BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TITULO DE LA TESIS

PARTICIPACION DEL SISTEMA HISTAMINERGICO EN LA FORMACION Y EVOCACION DE LA MEMORIA GUSTATIVA BAJO ESQUEMAS CON O SIN PRIVACIÓN DE LÍQUIDOS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

RAUL SANCHEZ HERNANDEZ

ASESORA DE TESIS

DRA. MARIA ISABEL MIRANDA SAUCEDO

Puebla, Pue. **Enero, 2016.**

Índice

Agradecimientos

Resumen

I. INTRODUCCIÓN

II. ANTECEDENTES

Percepción de los sabores

Procesamiento central del gusto

Memoria y aprendizaje

Clasificación de la memoria

Memoria del sabor

Modelos de estudio

Motivación

Motivación y aprendizaje: sed y hambre como reguladores de aprendizaje

Anatomía funcional de la corteza insular

Histamina: metabolismo y distribución

Receptores histaminérgicos

Histamina, memoria y aprendizaje

III JUSTIFICACIÓN

IV. HIPÓTESIS

V. OBJETIVOS

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Caracterización de protocolos

CAS sin privación de agua

Registro de consumos basales

Establecimiento del horario para el cas

Condicionamiento aversivo al sabor

Grupos farmacológicos

Cirugía

Inyecciones intracerebrales

Condicionamiento aversivo al sabor

Histología

VII. RESULTADOS

Análisis histológico

Análisis estadístico

VIII. DISCUSIÓN

IX. CONCLUSIONES

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Agradecimientos

A la Dra. María Isabel Miranda Saucedo por la extraordinaria oportunidad de trabajar en el laboratorio a su cargo, por su confianza depositada en mí, el tiempo y los conocimientos compartidos, así como su paciencia. Sobre todo agradecer el trato que siempre tuvo conmigo, su comprensión y apoyo.

A mi familia por darme siempre su apoyo incondicional, por creer en mí y en mi trabajo. A mi madre, por todo su amor y confianza. A mi padre, por enseñarme que de la vida siempre se aprende. A ambos les agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí, gracias a ustedes existo y sé que siempre estarán para mí. Agradecerles por haberme dado la oportunidad de estudiar biología (a pesar de no estar convencidos), por siempre alentarme a seguir mis sueños, a volar alto pero con mis valores bien cimentados.

A mi hermana, por esas veces que pusiste una sonrisa en mi rostro cuando me sentía triste lejos de casa, por preocuparte por mí y presumir a tus amigos a tu hermano biólogo. Gracias por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores

A mis abuelitos Angelita, Juanita, Manuel y Raúl, a mis tíos y tías, primos y primas, gracias por todo lo que me han brindado, por todas sus enseñanzas, sus consejos, por su amor… Gracias hoy y siempre.

Al gran equipo de trabajo del laboratorio “Neuroquímica de la memoria”: Gabriela Vera, Alejandro Rangel, Gabriela Rodríguez y Seraid Caynas, siempre recordaré con alegría los días que compartí con todos ustedes dentro y fuera del laboratorio. Gracias por su ayuda, su tiempo y paciencia al enseñarme las técnicas que necesitaría en mi tesis y algunas otras más, por sus consejos, su compañerismo, gracias por hacerme sentir un miembro más del lab B-14.

A mi amiga y colega Mariana Vergel Munguía, aunque en un inicio no sabía que trabajaríamos en el mismo laboratorio, fue una gran fortuna el compartir ésta experiencia contigo. Durante nuestra estancia en el INB tuvimos muchas

experiencias alegres y otras no tanto, pero siempre estuviste ahí apoyándome, ya fuera con las cánulas o con el sushi me alegró tener una amiga cerca. Gracias por todo lo que compartiste conmigo.

A la Dra. Ilse Delint, Daniela Fragoso, Estephanía García, María José Olvera y Dennys Badillo, con quienes pude compartir un tiempo breve pero muy significativo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos que durante mi estancia en la universidad me brindaron su apoyo, permitiendo que pudiera seguir adelante y concluir mis estudios, especialmente a Brenda, Alan, Karina, Armando, Marta, Eduardo, Sol, Diego, Margarita, Luis y Diana.

Agradezco al MVZ. Martín García Servin, responsable del bioterio del INB, a la M. en C. Leonor Casanova Rico, jefa de la Unidad de Enseñanza y a la Lic. Lourdes Lara, del área de videoconferencia.

Así también sobre el apoyo que recibí para realizar el proyecto CONACYT 152208. PAPIIT IN220991, PAPIIT IN204615.

