta frecuencia, ya que el valor de la pendiente de los potenciales evocados se mantiene por encima de los niveles basales a lo largo de todo el registro posterior a la aplicación de luz, tal como se observa en la Figura 13. Si bien existe una mayor variabilidad en la primera mitad del registro después de la inhibición, ésta va disminuyendo hasta volverse una señal más estable. El análisis de la varianza arrojó un valor  $F_{(2,12)} = 66.2$ ,  $p < 0.0001$ , señalando un aumento de la pendiente de los fEPSPs entre el registro basal ( $\bar{X} = 100.743 \%$ ) y el periodo posterior a la estimulación eléctrica de alta frecuencia ( $\bar{X} = 148.657 \%$ ;  $q = 14.78$ ,  $p < 0.001$ ), así como entre el registro basal y el periodo posterior a la inhibición optogenética ( $\bar{X} = 143.793 \%$ ;  $q = 13.28$ ,  $p < 0.001$ ).

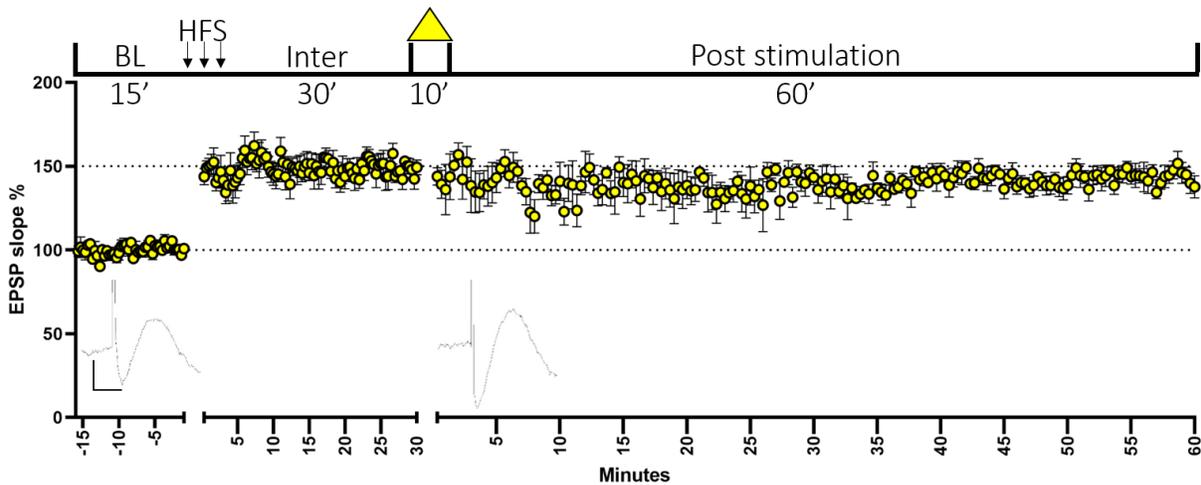


Figura 13. La inhibición optogenética con luz constante a una longitud de onda de 589 nm (triángulo amarillo) en las proyecciones BLA – CI que expresan la proteína archaerhodopsin ( $n = 5$ ) no produce cambios significativos en la señal previamente potenciada mediante HFS. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potentials, BL = Baseline, HFS = High Frequency Stimulation. Escala: 5 msec, 0.2 mV.

El experimento anterior no considera propiamente los dos momentos de activación de las proyecciones generados a partir de la doble estimulación optogenética, por lo que se planteó retomar dicho protocolo y realizar además un bloqueo farmacológico de receptores glutamatérgicos considerando los hallazgos obtenidos por microdiálisis que indicaron un aumento en los niveles extracelulares de glutamato a partir de las fotoestimulaciones (Figura 7). En este experimento, animales infectados con el vector que expresa Chr2 ( $n = 7$ ) recibieron dos estimulaciones optogenéticas bajo los mismos parámetros que los utilizados previamente, así como una infusión unilateral de APV (antagonista de receptores NMDA) en la corteza insular, en el mismo hemisferio en el que se realizó el registro y las fotoestimulaciones. La inyección del fármaco se llevó a cabo 10 minutos antes de la reactivación, durante el periodo interestimulación. Los resultados muestran que la administración de APV impide la inducción de potenciación a largo plazo aun con la doble fotoestimulación de las proyecciones que sí era capaz de inducir LTP (Figura 14). Destaca el hecho de que la variabilidad de la señal tras la primera estimulación continúa después de la inyección del fármaco y de la reactivación. Al realizar la comparación de la pendiente de los fEPSPs a lo largo del tiempo, no se encontraron diferencias entre el registro basal ( $\bar{X} = 102.611 \%$ ), el periodo interestimulación ( $\bar{X} = 122.738 \%$ ) y el registro post-estimulación ( $\bar{X} = 92.876 \%$ ), así lo señala el análisis estadístico ( $F_{(2,9)} = 0.6279, p = 0.5556$ ).

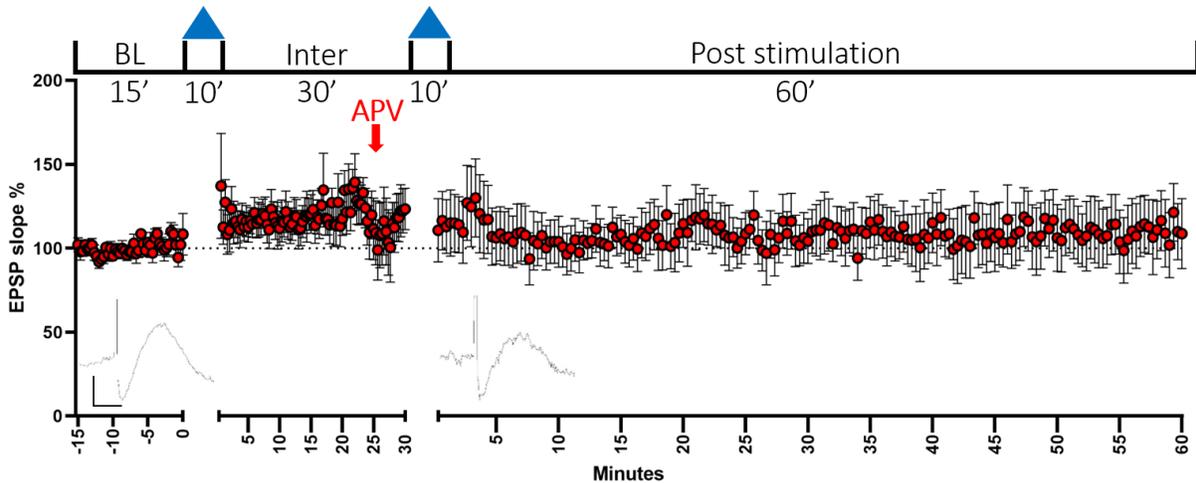


Figura 14. El bloqueo de la actividad glutamatérgica impide el establecimiento de LTP inducida por reactivación optogenética en la vía BLA – CI. La administración de APV (flecha roja) ocurrió 10 minutos antes de la segunda fotoestimulación (segundo triángulo azul) en animales con expresión de ChR2 ( $n = 7$ ). Después de la segunda estimulación optogenética, la pendiente de los EPSPs muestra mayor variabilidad y no es estadísticamente diferente del registro basal. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs durante el registro basal  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential, BL = Baseline, APV = ácido-2-amino-5-fosfonopentanoico. Escala: 5 mseg, 0.2 mV.

Si se toma en cuenta únicamente el registro de los últimos 10 minutos del periodo post-estimulación (eléctrica u optogenética) de cada uno de los ocho grupos (Figura 15), el análisis de los datos indica diferencias estadísticas entre las medias ( $F_{(7,45)} = 13.3, p < 0.0001$ ); a partir del análisis *post hoc* de comparaciones múltiples, se puede determinar que los incrementos en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios mediante estimulación eléctrica (HFS  $\bar{x} = 152.605$  %), doble fotoestimulación de *channelrhodopsin* (ChR2 OS+ROS  $\bar{x} = 142.845$  %) y fotoestimulación de *archaerhodopsin* con inducción previa de LTP por HFS (Arch  $\bar{x} = 143.793$  %) en las proyecciones amígdala – ínsula, son significativamente diferentes del resto de los grupos experimentales:

- HFS vs ChR2 OS ( $q = 8.05, p < 0.001$ ), ChR2 ROS ( $q = 7.067, p < 0.001$ ), EYFP OS+ROS ( $q = 6.793, p < 0.001$ ), ChR2 EOS ( $q = 8.084, p < 0.001$ ) y ChR2 APV ( $q = 5.096, p < 0.01$ ).