Resumen

El reconocer un sabor es posible gracias al aprendizaje, el cual permite el almacenamiento de información acerca del sabor y del contexto de su consumo, que puede ser usado como guía en la ingesta futura de alimento. La memoria del sabor en términos de adaptación evolutiva es necesaria para la adecuada identificación de los alimentos disponibles en el ambiente. Diversos experimentos que emplean modelos de aprendizaje en ratas y otras especies animales señalan varias etapas en la formación y/o evocación de la memoria y apoyan el papel de la histamina en los mecanismos fisiológicos de formación de la memoria. En el laboratorio los modelos experimentales comúnmente utilizados para el estudio de la formación de la memoria gustativa son; el aprendizaje apetitivo o de preferencia y el aprendizaje aversivo, sin embargo ambos modelos de estudio requieren que los sujetos experimentales estén privados de líquidos por largos periodos de tiempo (incluso 24 horas), lo que modifica las conductas de motivación de los sujetos que en otras condiciones no se verían forzados a realizar éstas conductas. De tal forma, resulta de importancia la implementación de un protocolo donde los sujetos no estén privados de líquidos y así comparar los efectos de la privación, de la saciedad sobre la motivación y su impacto en el estado anímico y metabólico durante el aprendizaje y la formación de la memoria.

I. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento de un sabor novedoso es una respuesta instintiva, parte de un repertorio conductual innato que posteriormente puede incluir procesos cerebrales para recordar experiencias pasadas donde el sabor de un alimento fue asociado con las consecuencias de su ingesta. Por lo tanto, se puede decir que el reconocimiento de un sabor resulta del aprendizaje, el cual permite el almacenamiento de información acerca del sabor y del contexto de su consumo, que puede ser usado como guía en la ingesta futura de alimento (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

Estudios han demostrado que el procesamiento de un estímulo gustativo es muy complejo, porque la codificación del sabor abarca tanto el valor hedónico inmediato así como la propia experiencia con el sabor percibido (Purón-Sierra *et al*., 2014).

La memoria gustativa permite el reconocimiento del sabor, involucrando tanto el gusto como el olor, así también las diferentes características relacionadas con su valor hedónico, grado de familiaridad, y las características nutritivas o tóxicas asociadas con el sabor que, en términos de adaptación evolutiva, son necesarios para la adecuada identificación de alimentos, y por lo tanto ayudar a determinar la probabilidad de supervivencia y reproducción (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

Evidencia acumulada en años recientes ha permitido establecer claramente que la histamina, como un neurotransmisor clásico en el sistema nervioso central está involucrada en procesos cognitivos de alto orden. Numerosos experimentos utilizando diferentes modelos de aprendizaje en ratas y otras especies animales señalan el papel de la histamina en los mecanismos fisiológicos de la memoria, así como en las etapas de la formación y/o recuperación de la memoria (Seagel *et al.,* 2006).

Por otra parte, el estudio científico de la conducta dio un importante paso cuando el concepto de motivación (algunas veces llamada conducta instintiva, conducta impulsiva o auto-regulatoria) fue ampliamente aceptado. Es importante entender por qué, de todas las muchas posibles conductas en un contexto dado, los animales usualmente realizan solo unas cuantas o solo una. Además, animales en un contexto específico realizan una acción y, en otro tiempo en el mismo contexto exacto, realizan otra acción que a veces puede ser opuesta a la primera. La motivación puede ser afectada por el estado interno del animal, y como otras teorías han sugerido, la excitación o la energización de la conducta es un componente central de la motivación (Torrealba *et al*., 2012).

La importancia de comprender los mecanismos complejos durante la formación de la memoria y aprendizaje, así como las variables motivacionales y conductuales en dichos procesos, haciendo énfasis en los modelos de estudio que se emplean en el laboratorio, son los factores que llevan a la realización del siguiente trabajo.

II. ANTECEDENTES

A través del cerebro continuamente se procesa información proveniente de una gran variedad de receptores corporales que registran procesos y estados fisiológicos. En pocas palabras, logramos percibir y estar conscientes de variadas sensaciones del cuerpo, como el frío, el calor, el prurito, el dolor, el cansancio muscular, etc., o de sensaciones imprecisas que se originan en la región pectoral, estomacal y las vísceras, como son la falta de aire, el hambre o malestar gastrointestinal, como algunos ejemplos (Craig, 2002).

Debido a que el consumo de alimentos es una conducta que requiere de la retroalimentación de los cambios ocurridos en el cuerpo, cada vez está más claro que el sistema interoceptivo es un componente indispensable durante la alimentación para procesar la información homeostática y su impacto emocional. El consumir alimentos podría parecer una tarea común que se lleva a cabo debido a la sensación de hambre o sed, cuya respuesta debería ser buscar la saciedad a dichas sensaciones, sin embargo dentro de ésta conducta se despliega una variedad de procesos fisiológicos y cognitivos (como la memoria, la toma de decisiones, etc.), cuyo objetivo es mantener un balance de los requerimientos del organismo para tener un correcto funcionamiento (Miranda, 2012).

Percepción de los sabores

El sentido del gusto transmite al cerebro la naturaleza química de la gran variedad de sustancias con las que nos alimentamos (Miranda, 2012).

Cuando una sustancia entra en contacto con el sentido del gusto de inmediato se realiza un reconocimiento del sabor, esto es posible gracias a que el gusto y el olfato permiten clasificar las propiedades de dicha sustancia a una o más modalidades gustativas.

De manera primordial, el sentido del gusto identifica las categorías básicas del sabor en las sustancias: *dulce, salado, amargo, ácido y umami*. La percepción específica y altamente eficiente de todas estas modalidades gustativas básicas se logra al detectar las moléculas que las caracterizan; por ejemplo, lo dulce con carbohidratos: lo salado con iones y minerales; lo amargo con alcaloides, lo ácido con ácidos, y lo umami con los aminoácidos de las proteínas, todos ellos contenidos en diferentes concentraciones en cada alimento (Miranda, 2012).

Procesamiento central del gusto

El reconocimiento de un sabor va más allá de la codificación de las diferentes modalidades básicas del sentido del gusto, la respuesta activa de neuronas permite una integración de la información de manera más amplia y compleja, ya que al mismo tiempo dicha información necesita ser evaluada, comparada y catalogada. De este modo, la activación de las diferentes regiones que comprenden la ruta central del sabor donde se procesan e integran aspectos más complejos, permite procesar de forma paralela la nueva información y compararla con la adquirida previamente (Miranda *et al.*, 2011).

Se han estudiado desde diferentes enfoques las vías neuronales por las cuales se transmiten las señales del sabor así como las sensaciones viscerales, que son relevantes para la formación de la memoria gustativa, sin embargo, de manera general se considera que el núcleo del tracto solitario, núcleo parabraqueal, núcleo basal magnocelular, la amígdala y la corteza insular son áreas que tienen una función esencial para el procesamiento del sabor y durante la formación de la memoria gustativa (figura 1), aunque la lista sigue en aumento al realizarse más investigaciones (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

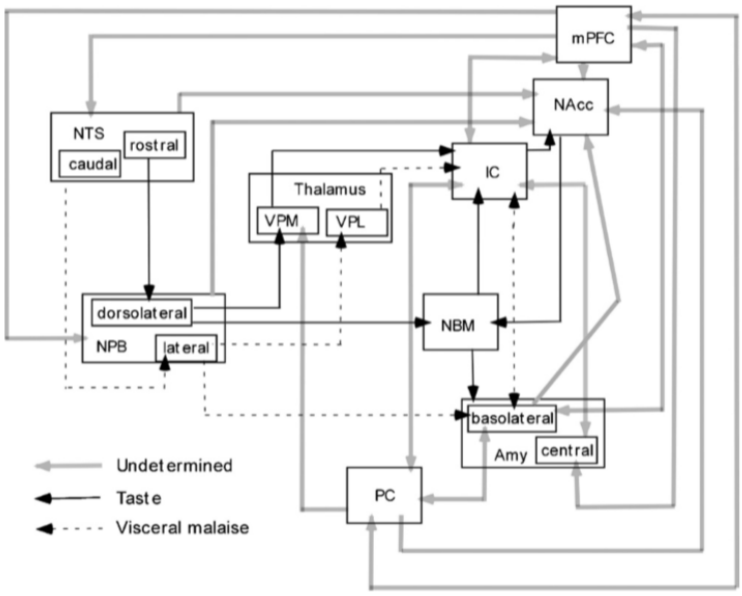

Figura 1. Vías neuronales estudiadas en diferentes modelos animales que están involucradas en el procesamiento del sabor y de estímulos viscerales durante la formación de la memoria gustativa, así como otras vías neuronales cuyo papel aún no se ha determinado pero que se piensa podrían participar, dada la importancia de las estructuras cerebrales. Amy, amígdala; PC, corteza perirrinal; NPB, núcleo parabraqueal; NBM, núcleo basal magnocelular; Thalamus, tálamo; IC, corteza insular; NAcc, núcleo accumbens; mPFC, corteza prefrontal media; NTS, núcleo del tracto solitario (modificado de Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

La ruta de procesamiento del sabor en el sistema nervioso central se logra gracias a la actividad de diversos neurotransmisores en diferentes áreas cerebrales (figura 2), que permiten el procesamiento de los estímulos percibidos a través de los órganos periféricos y a través de los nervios facial, glosofaríngeo y vago, posteriormente a las distintas regiones centrales cerebrales (Yamamoto *et al.*, 1994).

Cuando los nervios facial, glosofaríngeo y vago son activados ante un sabor éstos transmiten mediante proyecciones neuronales hacia la parte rostral del núcleo del tracto solitario, el cual es el primer relevo central sináptico para la transmisión de la información gustativa. Cabe mencionar que el núcleo del tracto solitario también recibe proyecciones desde el núcleo central de la amígdala (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

Posteriormente las neuronas activadas en el núcleo del tracto solitario proyectan ipsilateralmente a las neuronas del núcleo parabraqueal el cual es el siguiente punto de relevo en la vía. El núcleo parabraqueal tiene un rol importante en la formación de la memoria aversiva al sabor, ya que es una de las áreas centrales donde la memoria gustativa interactúa con las señales de malestar visceral. El núcleo parabraqueal se comunica a la vez con el hipotálamo, la amígdala, la corteza insular, entre otros (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