- ChR2 OS+ROS vs ChR2 OS ( $q = 6.653$ ,  $p < 0.001$ ), ChR2 ROS ( $q = 5.773$ ,  $p < 0.01$ ), EYFP OS+ROS ( $q = 5.498$ ,  $p < 0.01$ ), ChR2 EOS ( $q = 6.687$ ,  $p < 0.001$ ) y ChR2 APV ( $q = 4.609$ ,  $p < 0.05$ ).
- Arch vs ChR2 OS ( $q = 5.954$ ,  $p < 0.01$ ), ChR2 ROS ( $q = 5.261$ ,  $p < 0.05$ ), EYFP OS+ROS ( $q = 5.016$ ,  $p < 0.05$ ) y ChR2 EOS ( $q = 5.984$ ,  $p < 0.01$ ).

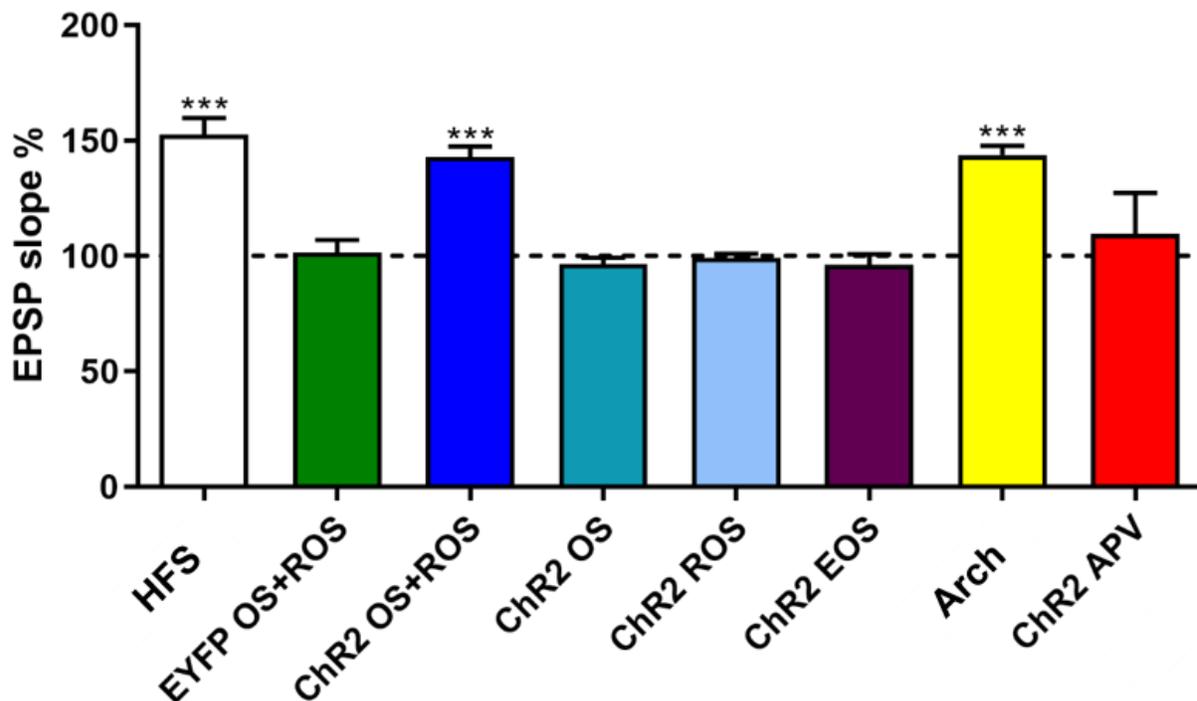


Figura 15. Promedio de los EPSPs posteriores a la aplicación de estimulación eléctrica de alta frecuencia (HFS,  $n = 8$ ), doble fotoestimulación con la expresión de EYFP (EYFP OS+ROS,  $n = 7$ ), doble fotoestimulación en animales con la expresión de channelrhodopsin-2 (ChR2 OS+ROS,  $n = 8$ ), fotoestimulación única de ChR2 (ChR2 OS,  $n = 8$ ; ChR2 ROS,  $n = 6$ ), fotoestimulación prolongada de ChR2 (ChR2 EOS,  $n = 8$ ), inhibición con archaerhodopsin (Arch,  $n = 5$ ) y doble fotoestimulación de ChR2 con bloqueo de receptores NMDA (ChR2 APV,  $n = 7$ ), en la vía BLA – CI. La inducción de LTP se observa en animales con estimulación eléctrica, reactivación optogenética de las proyecciones que expresan ChR2 y fotoestimulación de Arch en las mismas proyecciones después de la aplicación de HFS. Datos representados como media del porcentaje de cambio en la pendiente de los EPSPs respecto al registro basal durante los 10 últimos minutos del registro post-estimulación  $\pm$  SEM. EPSP = Excitatory Postsynaptic Potential, HFS = High-Frequency Stimulation, EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein, APV = ácido-2-amino-5-fosfonopentanoico, OS = Optic Stimulation, ROS = Replayed Optic Stimulation, EOS = Extended Optic Stimulation. \*\*\*  $p < 0.001$  respecto al registro basal (100 %)

En conjunto, los experimentos electrofisiológicos sugieren la importancia que tiene la reactivación para la generación de cambios en la comunicación sináptica en proyecciones amígdalo-corticales, así como la dependencia de este fenómeno de la actividad glutamatérgica. Si bien es posible inducir potenciación a largo plazo mediante estimulación eléctrica de alta frecuencia en tejido nervioso, esta intensidad de estimulación no refleja la actividad fisiológica habitual de las neuronas; en cambio, los fenómenos de reactivación parecen ocurrir de forma natural tras la adquisición de una memoria gustativa aversiva y ser necesarios para la evocación de la misma a largo plazo.

## **VI. Discusión**

Este trabajo tuvo por objetivo identificar la participación funcional de los eventos post-aprendizaje que operan en la vía amígdala basolateral (BLA) – corteza insular (CI) y que contribuyen al establecimiento de la memoria de aversión gustativa a largo plazo. Se determinó que la reactivación de la vía juega un papel determinante, desencadenando cambios en la concentración extracelular de neurotransmisores y modificaciones plásticas que podrían contribuir al proceso de consolidación de una memoria aversiva.

Los datos conductuales obtenidos muestran dos resultados importantes. El primero de ellos es que la manipulación específica de la vía BLA – CI lleva a resultados similares a los observados en animales entrenados en protocolos de aversión condicionada a sabores en los que el consumo de un estímulo gustativo es asociado con malestar gástrico (Panguluri et al., 2012; Yamamoto et al., 1995). Tanto en la inducción de malestar mediante LiCl como en la doble estimulación optogénica de las proyecciones BLA – CI, ocurre una disminución en el consumo de sacarina, hecho que

es considerado como indicador de aversión al sabor y que, en el caso de los animales estimulados, ocurre sin la presencia de señalización visceral de malestar.

A pesar de la similitud de resultados conductuales entre el CAS generado por LiCl y por la doble estimulación optogenética de la vía después del consumo de sacarina, se debe precisar que no es posible determinar si las estimulaciones están provocando alguna reacción emocional negativa o generando un estado interoceptivo de malestar. La evidencia a favor de la generación de estos estados proviene, en parte, de la bien descrita participación de la amígdala en el procesamiento de reacciones emocionales, principalmente negativas o aversivas (McGaugh, 2004; Qin et al., 2021). Existen trabajos en los que la manipulación optogenética de esta región cerebral conduce a comportamientos asociados a estrés o ansiedad (Belzung et al., 2014; Xiao et al., 2020), lo cual concuerda con la conducta de los animales observada durante la realización de las estimulaciones (i.e., el castaño de dientes).

La segunda contribución de nuestros experimentos conductuales radica en el hecho de que se requiere un patrón particular de activación en la vía BLA-CI para poder llegar al establecimiento de una memoria gustativa de aversión. Una estimulación próxima o distante -en términos de temporalidad- de la presentación del estímulo gustativo no disminuye la preferencia por el mismo a largo plazo, como tampoco lo hacen dos estimulaciones consecutivas (es decir, una estimulación de mayor duración). Es sólo a partir de la activación y reactivación de las proyecciones en diferentes momentos que ocurre el establecimiento de lo que interpretamos como una aversión gustativa condicionada.

A la luz de estos resultados, la memoria gustativa no se manifiesta como un fenómeno estático en el que la información se incorpore a partir de un evento unitario; requiere de varios eventos discretos que permiten formar un trazo que pueda perdurar. Nuestros datos apoyan la idea de que

se necesitan diferentes momentos de activación en los circuitos neuronales para que una memoria pueda consolidarse y mantenerse. En este punto es importante enfatizar que las reactivaciones estudiadas a lo largo de este trabajo no hacen referencia a la actualización o reconsolidación de la memoria, sino a fenómenos de naturaleza endógena.