La amígdala está involucrada en el procesamiento de las emociones y tiene un rol importante en la modulación de la formación de la memoria. Es una estructura fundamental encargada de procesar el valor hedónico y aversivo, no sólo de lo que se come, sino también de una gran gama de experiencias. La activación de las neuronas de la amígdala desencadena a su vez la activación de otras estructuras, incluyendo varias regiones corticales que almacenan la información a largo plazo, en otras palabras se encargan de modular la consolidación de la memoria del sabor (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

Finalmente, la corteza insular (que incluye a la corteza gustativa), funciona como una estructura integradora; ya que sus neuronas son capaces de responder a diferentes modalidades gustativas, así como a la temperatura, tacto, dolor y al estado visceral (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

La corteza insular se encuentra conectada con diferentes sistemas de neurotransmisión los cuales son capaces de liberar neurotransmisores como histamina, ácido gamma-aminobutírico, acetilcolina y glutamato; tiene conexiones en ambos sentidos con la amígdala, aferencias desde el núcleo basal magnocelular y el tálamo, conexiones con el núcleo parabraqueal y eferencias hacia el núcleo del tracto solitario. Por lo anterior se considera que la corteza insular es una estructura fundamental para la memoria gustativa, tanto aversiva como apetitiva, ya que estudios han demostrado que si se inactiva temporalmente, o se realizan lesiones en ésta área los procesos de adquisición y evocación se ven afectados durante el entrenamiento al CAS (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

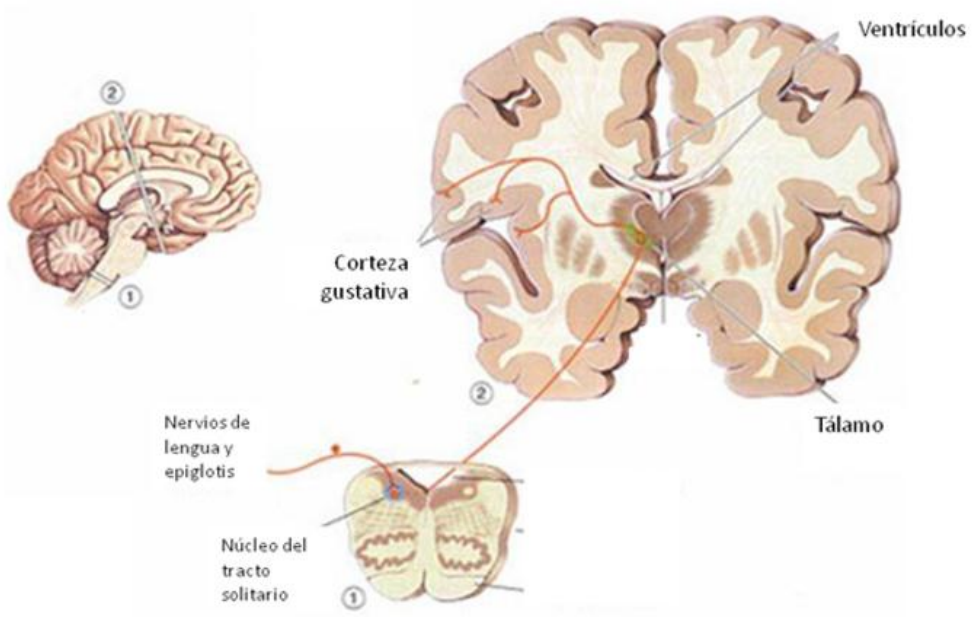

Figura 2. Rutas centrales del sabor en el cerebro humano activadas a partir del núcleo del tracto solitario el cual proyecta a regiones centrales, que incluyen el tálamo, la amígdala y la corteza insular, entre las principales (modificado de Miranda *et al.,* 2011).

Memoria y aprendizaje

El aprendizaje y la memoria son procesos complejos y fundamentales para la supervivencia del individuo, ambos están estrechamente relacionados ya que al tener una experiencia nueva la información que se puede obtener es “aprendida” y luego repetida gracias a que fue “recordada”.

Por definición el aprendizaje es la adquisición de nueva información, mientras que la memoria es el proceso por el cual la información derivada de una experiencia persiste a través del tiempo (Kandel *et al*., 2001).

La memoria es la representación interna de nuestras experiencias. El proceso para lograr la formación de dichas representaciones comprende varias fases (Kandel *et al*., 2001).

1) *Adquisición*. Es el proceso por el cual la información percibida a través de la estimulación sensorial es traducida y representada (codificada) en el sistema nervioso.

2) *Consolidación*. Es el proceso por el cual la representación interna gradualmente pasa de un estado lábil a uno más estable; la consolidación es un estado dinpamico que cambia conforme pasa el tiempo.

3) *Evocación*. Es la recuperación de la representación de la memoria a través de recordar o ejecutar lo aprendido.

Clasificación de la memoria

Durante muchos años se han propuesto diversas clasificaciones de la memoria de acuerdo al tiempo que la información se encuentra disponible para su uso o las tareas a las que sirve e incluso el nivel de consciencia del individuo en el momento de adquirirla, registrarla o recuperarla (Romero-Bermúdez y Hernández-Garzón, 2011), sin embargo no existe una clasificación determinada ni modelos específicos contenidos en una sola clasificación.

Por lo tanto, basándose en el tiempo que dura almacenada la información adquirida, se describen dos tipos básicos: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001).

La **memoria a corto plazo** permite retener momentáneamente la información y hacer uso de ésta durante segundos mientras es mantenida en la mente. A su vez la memoria a corto plazo se puede dividir en dos tipos: sensorial o inmediata y memoria de trabajo (Purves *et al.,* 2004).

- Memoria sensorial: también llamada memoria inmediata, comprende la capacidad habitual de mantener en la mente experiencias durante fracciones de segundo. En ésta memoria se almacena la información que proviene del medio externo (sonidos, olores, imágenes, sabores, etc.) que ingresa al sistema a través de los órganos sensoriales para su reconocimiento y clasificación en base a las características físicas de los estímulos (Goio *et al.,* 2012). La capacidad de la memoria sensorial es muy amplia y cada modalidad sensitiva (visual, verbal, táctil, etc.) parece tener su propio registro de memoria. La memoria sensorial a su vez se divide en memoria icónica y memoria ecoica (Purves *et al.,* 2004).
- Memoria de trabajo. Es la capacidad para mantener en la mente la información durante segundos o minutos una vez pasado el momento presente, por lo que no forma registros duraderos, (Purves *et al.,* 2004). Éste tipo de memoria permite realizar varias actividades de manera simultánea, seleccionando, utilizando y descartando información necesaria en un instante e inútil en el siguiente (Goio *et al.,* 2012)

Por otra parte, la **memoria a largo plazo** permite la retención de la información adquirida de manera más estable para su almacenamiento durante días, semanas o incluso durante toda la vida (Purves *et al.,* 2004). Diversos estudios han demostrado que la memoria a largo plazo puede dividirse en varias categorías, por ejemplo, en base a la forma de expresar la información adquirida cuando se recupera encontramos la memoria declarativa (o explícita) y la memoria no declarativa (Goio *et al.,* 2012).

- Memoria declarativa. Se basa en una clasificación específicamente humana, ya que es la única especie que es capaz de “declarar” verbalmente a través de un lenguaje. Esta memoria contiene la información aprendida sobre los eventos, lugares y objetos (tiempo, lugar y circunstancia) y los conceptos, a la vez que dicha información es evocada de manera consciente (Goio *et al.,* 2012). En esta memoria encontramos dos subdivisiones: la memoria episódica, que se refiere a la información de

acontecimientos de la vida propia, permite recordar eventos puntuales, y la memoria semántica, donde se almacena la información que no requiere de un contexto espacio-temporal específico. (Romero-Bermúdez y Hernández-Garzón, 2011).

- Memoria no declarativa. También conocida como memoria implícita o memoria de procedimiento, implica hábitos, habilidades y asociaciones, guarda una relación con la conducta motora y se accede a ella de manera inconsciente; cabe mencionar que la gran mayoría de los modelos animales están contenidos en ésta clasificación (Goio *et al.*, 2012; Purves *et al.,* 2004).

Memoria del sabor

La memoria del sabor está incluida dentro de la clasificación según modalidad sensorial. Es una de las habilidades más importantes que los animales han desarrollado a través de la evolución para permitir el reconocimiento de un sabor nutritivo o nocivo (Bermúdez-Rattoni *et al*., 2014).

La formación de la memoria del sabor, como muchas otras memorias, requiere de la activación neuronal que induzca cambios estructurales y funcionales en los circuitos de redes neuronales. Mediante diversos estudios se ha demostrado un amplio rango de mecanismos celulares y moleculares que contribuyen a la formación de la memoria del sabor (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

A través de la conducta alimenticia se lleva a cabo la formación de la memoria del sabor, debido a que el individuo necesita evaluar la calidad, cantidad y valor hedónico del sabor del alimento basándose en una amplia variedad de sensaciones. Una vez que los atributos del estímulo han sido detectados, la memoria del sabor permite asociar los estímulos con las consecuencias post-ingesta (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

Cuando un animal encuentra un sabor novedoso en un principio duda sobre consumirlo o no, por lo que muestra un consumo reducido, es decir, tiene una

respuesta de neofobia. Sin embargo cuando el sabor nuevo no tiene consecuencias negativas después de su ingesta, pasa a ser reconocido como seguro y existe una preferencia lo que implica un incremento en su consumo, a este proceso se le conoce como atenuación de la neofobia. Por otra parte, si el sabor nuevo es asociado con un malestar, el animal lo rechazará la próxima vez que lo encuentre, desarrollando una aversión al sabor (Bermúdez-Rattoni *et al*., 2004).