Se ha observado que el bloqueo farmacológico de los eventos neuroquímicos posteriores a la adquisición no afecta la memoria a corto plazo del CAS pero impiden la formación de una memoria a largo plazo, y por lo tanto, se piensa que estos patrones de actividad no están involucrados en el proceso de adquisición de la memoria sino en la consolidación (Guzmán-Ramos et al., 2010). Por esta información y por el diseño experimental empleado, nuestras conclusiones sobre la participación de la reactivación se limitan a la fase de consolidación.

Se ha hallado evidencia de que las reactivaciones pueden ocurrir espontáneamente incluso semanas después de la adquisición de información, muchas veces asociadas a oleadas de síntesis de proteínas (De Sousa et al., 2019; Katche et al., 2013). Dichas reactivaciones recurrentes se extienden gradualmente hacia circuitos corticales para fortalecer la representación de los eventos asociados al aprendizaje y madurar el ensamble (Frankland & Bontempi, 2005; McClelland et al., 1995), por lo que se les ha dado un papel preponderante en la consolidación de sistemas (Bontempi et al., 1999; Buzsáki, 1996; McClelland et al., 1995). En contraste con este planteamiento, encontramos que las reactivaciones son necesarias en la consolidación celular, proceso que se sugiere es precedente a la consolidación de sistemas y tiene lugar en las sinapsis involucradas en la adquisición (Dudai, 2002).

Actualmente existe un consenso en la literatura sobre la importancia funcional de la reactivación de algunos circuitos en los procesos de la memoria en general, y a pesar de que la mayoría de las investigaciones se ha enfocado en el estudio de las representaciones espaciales y aversivas en

el hipocampo (De Sousa et al., 2019; Yoshii et al., 2017), las reactivaciones ocurren más allá del dominio hipocampal, expresándose en diferentes conductas y contextos (representaciones visuales y conceptuales de estímulos individuales (Schapiro et al., 2018), asociaciones (Schuck & Niv, 2019), tareas conductuales complejas (Tambini & Davachi, 2013), etc.) que dependen de otras estructuras cerebrales. Acorde con lo anterior, nuestros resultados proporcionan evidencia de la función de las activaciones post-adquisición en el establecimiento de una memoria gustativa aversiva en la vía amígdala basolateral – corteza insular.

Como se mencionó anteriormente, la importancia de las reactivaciones que ocurren durante el sueño radica en que, en dichos momentos, no hay un procesamiento sensorial de otros estímulos del ambiente que pudieran demandar recursos cognitivos e interferir con algún aprendizaje reciente, de manera que se promueve la consolidación de información relevante (Hasselmo & McGaughy, 2004). Bajo esta perspectiva, se sugiere que la actividad en los circuitos cerebrales en condiciones de vigilia puede dificultar los procesos de reactivación. Aunque el reposo puede priorizar la retención de información, la literatura también indica que los mecanismos de consolidación no son abolidos por tareas que demanden esfuerzo cognitivo (Varma et al., 2017, 2018). Además, se sabe que las reactivaciones pueden ocurrir desde las fases de entrenamiento en tareas de aprendizaje, durante las pausas conductuales o bien, en la conducta consumatoria que lleva a completar una secuencia natural de acciones (Samanta et al., 2020). Igualmente, datos de resonancia magnética funcional muestran incrementos de actividad en hipocampo y regiones corticales visuales de seres humanos despiertos inmediatamente después del aprendizaje (Schuck & Niv, 2019; Tambini & Davachi, 2013, 2019). En los experimentos conductuales de este trabajo, las estimulaciones fueron realizadas en animales despiertos y minutos después de la presentación del estímulo gustativo. Es probable que, debido a los altos niveles de diferentes neurotransmisores durante estados

de vigilia, las reactivaciones observadas en estos periodos lleven a la consolidación celular y fortalecimiento sináptico (Samanta et al., 2020).

Debido a que las reactivaciones durante el sueño son menos estructuradas (Tang et al., 2017) y a una disminución en los niveles extracelulares de neurotransmisores en esta fase respecto a periodos de vigilia (Samanta et al., 2020), estos patrones de actividad suelen ser diferentes a los ocurridos durante el aprendizaje (Peyrache et al., 2009) y no resultan en un cambio en la fuerza sináptica, sino que promueven la extracción de los componentes elementales de la memoria y el establecimiento de marcajes corticales requeridos en la consolidación de sistemas (Battaglia et al., 2012). Por lo tanto, dependiendo del estado sueño – vigilia, es probable que las reactivaciones tengan un significado funcional diferente.

El estudio del papel funcional de las reactivaciones en la consolidación de la memoria representa todavía un campo fértil de estudio pues quedan muchas dudas por resolver. Por lo encontrado en la literatura y en los resultados propios, se hipotetiza que la reactivación emula la actividad vista durante el aprendizaje, sin embargo, aún no está claro si existen diferencias entre ambas representaciones, por ejemplo, en la cantidad de información que cada una contiene (Favila et al., 2020). Aunque nuestros datos muestran que la reactivación ocurre en el mismo sustrato neural en donde se representa el aprendizaje, a medida que pasa el tiempo, la información debe ser procesada en regiones corticales para su persistencia, de acuerdo con lo propuesto tanto en la teoría de consolidación de sistemas (Favila et al., 2020) como en la teoría de los trazos mnémicos múltiples, la cual postula que dicho trazo debe adquirir cierta redundancia a nivel estructural para su almacenamiento adecuado (Brunec et al., 2020). Los mecanismos que gobiernan esta transición, así como la identidad de las estructuras corticales, al menos en la memoria del CAS, aún se desconocen.

Otras cuestiones importantes y pendientes de investigar incluyen la identificación de indicadores moleculares de reactivación que predigan consistentemente la retención de la memoria, determinar si diferentes aprendizajes muestran perfiles de reactivación particulares, y entender los mecanismos que controlan la temporalidad y frecuencia de dichas reactivaciones.

Además, el análisis del patrón de liberación de neurotransmisores en la corteza insular al momento de realizar la fotoestimulación de las proyecciones provenientes de la amígdala indicó un aumento en los niveles extracelulares de glutamato durante la primera estimulación y en la reactivación, así como una tendencia a la alza en los niveles de norepinefrina y GABA únicamente en la reactivación.

La señalización a través de neurotransmisores y segundos mensajeros es un proceso fundamental en la consolidación de la memoria (Viola et al., 2014), ya que regula las funciones de diversos receptores, modula cascadas de activación intracelular y, en última instancia, mantiene la plasticidad sináptica (Vishnoi et al., 2018). Nuestros hallazgos coinciden con lo observado por Guzmán-Ramos et al. (2010, 2012), quienes sugieren que las reactivaciones neuroquímicas post-adquisición en las estructuras que estuvieron inicialmente involucradas en la asociación de estímulos en el CAS son señales requeridas para la consolidación de dicha memoria. Ellos encontraron que ante la presentación de sacarina ocurren incrementos extracelulares de norepinefrina y dopamina en la amígdala e ínsula, respectivamente; mientras que la inyección intraperitoneal de LiCl provoca un aumento en los niveles de glutamato en ambas estructuras. Estas señales vuelven a aparecer después del entrenamiento (i.e. sólo en animales condicionados) y si son bloqueadas por antagonistas de sus receptores, se impide la memoria a largo plazo.

El hallazgo de la liberación de glutamato a partir de las estimulaciones optogenéticas de la vía BLA – CI confirma la naturaleza glutamatérgica de las proyecciones así como la efectividad del

vector viral empleado para expresar la opsina en ellas; dicho vector utiliza la secuencia promotora de CaMKII, proteína cinasa típicamente expresada en células excitatorias (Cui et al., 2020).

En términos de reactivación, se ha demostrado que diferentes receptores de glutamato se someten a cambios de larga duración y son necesarios en puntos temporales lejanos al entrenamiento para la formación de la memoria en hipocampo (Cammarota et al., 1996; Riedel & Micheau, 1999). En el caso concreto del CAS, la actividad glutamatérgica en la amígdala durante la adquisición modula la actividad de los receptores NMDA en la corteza insular al menos por una hora después de la asociación de estímulos (Ferreira et al., 2005). No obstante, la actividad glutamatérgica requiere de varios procesos de neuromodulación y transducción de señales para la formación del CAS e involucra principalmente a los receptores colinérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos y NMDA, así como la activación de cascadas de señalización mediadas por cinasas (Miranda et al., 2003; Yasoshima et al., 2000).

A diferencia del glutamato, los cambios en los niveles extracelulares de norepinefrina tienden a aparecer en la segunda estimulación de las proyecciones BLA – CI. Este neurotransmisor está relacionado con la respuesta a eventos estresantes (Bornstein et al., 2006), por lo que su liberación podría ser necesaria para señalar, en el caso del CAS, el componente emocional aversivo de la asociación, aunque se propone que la consolidación de memorias emocionales, aversivas o no, se ve favorecida por este neurotransmisor (McGaugh, 2004). La norepinefrina es necesaria para efectuar cambios sinápticos, tanto de disminución como de incremento en la fuerza sináptica. Se cuenta con evidencia de que las catecolaminas tienen fuerte influencia moduladora en los procesos de consolidación en los periodos post-aprendizaje en tareas aversivas como la evitación inhibitoria y el miedo contextual, donde las infusiones en amígdala de norepinefrina o agonistas adrenérgicos mejoran la consolidación (LaLumiere & McGaugh, 2005; Meir Drexler & Wolf, 2017; Schwabe

et al., 2013) a través de la regulación de la síntesis de proteínas relacionadas con plasticidad (Frey et al., 1991).

Se sabe que la norepinefrina guarda una relación colaborativa con el glutamato, ya que al coactivar receptores NMDA y  $\beta$ -adrenérgicos en la amígdala es posible generar una evitación hacia estímulos gustativos (Osorio-Gómez et al., 2019); además, existen datos electrofisiológicos que indican que la norepinefrina regula las respuestas excitatorias dependientes del receptor NMDA en las neuronas glutamatérgicas de la BLA, facilitando la transmisión sináptica (Ferry et al., 1997) (Huang et al., 1993, 1998). Esto es posible a través de la actividad de cinasas como PKA, que fosforilan subunidades específicas de los receptores NMDA y provocan un incremento en la conductancia del canal que promueve el aumento en el calcio postsináptico (Skeberdis et al., 2006), el cual a su vez activa otras cinasas y fosfatasa que inducen cambios persistentes en la fuerza sináptica.

En contraste, se obtuvo un resultado inesperado a partir de las fotoestimulaciones en la vía y que tiene que ver con la tendencia hacia el incremento en los niveles extracelulares de GABA que sólo se observó en el momento de la reactivación (Figura 7). Teniendo en cuenta la especificidad de las estimulaciones para incidir sobre neuronas excitatorias, se propone que esta liberación, junto con la de norepinefrina, debe provenir de estructuras o proyecciones que mantienen comunicación con la corteza insular (Elliott et al., 2021; Yiannakas et al., 2021).

Investigaciones de otros grupos sugieren que el aprendizaje del CAS no depende en su totalidad del fortalecimiento de las conexiones sinápticas. Haley et al. (2020) observaron que la evocación de esta memoria lleva a una disminución en la actividad neuronal de la porción agranular de la ínsula así como a una disminución en la transmisión sináptica excitatoria, mientras que Yiannakas et al. (2021) encontraron que hay un incremento en la inhibición de tipo GABAérgica en la CI

atribuida a interneuronas positivas a parvalbúmina, igualmente observado en la evaluación a largo plazo del CAS. Por lo que la liberación de GABA hacia el momento de la reactivación podría implicar un mecanismo compensatorio como resultado del incremento previo en los niveles de glutamato y que en la segunda estimulación podría generar efectos adversos debido a la excitotoxicidad. Para comprobar que la liberación de GABA tendría motivos homeostáticos, se requeriría analizar su liberación durante una estimulación prolongada, como la realizada en los experimentos conductuales y electrofisiológicos.

En el caso de dopamina, no se observaron cambios de liberación a partir de las estimulaciones, en contraste con lo observado en protocolos de CAS, en los que hay incrementos y reactivaciones dopaminérgicas en la ínsula (Guzmán-Ramos et al., 2010). En este sentido, la actividad dopaminérgica puede promover la traducción de proteínas al incidir sobre receptores D1/D5, proceso esencial en la consolidación de la memoria (Moncada et al., 2011; Smith et al., 2005). Sin embargo, debe considerarse que el primer pico de actividad de este neurotransmisor observado por Guzmán-Ramos et al. (2010) ocurre con la presentación de sacarina. Es probable que en nuestros experimentos no se haya observado este tipo de actividad debido a que la microdiálisis se realizó en animales anestesiados cuya única estimulación consistió en la aplicación de los pulsos de luz, sin presentar estímulo gustativo alguno.

Respecto a los datos electrofisiológicos, observamos que la reactivación amígdalo-cortical produce cambios en la comunicación sináptica en forma de potenciación a largo plazo. Estas modificaciones plásticas, dada su vinculación con los procesos de aprendizaje y memoria (Lisman et al., 2011), podrían contribuir a la inducción del condicionamiento aversivo al sabor observado en los experimentos anteriores.

De forma interesante, la fotoinhibición de las proyecciones no tuvo el efecto esperado, pues el aumento en los potenciales excitatorios (obtenido mediante estimulación de alta frecuencia) se mantuvo después de la aplicación de luz. Debe tenerse en consideración que en este experimento, la inducción de LTP fue mediante estimulación eléctrica, la cual podría ser un modelo de plasticidad más robusto por los parámetros de estimulación empleados (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). Existe también la posibilidad de que la vía BLA – CI esté involucrada en el establecimiento y no en el mantenimiento de la LTP, ya que en los experimentos de doble estimulación, la manipulación ocurría como paso previo a la inducción de potenciación, mientras que la inhibición de las proyecciones sucedió cuando los cambios en la comunicación sináptica ya se habían establecido.

Ante estos resultados, se diseñó otro experimento en el cual, antes de la reactivación optogénica, se administró un antagonista glutamatérgico en la CI. De esta preparación se concluyó que la inducción de plasticidad sináptica ocasionada por la reactivación optogénica es dependiente de la actividad de los receptores NMDA, pues el bloqueo farmacológico de los mismos con APV impide el establecimiento de LTP. Estos resultados permiten entender la contribución del glutamato que se libera a partir de las fotoestimulaciones. Dada su coactivación con glutamato y glicina, junto con la liberación de  $Mg^{2+}$  dependiente de voltaje, los receptores NMDA tienen un perfil idóneo para regular la plasticidad sináptica: la liberación presináptica de glutamato se sincroniza con una activación postsináptica despolarizante para dar como resultado la apertura de los receptores y la entrada de calcio a la célula (Bliss & Collingridge, 1993).

Adicionalmente, por los datos de microdiálisis que indican una tendencia al aumento en los niveles de norepinefrina en la CI durante la reactivación, y por la ya descrita interacción entre este

neurotransmisor con el glutamato, se sugiere que el bloqueo de la actividad noradrenérgica podría tener un efecto similar a lo observado con APV.

Por otra parte, De Sousa y colaboradores proporcionan evidencia que respalda la posibilidad de inducir cambios sostenidos en la actividad electrofisiológica de proyecciones específicas sólo cuando éstas son expuestas a un proceso de reactivación, en el cual las proyecciones son activadas inicialmente por un reto cognitivo y tiempo después mediante estimulación optogenética (De Sousa et al., 2019). En concordancia con lo anterior, nuestros resultados indican que una estimulación de la vía BLA – CI, y por tanto, un solo evento de liberación de glutamato, no es suficiente para modificar los potenciales postsinápticos excitatorios; deben ocurrir, al menos, dos momentos de elevada actividad glutamatérgica. Una posible explicación a tal fenómeno es que el aumento en los niveles extracelulares del neurotransmisor, generado a partir de una estimulación, no es suficiente para generar cambios plásticos. No obstante, este planteamiento queda descartado al considerar que una estimulación de mayor duración tampoco es capaz de inducir potenciación a largo plazo. Deben existir entonces mecanismos adicionales, basados probablemente en la progresión temporal de ciertos eventos, bajo los cuales las reactivaciones operan sobre la memoria.

En el momento del aprendizaje, se asume que la plasticidad sináptica ocurre en un subgrupo de neuronas que son activadas durante la experiencia y se vuelven parte del ensamble neural que representa a esa memoria (Tonegawa et al., 2015). Después de este proceso, el establecimiento de la memoria a largo plazo requiere de la activación de factores de transcripción para modular la expresión de genes, así como de la síntesis, modificaciones postraduccionales y reorganización de las proteínas que permitan un remodelado sináptico para estabilizar al trazo de memoria (Alberini, 2009; Costa-Mattioli & Sonenberg, 2008; Morris, 2006). Tomando como referencia los planteamientos anteriores, surge la hipótesis de *tagging* sináptico y captura, que se propone describir los

cambios sinápticos que ocurren durante la formación de la memoria (Vishnoi et al., 2016). Inicialmente se probó y desarrolló en registros electrofisiológicos *in vitro* de hipocampo, en donde un protocolo de estimulación débil resulta en LTP de corta duración; esta estimulación establece marcas (o ‘tags’) en las sinapsis activadas. Si tiempo después ocurre una estimulación fuerte proveniente de una fuente independiente pero que converge en la misma población neuronal, y que es capaz de inducir la síntesis de proteínas, los tags de las sinapsis potenciadas débilmente pueden capturar a estas proteínas y expresar una LTP más robusta, incluso con estimulación débil (Frey & Morris, 1997). Este fenómeno fue observado posteriormente en estudios *in vivo* (Shires et al., 2012).