El conocer las vías neuronales que están involucradas en la formación de la memoria del sabor, las diferencias entre el estímulo condicionado (sabor) y el estímulo no condicionado (respuesta visceral), entre otras características, hacen de la memoria del sabor un modelo experimental muy útil para estudiar los sustratos moleculares, celulares y anatómicos que intervienen en la formación de la memoria durante las diferentes fases que la componen (adquisición, consolidación, evocación y extinción) (Bermúdez-Rattoni *et al*., 2001).

Modelos de estudio

Cuando nos alimentamos existen reacciones naturales que pueden ser observadas e interpretadas para analizar la respuesta ante un sabor, como las secuencias de movimientos faciales al probar y consumir un determinado alimento (agrado, desagrado, etc.) así también como cuantificar su consumo (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001).

En el laboratorio son dos los modelos experimentales comúnmente utilizados para el estudio de la formación de la memoria; el aprendizaje apetitivo o de preferencia y el aprendizaje aversivo; ambos permiten estudiar cómo se procesa un estimulo gustativo novedoso durante las diferentes etapas de formación de la memoria (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

Hablamos de memoria apetitiva al sabor cuando un animal consume un sabor novedoso que no genera síntomas de malestar, lo que ocasiona posteriormente

una respuesta apetitiva en las siguientes exposiciones (por ejemplo, incrementa la conducta de búsqueda o aumenta el consumo) así como puede mostrar preferencia al sabor cuando tiene opción de escoger (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

Para estudiar la memoria aversiva al sabor se emplea el modelo de condicionamiento aversivo al sabor (CAS). El CAS es un modelo de aprendizaje asociativo donde se genera una aversión a un sabor novedoso (estímulo condicionado, EC) cuando éste es seguido de un malestar gástrico (estímulo incondicionado, EI) (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

El CAS ocurre después de un solo ensayo de asociación entre los dos estímulos y se genera incluso cuando hay un retraso de varias horas entre el consumo del alimento (EC) y la aparición del malestar visceral (EI), que puede permanecer por varias horas, días o años (figura 3). Cabe mencionar que al incrementar el intervalo de tiempo entre la presentación del sabor y el malestar visceral, el aprendizaje a la aversión tiende a disminuir gradualmente (Miranda, 2012).

El modelo de CAS aplicado en ratas es robusto y replicable, así también se puede demostrar y cuantificar mediante la presentación de un estímulo gustativo novedoso, generalmente una solución de sacarina en un porcentaje determinado, que es seguido de la administración de un agente farmacológico que provoca un malestar visceral, usualmente una inyección i.p. de LiCl (Miranda *et al*., 2003).

Ampliamente utilizado, el CAS puede tener un gran número de combinaciones entre el sabor novedoso, la vía de presentación, los tiempos de exposición e incluso el intervalo de tiempo entre la presentación del sabor novedoso y el estimulo generador de malestar, según el protocolo a seguir (Miranda, 2012).

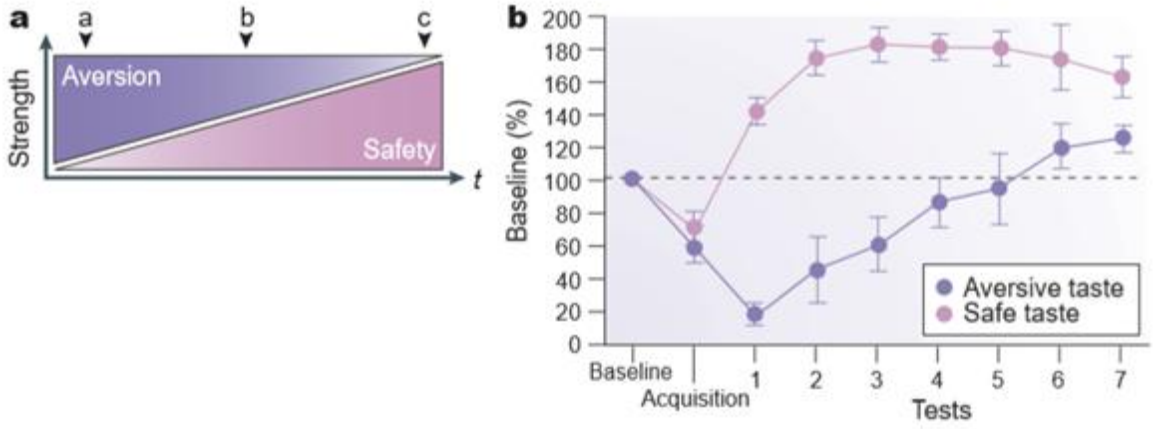

Figura 3. a | Cuando un animal ingiere una sustancia nueva que es inofensiva, gradualmente aprende que su consumo es seguro. Las flechas representan los posibles inicios del malestar. **b** | Consumo de una solución de sacarina 0,25% (expresado en porcentaje de línea base de agua) consumida durante la primera presentación (adquisición) y presentaciones posteriores. Existe una disminución en el consumo (neofobia) durante la primera presentación de sacarina. Los puntos morados representan un grupo que recibió un estímulo inductor de malestar (inyección i.p. de LiCl) 15 minutos después de la primera exposición a la sacarina, desarrollando un condicionamiento aversivo al sabor. Los puntos rosas representan a un grupo que muestra atenuación de la neofobia, ya que los animales no recibieron el LiCl (modificado de Bermúdez-Rattoni *et al.*, 2004).