Este mecanismo plástico explica cómo la señalización neural en una sinapsis particular genera un ‘target’ para el tráfico de proteínas esenciales para la consolidación y, en última instancia la memoria a largo plazo (Barco et al., 2008; Govindarajan et al., 2006). Así, la persistencia de la potenciación neuronal y la duración de la memoria dependen no sólo de los eventos que ocurren en el momento de su inducción, sino también de otros que ocurren subsecuentemente al estímulo y que modifican la actividad de las neuronas involucradas (Viola et al., 2014).

Los resultados presentados en este trabajo coinciden en ciertos puntos con la hipótesis de *tagging* y captura:

- La especificidad del *input* es una característica fundamental en este modelo; tanto los tags sinápticos como las proteínas deben estar en el mismo sustrato neural (Vishnoi et al., 2018).

En los experimentos conductuales, la representación del estímulo gustativo en la corteza insular converge con las proyecciones estimuladas que provienen de la amígdala.

- El marcaje de las sinapsis ocurriría a partir de la presentación de sacarina en dichos experimentos, mientras que la estimulación que lleva a la síntesis de proteínas estaría representada por la activación y reactivación optogenéticas que promueven la liberación de glutamato.
- A partir de una estimulación débil no es posible llegar al establecimiento de una memoria a largo plazo, tal como ocurre con la presentación del estímulo gustativo sin la aplicación de fotoestimulaciones. En este caso, no disminuye la preferencia por la sacarina.
- Tanto los *tags* sinápticos como las proteínas producto de la estimulación fuerte son transitorios, por lo que existe una distancia temporal crítica entre ambos elementos que, si es rebasada, impide la captura de las proteínas y la memoria a largo plazo. Se sabe que la ventana temporal entre la estimulación débil y fuerte para la inducción de una potenciación robusta es de alrededor de 30 minutos (Frey et al., 2001; Straube & Frey, 2003). Esto explicaría por qué la estimulación correspondiente a la reactivación, alejada temporalmente de la presentación de sacarina, no genera aprendizaje. Así mismo, el registro de la actividad espontánea en la BLA revela que la tasa de disparo de las neuronas incrementa gradualmente después del entrenamiento en una tarea aversiva, alcanzando el pico de actividad entre los 30 y 50 minutos después de la adquisición (Pelletier et al., 2005).

Sin embargo, también se debe señalar que algunos de los datos obtenidos no concuerdan o no son considerados en el modelo. En primer lugar, si el marcaje de las sinapsis se da a partir de la presentación del estímulo gustativo, éste no está presente en las preparaciones electrofisiológicas y a pesar de ello, es posible inducir LTP sólo a partir de la activación y reactivación de las proyecciones BLA – CI. Ante esta discrepancia se propone, por un lado, que los cambios plásticos observados no equivalen necesariamente a un aprendizaje de aversión gustativa pero podrían formar

parte de éste, considerando que ambos fenómenos tienen a la reactivación como mecanismo común.

Por otra parte, los resultados electrofisiológicos derivados de este proyecto no se pueden interpretar en términos del *tagging* manejado por el modelo al no considerarse una vía independiente que tenga convergencia con la población neural a la que llegan las proyecciones amígdalo-corticales y que realice el marcaje. Es a partir de la reactivación de una vía cuando se induce LTP.

Es posible entonces que exista alguna forma alterna de marcaje que lleve a modificaciones plásticas sin involucrar otro tipo de estimulaciones, pudiendo tratarse de mecanismos dependientes de temporalidad. Bajo esta idea, y considerando los picos de actividad en la BLA tras un aprendizaje (Pelletier et al., 2005), una primera activación predispondría a la vía e iniciaría los procesos plásticos pero no sería suficiente para estabilizarlos, requiriendo de al menos una segunda activación separada temporalmente de la primera y que coincida con el punto máximo de actividad inducido a partir de la estimulación inicial. El intervalo entre activaciones proporcionaría el tiempo necesario para el desarrollo de otros eventos de señalización a partir de la primera liberación de glutamato y podría ayudar a entender la variabilidad de los potenciales de campo observada después de la primera estimulación y su estabilización hacia la segunda aplicación de luz. Además, retomando los patrones de liberación de los neurotransmisores restantes, es en este punto donde posiblemente intervendría la actividad de GABA y norepinefrina, fungiendo como estabilizadores de los cambios sinápticos.

En segundo lugar, es preciso considerar que tanto la hipótesis de *tagging* sináptico como los experimentos de este trabajo llevan a cabo estimulaciones a partir de fuentes exógenas artificiales controladas espacio-temporalmente sin tomar en cuenta la actividad que pudiera suscitarse de forma intrínseca en las proyecciones cerebrales, por lo que se mantiene la interrogante sobre qué

mecanismo, en condiciones naturales, proporciona la instrucción para que ocurra la reactivación y en qué momento o circunstancias ‘decide’ hacerlo. Se han desarrollado propuestas con mayor validez ecológica, como el modelo de *tagging* conductual, en el que se postula que la exposición a la novedad proporcionaría el marcaje necesario para que un aprendizaje débil se consolide como una memoria robusta (Korz, 2018; Vishnoi et al., 2016); sin embargo, este planteamiento tampoco permite dilucidar los procesos celulares o moleculares específicos que dan paso a las reactivaciones.

La visión actual de un ‘tag’ es la de un ensamble de moléculas con la capacidad de modificar la morfología neuronal (Korz, 2018; Viola et al., 2014). Se ha considerado que ciertos receptores, como los de tipo Trkb, podrían funcionar como tags (Vishnoi et al., 2018). Sin embargo, debido a su rápida activación y la velocidad con la que pueden alterar la función de receptores y moléculas estructurales, las cinasas son de especial interés en la búsqueda de los componentes de la maquinaria de *tagging* (Viola et al., 2014). Usualmente se encuentran presentes en la densidad postsináptica y contribuyen de manera importante a la plasticidad sináptica y delineación molecular de la memoria a largo plazo (Izquierdo et al., 2006; Vishnoi et al., 2016); algunos ejemplos incluyen PKA, CaMKII, ERK y PKM $\zeta$ , (Redondo et al., 2010; Sajikumar et al., 2007). Se sabe que algunas de estas cinasas son necesarias en diferentes momentos después del entrenamiento en una tarea de memoria (Cammarota et al., 1996).

Los receptores NMDA pueden participar en el mecanismo de *tagging* desencadenando la activación de CaMKII y PKA (Vishnoi et al., 2018). Se ha observado que la estimulación de baja frecuencia de estos receptores crea un *tag* sináptico que sólo es capaz de producir memoria a corto plazo a partir de la activación de fosfatasa, mientras que se necesitan frecuencias de estimulación más altas para reclutar a distintas cinasas e inducir potenciación a largo plazo (Vishnoi et al., 2016).

Igualmente, se piensa que estos receptores son críticos en el establecimiento de lo que se denomina ‘tags conductuales’, en los que un aprendizaje débil se ve potenciado por otro aprendizaje que dependa del mismo sustrato neuroanatómico que el primero (Moncada et al., 2011).

Sólo aquellas memorias que son persistentes muestran oleadas de síntesis de proteínas y expresión de genes después del aprendizaje (Slipczuk et al., 2009). Dichas proteínas deben ser capturadas por los *tags* e interactuar con ellos. Katche, Cammarota y Medina (2013) hicieron una revisión sobre las diferentes proteínas que muestran patrones de reactivación en diferentes estructuras, tiempos y tareas conductuales. Se ha encontrado, por ejemplo, que existen dos periodos de síntesis de mRNA hipocampal que son requeridos para la consolidación de la memoria aversiva de evitación a un contexto (Igaz et al., 2002). En la amígdala lateral, la reactivación del ensamble neural específico de la memoria de miedo contextual con altos niveles de la proteína CREB lleva a la inducción de una conducta de congelamiento como indicador de una memoria de miedo (Kim et al., 2013).

La literatura muestra que la consolidación de la memoria del CAS requiere de la inducción de síntesis de proteínas *de novo* no sólo durante el entrenamiento, sino también durante las primeras horas después de la adquisición (Bekinschtein et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2011; Rodríguez-Blanco et al., 2019). Así, se ha detectado la expresión de proteínas como BDNF, calcineurina y Zif 268 en la corteza insular y/o amígdala. Esto concuerda con el hecho de que tales proteínas son capaces de regular los procesos celulares que subyacen a la cognición y otras conductas complejas al tener amplio impacto en la señalización cerebral y plasticidad sináptica (Bekinschtein et al., 2007), aunque surge la duda respecto a si existen proteínas específicas que sean capturadas por los *tags* sinápticos dependiendo del tipo de memoria.

Los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria aun no se descifran por completo, el estudio de cómo las representaciones de lo que aprendemos se transforman a través de las reactivaciones es ejemplo de ello. Abordar estos fenómenos desde perspectivas celulares y/o moleculares nos permite profundizar en el conocimiento de la maquinaria puesta en marcha para modificar al cerebro y poder establecer un recuerdo.

## **VII. Conclusiones**

En esta investigación se analizó, mediante la manipulación optogenética de las proyecciones provenientes de la amígdala basolateral (BLA) hacia la corteza insular (CI), de qué manera los procesos de reactivación conducen al establecimiento de una memoria gustativa aversiva a largo plazo. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La inducción de una memoria gustativa de aversión requiere de la activación y reactivación de la vía BLA-CI, de forma similar a lo que ocurre en el condicionamiento de aversión al sabor inducido por LiCl. Dicha reactivación se encuentra separada, en términos temporales, de la activación que ocurre durante el aprendizaje.
- Uno de los mecanismos puestos en marcha a partir de la activación y reactivación de las proyecciones implica el aumento extracelular de glutamato en la corteza insular.
- La reactivación glutamatérgica en la vía, a través de los receptores NMDA y mecanismos de marcaje sináptico y captura de proteínas, es necesaria para el establecimiento de potenciación a largo plazo. Estos cambios sinápticos podrían contribuir a la consolidación de la memoria de aversión gustativa.

## VIII. Referencias

- Agren, T. (2014). Human reconsolidation: A reactivation and update. *Brain Research Bulletin*, *105*, 70–82. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2013.12.010>
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, *89*(1), 121–145. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00017.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0010924960010.JPG>
- Barco, A., Lopez de Armentia, M., & Alarcon, J. M. (2008). Synapse-specific stabilization of plasticity processes: The synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(4), 831–851. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2008.01.002>
- Battaglia, F. P., Borensztajn, G., & Bod, R. (2012). Structured cognition and neural systems: From rats to language. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1626–1639. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2012.04.004>
- Baudry, M., Zhu, G., Liu, Y., Wang, Y., Briz, V., & Bi, X. (2015). Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning. *Brain Research*, *1621*, 73–81. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2014.11.033>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF-Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, *53*(2), 261–277. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.11.025>
- Belzung, C., Turiault, M., & Griebel, G. (2014). Optogenetics to study the circuits of fear- and depression-like behaviors: A critical analysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *122*, 144–157. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2014.04.002>
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. In *Neurobiology of Learning and Memory* (Vol. 109, pp. 207–216). Neurobiol Learn Mem. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 5, Issue 3, pp. 209–217). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I., Coleman-Mesches, K., & McGaugh, J. L. (1997). Insular cortex and amygdala lesions induced after aversive training impair retention: Effects of degree of training. *Neurobiology of Learning and Memory*, *67*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3747>
- Bertrand, D., Yannick, S., Mathilde, B., Frédéric, L., Nadine, R., & Guillaume, F. (2009). Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, *29*(8), 1654–1662. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06711.x>
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *1993* *361*:6407, *361*(6407), 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., & Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* *1999* *400*:6745, *400*(6745), 671–675. <https://doi.org/10.1038/23270>
- Bornstein, S. R., Schuppenies, A., Wong, M. L., & Licinio, J. (2006). Approaching the shared biology of obesity and depression: The stress axis as the locus of gene-environment interactions. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 11, Issue 10, pp. 892–902). <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001873>
- Bouton, M. E., & Moody, E. W. (2004). Memory processes in classical conditioning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*(7), 663–674. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.001>
- Brunec, I. K., Robin, J., Olsen, R. K., Moscovitch, M., & Barense, M. D. (2020). Integration and differentiation of hippocampal memory traces. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *118*, 196–208. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2020.07.024>

- Buzsáki, G. (1996). The Hippocampo-Neocortical Dialogue. *Cerebral Cortex*, 6(2), 81–92. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/6.2.81>
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1996). Reversible Changes in Hippocampal 3H-AMPA Binding Following Inhibitory Avoidance Training in the Rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(1), 85–88. <https://doi.org/10.1006/NLME.1996.0046>
- Clark, R. E. (2004). The classical origins of Pavlov’s conditioning. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 39(4), 279–294. <https://doi.org/10.1007/BF02734167>
- Costa-Mattioli, M., & Sonenberg, N. (2008). Chapter 5 Translational control of gene expression: A molecular switch for memory storage. *Progress in Brain Research*, 169, 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00005-2)
- Cui, X., Zhang, F., Zhang, H., Huang, X., Wang, K., Huang, T., Yang, X., & Zou, L. (2020). Neuroprotective Effect of Optogenetics Varies With Distance From Channelrhodopsin-2 Expression in an Amyloid- $\beta$ -Injected Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 1059. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.583628/BIBTEX>
- Davis, P., & Reijmers, L. G. (2018). The dynamic nature of fear engrams in the basolateral amygdala. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 141, pp. 44–49). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.004>
- De Sousa, A. F., Cowansage, K. K., Zutshi, I., Cardozo, L. M., Yoo, E. J., Leutgeb, S., & Mayford, M. (2019). Optogenetic reactivation of memory ensembles in the retrosplenial cortex induces systems consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(17), 8576–8581. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1818432116>
- Detre, G. J., Natarajan, A., Gershman, S. J., & Norman, K. A. (2013). Moderate levels of activation lead to forgetting in the think/no-think paradigm. *Neuropsychologia*, 51(12), 2371–2388. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPSYCHOLOGIA.2013.02.017>
- Dickinson, A., & Mackintosh, N. J. (1978). Classical Conditioning in Animals. *Annual Review of Psychology*, 29(1), 587–612. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.29.020178.003103>
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00305-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00305-7)
- Eichenbaum, H. (2016). Memory systems: Introduction and overview. In *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* (pp. 1–7). Elsevier Science Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21066-3>
- Elliott, M., Hsu, M., Uddin, L., Timpano, K., & Johnson, S. (2021). Locus Coeruleus - Anterior Insula Functional Connectivity Predicts Emotion-Related Impulsivity as a Function of Reward Magnitude. *Biological Psychiatry*, 89(9), S264. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2021.02.661>
- Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*, 779(1–2), 314–319. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01175-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01175-X)
- Escobar, Martha L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852(1), 208–212. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02134-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02134-4)
- Favila, S. E., Lee, H., & Kuhl, B. A. (2020). Transforming the Concept of Memory Reactivation. *Trends in Neurosciences*, 43(12), 939–950. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.09.006>
- Ferreira, G., Miranda, M. I., De La Cruz, V., Rodríguez-Ortiz, C. J., & Bermúdez-Rattoni, F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *European Journal of Neuroscience*, 22(10), 2596–2604. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2005.04440.X>
- Ferry, B., Magistretti, P. J., & Pralong, E. (1997). Noradrenaline modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basolateral amygdala in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 9(7), 1356–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01490.x>
- Fonzo, G. A., Goodkind, M. S., Oathes, D. J., Zaiko, Y. V., Harvey, M., Peng, K. K., Weiss, M. E.,

- Thompson, A. L., Zack, S. E., Lindley, S. E., Arnow, B. A., Jo, B., Rothbaum, B. O., & Etkin, A. (2021). Amygdala and Insula Connectivity Changes Following Psychotherapy for Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized Clinical Trial. *Biological Psychiatry*, 89(9), 857–867. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2020.11.021>
- Forcato, C., Fernandez, R. S., & Pedreira, M. E. (2014). Strengthening a consolidated memory: The key role of the reconsolidation process. *Journal of Physiology-Paris*, 108(4–6), 323–333. <https://doi.org/10.1016/J.JPHYS-PARIS.2014.09.001>
- Fox, A. S., Oler, J. A., Tromp, D. P. M., Fudge, J. L., & Kalin, N. H. (2015). Extending the amygdala in theories of threat processing. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 38, Issue 5, pp. 319–329). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.03.002>
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 2005 6:2, 6(2), 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>
- Frey, S., Bergado-Rosado, J., Seidenbecher, T., Pape, H. C., & Frey, J. U. (2001). Reinforcement of Early Long-Term Potentiation (Early-LTP) in Dentate Gyrus by Stimulation of the Basolateral Amygdala: Heterosynaptic Induction Mechanisms of Late-LTP. *Journal of Neuroscience*, 21(10), 3697–3703. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-03697.2001>
- Frey, U., Matthies, H., Reymann, K. G., & Matthies, H. (1991). The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neuroscience Letters*, 129(1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90732-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90732-9)
- Frey, U., & Morris, R. G. M. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 1997 385:6616, 385(6616), 533–536. <https://doi.org/10.1038/385533a0>
- GADDUM, J. H. (1937). Pavlov and his School: the Theory of Conditioned Reflexes. *Nature*, 140(3547), 700–701. <https://doi.org/10.1038/140700a0>
- Gallagher, M., & Chiba, A. A. (1996). The amygdala and emotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(2), 221–227. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80076-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80076-6)
- Garcia, J., Ervin, F. R., & Koelling, R. A. (1966). Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science*, 5(3), 121–122. <https://doi.org/10.3758/BF03328311>
- GARCIA, J., KIMELDORF, D. J., & KOELLING, R. A. (1955). Conditioned Aversion to Saccharin Resulting from Exposure to Gamma Radiation. *Science*, 122(3160), 157–158. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.122.3160.157>
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4(1), 123–124. <https://doi.org/10.3758/bf03342209>
- Gil-Lievana, E., Balderas, I., Moreno-Castilla, P., Luis-Islas, J., McDevitt, R. A., Tecuapetla, F., Gutierrez, R., Bonci, A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2020). Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory. *Communications Biology* 2020 3:1, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0862-z>
- Gogolla, N. (2017). The insular cortex. In *Current Biology* (Vol. 27, Issue 12, pp. R580–R586). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010>
- Govindarajan, A., Kelleher, R. J., & Tonegawa, S. (2006). A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nature Reviews Neuroscience* 2006 7:7, 7(7), 575–583. <https://doi.org/10.1038/nrn1937>
- Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. *Science*, 201(4352), 267–269. <https://doi.org/10.1126/science.663655>
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 226–236. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x>
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learning and Memory*, 19(6), 231–238. <https://doi.org/10.1101/lm.024703.111>