Cabe señalar que los modelos de estudio previamente mencionados tienden a privar de líquidos a los sujetos de estudio por largos periodos de tiempo (incluso 24 hrs), provocando cambios en los estados motivacionales para la búsqueda de líquidos, así como procesos de atención relacionados al consumo de líquidos, que se piensa podría modificar la conducta de ingesta de los animales ya que es un parámetro fundamental en los modelos de aprendizaje y memoria del sabor.

Motivación

La palabra motivación se deriva del latín *motivus* que significa “causa del movimiento”, lo cual sugiere propiedades de activación motora para generar la conducta. Actualmente, se entiende que motivación implica a los estados internos que dirigen al organismo hacia “metas” o fines determinados y le confieren intensidad a la conducta (Escobar Briones *et al*., 2011).

Existen conductas que son básicas y esenciales para la supervivencia del individuo y por ende no deja de realizarlas a menos que enferme y/o muera; dichas conductas las organiza y realiza por tiempos (comer, beber, acicalarse, explorar o dormir), y sólo si se introducen elementos nuevos en su ambiente (otro individuo, un objeto, otra comida, etc.) emergen comportamientos distintos en respuesta a las nuevas condiciones, pero aún en estos casos las conductas básicas no desaparecen, sólo se reorganizan (Escobar Briones *et al*., 2011).

Una conducta motivada u orientada a una meta inicia por estímulos internos y externos e involucra conductas de desplazamiento hacia la meta, aumento del nivel de alertamiento (arousal en inglés) y orientación del organismo en direcciones que lo acercan o lo alejan de metas específicas (Miñana-Solis *et al*., 2009).

El dolor, el hambre, la angustia y el castigo son fuentes poderosas y comunes de motivación. Las conductas motivadas suelen ser anticipatorias y, como tales, incluyen aspectos cognitivos asociados con aprendizaje y planeación. La motivación y la anticipación pueden surgir como resultado de la expresión de relojes biológicos que le confieren orden temporal a los procesos fisiológicos y a la conducta (Escobar Briones *et al*., 2011).

La satisfacción de una necesidad (fisiológica o cognitiva) requiere que los componentes individuales de la conducta se organicen en una secuencia específica, orientada a una meta. Se sugieren tres estados secuenciales que son

comunes a una variedad de conductas adaptativas u orientadas a un objetivo determinado (Escobar Briones *et al*., 2011).

- Fase de iniciación, que puede ser inducida por deficiencias fisiológicas, señales sensoriales exteroceptivas o información cognoscitiva.
- Fase de procuración, que consiste en la excitación o alertamiento general asociado con la ejecución de conductas de desplazamiento, la información sensorial exteroceptiva, la utilización de experiencias pasadas (aprendizaje y las respuestas viscerales que regulan los procesos homestáticos.
- Fase consumatoria, que incluye la realización de respuestas motoras preprogramadas (como lamer, masticar y deglutir, en la conducta de ingesta), la retroalimentación sensorial (como gusto y olfato), los mecanismos de saciedad que están involucrados en la terminación de la respuesta, al igual que de reforzamiento, que predispone la conducta futura del animal dependiendo de las consecuencias de las respuestas pasadas.

Estudiar los estados de motivación y sus mecanismos implica ciertas limitaciones, ya que no es posible observar la “motivación” de manera directa o aislada, sino que debe inferirse a partir de cambios en la conducta asociados con estímulos internos o externos y con procesos de aprendizaje. Asimismo, la diversidad en la expresión de la conducta impone una enorme dificultad para determinar las causas y los niveles internos de motivación (Hebb, 1995).

Motivación y aprendizaje: sed y hambre como reguladores de aprendizaje

Una conducta alimenticia apropiada es esencial para la supervivencia de los animales, ésta conducta debe estar coordinada con las condiciones ambientales, tales como el ciclo luz-oscuridad y la disponibilidad del alimento, así como los requerimientos fisiológicos internos, como son mantener las funciones gastrointestinales y balance energético (Anne-Marie Poulin *et al.,* 2008).

La ingesta de alimentos y líquidos es esencial para que los animales obtengan los nutrientes adecuados y rechacen aquellos que contengan toxinas; sin embargo, cuando su disponibilidad está restringida a un horario de pocas horas en un tiempo determinado durante el día, los animales desarrollan un ritmo circadiano de entrenamiento alimenticio (Mendoza J. *et al*., 2005).