- Haley, M. S., Bruno, S., Fontanini, A., & Maffei, A. (2020). LTD at amygdalocortical synapses as a novel mechanism for hedonic learning. *ELife*, *9*, 1–21. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55175>
- Hasselmo, M. E., & McGaughy, J. (2004). High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Progress in Brain Research*, *145*, 207–231. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45015-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45015-2)
- Huang, C. C., Lin, C. H., & Gean, P. W. (1998). Potentiation of N-methyl-d-aspartate currents by isoproterenol in the acutely dissociated rat amygdalar neurons. *Neuroscience Letters*, *253*(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00571-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00571-0)
- Huang, C. C., Tsai, J. J., & Gean, P. W. (1993). Enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol is blocked by Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate. *Neuroscience Letters*, *161*(2), 207–210. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90295-V](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90295-V)
- Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6781–6789. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06781.2002>
- Izquierdo, Iván, Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, *29*(9), 496–505. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2006.07.005>
- Izquierdo, Ivan, Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear memory. *Physiological Reviews*, *96*(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. In *Nature* (Vol. 517, Issue 7534, pp. 284–292). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Katche, C., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2013). Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, *106*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2013.06.018>
- Kiefer, S. W., & Braun, J. J. (1977). Absence of differential associative responses to novel and familiar taste stimuli in rats lacking gustatory neocortex. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *91*(3), 498–507. <https://doi.org/10.1037/h0077347>
- Kim, J., Kwon, J. T., Kim, H. S., Josselyn, S. A., & Han, J. H. (2013). Memory recall and modifications by activating neurons with elevated CREB. *Nature Neuroscience* *2013* *17*:1, *17*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nn.3592>
- Korz, V. (2018). Behavioral tagging: Synaptic event or cellular alteration? *Neurobiology of Learning and Memory*, *148*, 8–10. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2017.12.005>
- Krabbe, S., Gründemann, J., & Lüthi, A. (2018). Amygdala Inhibitory Circuits Regulate Associative Fear Conditioning. In *Biological Psychiatry* (Vol. 83, Issue 10, pp. 800–809). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.006>
- Krettek, J. E., & Price, J. L. (1974). A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex. *Brain Research*, *67*(1), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90309-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90309-6)
- LaLumiere, R. T., & McGaugh, J. L. (2005). Memory enhancement induced by post-training intrabasolateral amygdala infusions of  $\beta$ -adrenergic or muscarinic agonists requires activation of dopamine receptors: Involvement of right, but not left, basolateral amygdala. *Learning & Memory*, *12*(5), 527–532. <https://doi.org/10.1101/LM.97405>
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. In *Current Biology* (Vol. 17, Issue 20). Curr Biol. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005>
- Lisman, J., Grace, A. A., & Duzel, E. (2011). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends in Neurosciences*, *34*(10), 536–547. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.07.006>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. In *Physiological Reviews* (Vol. 84, Issue 1,

- pp. 87–136). *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
- Maquet, P., Laureys, S., Peigneux, P., Fuchs, S., Petiau, C., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Meulemans, T., Luxen, A., Franck, G., Van Der Linden, M., Smith, C., & Cleeremans, A. (2000). Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nature Neuroscience* 2000 3:8, 3(8), 831–836. <https://doi.org/10.1038/77744>
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 897–931. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2003). Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis. <Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Neuro.23.1.649>, 23, 649–711. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.23.1.649>
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2011). Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 0(SEPTEMBER), 61. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2011.00061/BIBTEX>
- Mazzola, L., Mauguière, F., & Isnard, J. (2019). Functional mapping of the human insula: Data from electrical stimulations. In *Revue Neurologique* (Vol. 175, Issue 3, pp. 150–156). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.12.003>
- McClelland, J. L., McNaughton, B. L., & O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological Review*, 102(3), 419–457. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.102.3.419>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory - A century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5451.248/ASSET/708969E9-5128-42DA-AB08-0CCB17B1BC0/ASSETS/GRAPHIC/SE0108182002.JPEG>
- McGaugh, J. L. (2004). THE AMYGDALA MODULATES THE CONSOLIDATION OF MEMORIES OF EMOTIONALLY AROUSING EXPERIENCES. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>
- Medina, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research*, 192(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2008.02.006>
- Mednick, S. C., Cai, D. J., Shuman, T., Anagnostaras, S., & Wixted, J. T. (2011). An opportunistic theory of cellular and systems consolidation. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 504–514. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.06.003>
- Meir Drexler, S., & Wolf, O. T. (2017). The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 126–134. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2016.11.008>
- Miranda, M. I., LaLumiere, R. T., Buen, T. V., Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (2003). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *European Journal of Neuroscience*, 18(9), 2605–2610. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.03008.x>
- Molero-Chamizo, A., & Rivera-Urbina, G. N. (2017). Effects of lesions in different nuclei of the amygdala on conditioned taste aversion. *Experimental Brain Research*, 235(11), 3517–3526. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-5078-1>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12931–12936. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1104495108>
- Morris, R. G. M. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience*, 23(11), 2829–2846. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2006.04888.X>
- Namkung, H., Kim, S. H., & Sawa, A. (2017). The Insula: An Underestimated Brain Area in Clinical Neuroscience, Psychiatry, and Neurology. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 40, Issue 4, pp. 200–207). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.02.002>

- Nasser, H. M., Lafferty, D. S., Lesser, E. N., Bacharach, S. Z., & Calu, D. J. (2018). Disconnection of basolateral amygdala and insular cortex disrupts conditioned approach in Pavlovian lever autoshaping. *Neurobiology of Learning and Memory*, *147*, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.11.010>
- Norman, K. A., Newman, E. L., & Detre, G. (2007). A Neural Network Model of Retrieval-Induced Forgetting. *Psychological Review*, *114*(4), 887–953. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.114.4.887>
- Olucha-Bordonau, F. E., Fortes-Marco, L., Otero-García, M., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2015). Amygdala: Structure and Function. *The Rat Nervous System: Fourth Edition*, 441–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00018-8>
- Osorio-Gómez, D., Bermúdez-Rattoni, F., & Guzmán-Ramos, K. (2019). Artificial taste avoidance memory induced by coactivation of NMDA and  $\beta$ -adrenergic receptors in the amygdala. *Behavioural Brain Research*, *376*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112193>
- Panguluri, S. K., Kuwabara, N., Kang, Y., Cooper, N., & Lundy, R. F. (2012). Conditioned taste aversion dependent regulation of amygdala gene expression. *Physiology & Behavior*, *105*(4), 996–1006. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.11.001>
- Pape, H. C., & Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews*, *90*(2), 419–463. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00037.2009/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0021025350009.JPG>
- Pavlidis, C., & Winson, J. (1989). Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes. *Journal of Neuroscience*, *9*(8), 2907–2918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-08-02907.1989>
- Paxinos G.; Watson C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition - Elsevier*.
- Peigneux, P., Laureys, S., Fuchs, S., Collette, F., Perrin, F., Reggers, J., Phillips, C., Degueldre, C., Del Fiore, G., Aerts, J., Luxen, A., & Maquet, P. (2004). Are Spatial Memories Strengthened in the Human Hippocampus during Slow Wave Sleep? *Neuron*, *44*(3), 535–545. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2004.10.007>
- Pelletier, J. G., Likhtik, E., Filali, M., & Paré, D. (2005). Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: Implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning & Memory*, *12*(2), 96–102. <https://doi.org/10.1101/LM.88605>
- Peyrache, A., Khamassi, M., Benchenane, K., Wiener, S. I., & Battaglia, F. P. (2009). Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. *Nature Neuroscience* *2009* *12*:7, *12*(7), 919–926. <https://doi.org/10.1038/nn.2337>
- Qin, X., Liu, X. X., Wang, Y., Wang, D., Song, Y., Zou, J. X., Pan, H. Q., Zhai, X. Z., Zhang, Y. M., Zhang, Y. B., Hu, P., & Zhang, W. H. (2021). Early life stress induces anxiety-like behavior during adulthood through dysregulation of neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Life Sciences*, *285*, 119959. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119959>
- Rabin, B. M., & Hunt, W. A. (1986). Mechanisms of radiation-induced conditioned taste aversion learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *10*(1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(86\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0149-7634(86)90033-3)
- Redondo, R. L., Okuno, H., Spooner, P. A., Frenguelli, B. G., Bito, H., & Morris, R. G. M. (2010). Synaptic Tagging and Capture: Differential Role of Distinct Calcium/Calmodulin Kinases in Protein Synthesis-Dependent Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience*, *30*(14), 4981–4989. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3140-09.2010>
- Revusky, S., & Garcia, J. (1970). Learned Associations Over Long Delays. *Psychology of Learning and Motivation - Advances in Research and Theory*, *4*(C), 1–84. [https://doi.org/10.1016/S0079-7421\(08\)60429-6](https://doi.org/10.1016/S0079-7421(08)60429-6)
- Riedel, G., & Micheau, J. (1999). Introduction: molecular mechanisms of memory formation — from receptor activation to synaptic changes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* *1999* *55*:4, *55*(4), 521–524. <https://doi.org/10.1007/S000180050310>

- Rodríguez-Blanco, L. A., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2019). Consolidation of an aversive taste memory requires two rounds of transcriptional and epigenetic regulation in the insular cortex. *Behavioural Brain Research*, 356, 371–374. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2018.09.009>
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.014>
- Rollins, B. L., Stines, S. G., McGuire, H. B., & King, B. M. (2001). Effects of amygdala lesions on body weight, conditioned taste aversion, and neophobia. *Physiology and Behavior*, 72(5), 735–742. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00433-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00433-4)
- Rolls, E. T. (2016). Functions of the anterior insula in taste, autonomic, and related functions. *Brain and Cognition*, 110, 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2015.07.002>
- Sajikumar, S., Navakkode, S., & Frey, J. U. (2007). Identification of Compartment- and Process-Specific Molecules Required for “Synaptic Tagging” during Long-Term Potentiation and Long-Term Depression in Hippocampal CA1. *Journal of Neuroscience*, 27(19), 5068–5080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4940-06.2007>
- Samanta, A., Alonso, A., & Genzel, L. (2020). Memory reactivations and consolidation: considering neuromodulators across wake and sleep. *Current Opinion in Physiology*, 15, 120–127. <https://doi.org/10.1016/J.COPHYS.2020.01.003>
- Sara, S. J. (2016). Mechanisms of memory: Overview. In *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* (pp. 1–4). Elsevier Science Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21094-8>
- Schapiro, A. C., McDevitt, E. A., Rogers, T. T., Mednick, S. C., & Norman, K. A. (2018). Human hippocampal replay during rest prioritizes weakly learned information and predicts memory performance. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06213-1>
- Schiller, D., Monfils, M. H., Raio, C. M., Johnson, D. C., Ledoux, J. E., & Phelps, E. A. (2009). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* 2009 463:7277, 463(7277), 49–53. <https://doi.org/10.1038/nature08637>
- Schlichting, M. L., & Preston, A. R. (2014). Memory reactivation during rest supports upcoming learning of related content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(44), 15845–15850. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1404396111>
- Schuck, N. W., & Niv, Y. (2019). Sequential replay of nonspatial task states in the human hippocampus. *Science*, 364(6447). [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW5181/SUPPL\\_FILE/AAW5181-SCHUCK-SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW5181/SUPPL_FILE/AAW5181-SCHUCK-SM.PDF)
- Schwabe, L., Nader, K., & Pruessner, J. C. (2013).  $\beta$ -Adrenergic blockade during reactivation reduces the subjective feeling of remembering associated with emotional episodic memories. *Biological Psychology*, 92(2), 227–232. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCHO.2012.10.003>
- Scott, K. (2005). Taste recognition: Food for thought. In *Neuron* (Vol. 48, Issue 3, pp. 455–464). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.015>
- Shires, K. L., Da Silva, B. M., Hawthorne, J. P., Morris, R. G. M., & Martin, S. J. (2012). Synaptic tagging and capture in the living rat. *Nature Communications* 2012 3:1, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms2250>
- Skeberdis, V. A., Chevaleyre, V., Lau, C. G., Goldberg, J. H., Pettit, D. L., Suadicani, S. O., Lin, Y., Bennett, M. V. L., Yuste, R., Castillo, P. E., & Zukin, R. S. (2006). Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 2006 9:4, 9(4), 501–510. <https://doi.org/10.1038/nn1664>
- Slipcuk, L., Bekinshtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2009). BDNF Activates mTOR to Regulate GluR1 Expression Required for Memory Formation. *PLOS ONE*, 4(6), e6007. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006007>
- Smith, W. B., Starck, S. R., Roberts, R. W., & Schuman, E. M. (2005). Dopaminergic Stimulation of

- Local Protein Synthesis Enhances Surface Expression of GluR1 and Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons. *Neuron*, 45(5), 765–779. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.01.015>
- Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a021766. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021766>
- Straube, T., & Frey, J. U. (2003). Involvement of  $\beta$ -adrenergic receptors in protein synthesis-dependent late long-term potentiation (LTP) in the dentate gyrus of freely moving rats: the critical role of the LTP induction strength. *Neuroscience*, 119(2), 473–479. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00151-9)
- Tambini, A., & Davachi, L. (2013). Persistence of hippocampal multivoxel patterns into postencoding rest is related to memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19591–19596. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1308499110>
- Tambini, A., & Davachi, L. (2019). Awake Reactivation of Prior Experiences Consolidates Memories and Biases Cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, 23(10), 876–890. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2019.07.008>
- Tang, W., Shin, J. D., Frank, L. M., & Jadhav, S. P. (2017). Hippocampal-Prefrontal Reactivation during Learning Is Stronger in Awake Compared with Sleep States. *Journal of Neuroscience*, 37(49), 11789–11805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2291-17.2017>
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, 87(5), 918–931. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.08.002>
- Varma, S., Daselaar, S. M., Kessels, R. P. C., & Takashima, A. (2018). Promotion and suppression of autobiographical thinking differentially affect episodic memory consolidation. *PLOS ONE*, 13(8), e0201780. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0201780>
- Varma, S., Takashima, A., Krewinkel, S., van Kooten, M., Fu, L., Medendorp, W. P., Kessels, R. P. C., & Daselaar, S. M. (2017). Non-interfering effects of active post-encoding tasks on episodic memory consolidation in humans. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 54. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2017.00054/BIBTEX>
- Viola, H., Ballarini, F., Martínez, M. C., & Moncada, D. (2014). The Tagging and Capture Hypothesis from Synapse to Memory. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 122, 391–423. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00013-1>
- Vishnoi, S., Naseem, M., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2018). Behavioral tagging: Plausible involvement of PKM $\zeta$ , Arc and role of neurotransmitter receptor systems. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 94, 210–218. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2018.07.009>
- Vishnoi, S., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2016). Behavioral tagging: A novel model for studying long-term memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 361–369. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2016.05.017>
- Watson, J. B., & Rayner, R. (1920). Conditioned emotional reactions. *Journal of Experimental Psychology*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.1037/H0069608>
- Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H. P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 205–213. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00302-3)
- Wilson, M. A., & McNaughton, B. L. (1994). Reactivation of Hippocampal Ensemble Memories During Sleep. *Science*, 265(5172), 676–679. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8036517>
- Xiao, Q., Xu, X., & Tu, J. (2020). Chronic optogenetic manipulation of basolateral amygdala astrocytes rescues stress-induced anxiety. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), 657–664. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.09.106>
- Yamamoto, T., Fujimoto, Y., Shimura, T., & Sakai, N. (1995). Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neuroscience Research*, 22(1), 31–49. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00875-T](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00875-T)
- Yasoshima, Y., Morimoto, T., & Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic

- glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Research*, 869(1–2), 15–24.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02397-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02397-0)
- Yiannakas, A., Kolatt Chandran, S., Kayyal, H., Gould, N., Khamaisy, M., & Rosenblum, K. (2021). Parvalbumin interneuron inhibition onto anterior insula neurons projecting to the basolateral amygdala drives aversive taste memory retrieval. *Current Biology*, 31(13), 2770-2784.e6.  
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2021.04.010>
- Yoshii, T., Hosokawa, H., & Matsuo, N. (2017). Pharmacogenetic reactivation of the original engram evokes an extinguished fear memory. *Neuropharmacology*, 113, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.09.012>
- Zhang, W. H., Zhang, J. Y., Holmes, A., & Pan, B. X. (2021). Amygdala Circuit Substrates for Stress Adaptation and Adversity. *Biological Psychiatry*, 89(9), 847–856.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2020.12.026>