Las ratas mantenidas en horarios de alimentación restringidos muestran el comportamiento llamado “actividad alimenticia anticipada” que se manifiesta dentro de las horas precedentes al acceso al alimento por la alerta y un incremento en la exploración así como la locomoción de forrajeo (Anne-Marie Poulin et al., 2008). También, los animales que se encuentran bajo horarios de alimentación restringidos están expuestos a una alternancia de intervalos de comida y ayuno (que pueden ir de mayor a menor tiempo), lo que les lleva a un estado catabólico crónico, y en dichas condiciones tienden a desarrollar un estado de excitación producido por el alimento; el aprendizaje al igual que los reforzadores (alimento) permiten que estas conductas permanezcan aún cuando los animales no están privados de alimentos (Anne-Marie Poulin et al., 2008).

Anatomía funcional de la corteza insular

La corteza insular (o isla de Reil) forma parte de la neocorteza, en roedores, primates y humanos está ubicada lateralmente en el lóbulo temporal, también se conoce como el “quinto lóbulo escondido” ya que se localiza en lo profundo de la fisura de Silvio (Moraga-Amaro *et al.,* 2014).

De manera particular en roedores la corteza insular (CI) se encuentra a lo largo de la unión del surco rinal y la arteria cerebral media; en dirección rostro-caudal abarca desde la corteza frontal lateral hasta la corteza peririnal, y de manera dorso-ventral ocupa desde la corteza somatomotriz hasta la corteza piriniforme (Bermúdez-Rattoni, 2014; Paxinos, 1995). En la modelo de rata las coordenadas

son: antero-posterior +1.7 mm, +1.00 y -0.40 mm respectivamente con respecto de Bregma (Paxinos, 1995; Paxinos y Watson, 1998).

La corteza insular a su vez ha sido dividida en tres áreas principales: el área granular dorsal, el área disgranular medial y el área agranular ventral (figura 4). El área granular está relacionada con las áreas corticales que procesan los estímulos viscerales, el área disgranular corresponde a la integración de las modalidades gustativas y finalmente se ha relacionado al área agranular con la integración multimodal autonómica y límbica; en ratas la corteza principal de percepción gustativa se encuentra en el área disgranular (Bermúdez-Rattoni, 2014).

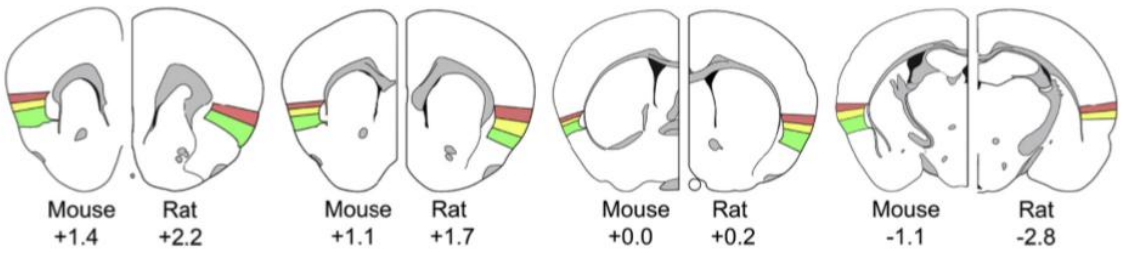

Figura 4. Representación de secciones coronales de ratón (izquierda) y rata (derecha) en diferentes cortes antero-posterior desde Bregma tomada como cero. En color rojo área granular; amarillo, área disgranular y verde área agranular (modificado de Bermúdez-Rattoni, 2014).

La conectividad de la corteza insular involucra varios sistemas de neurotransmisión, neuronas o terminales neuronales que son capaces de liberar GABA, ACh y glutamato, entre otros; tiene conexiones en ambos sentidos con la amígdala, aferencias desde el NBM y el tálamo, conexiones con el NPB y eferencias hacia el NTS. (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

De igual forma, las múltiples conexiones anatómicas de la corteza insular hacen que dicha región tenga un papel importante en la mediación de reacciones viscerales debido a las distintas modalidades de información que recibe (Bermúdez-Rattoni, 2014).

Se ha encontrado que el consumo de un sabor novedoso induce un incremento en la expresión de c-Fos en la CI, un nivel mayor comparado con la expresión inducida por un sabor familiar y lo mismo ocurre cuando se realiza un CAS con un sabor nuevo en comparación con un sabor familiar (Núñez-Jaramillo *et al*., 2010).

Por lo anterior se considera que la corteza insular es una estructura fundamental para la memoria gustativa, tanto aversiva como apetitiva, ya que estudios han demostrado que si se inactiva temporalmente, o se realizan lesiones en ésta área los procesos de adquisición y evocación se ven afectados durante el entrenamiento al CAS. (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010).

Histamina: metabolismo y distribución

La histamina es un mediador de diversos procesos fisiológicos y patológicos dentro y fuera del sistema nervioso y cuya existencia se conoce desde hace aproximadamente 50 años. Tiene un papel como estimulante endógeno de la secreción gástrica, asimismo la liberación de histamina está involucrada en la patogénesis de varias reacciones inflamatorias y en la regulación de la respuesta inmune al ser liberada por los mastocitos y basófilos, los cuales son las principales reservas celulares de histamina en los tejidos periféricos (Siegel *et al*., 2006).

En el sistema nervioso central la histamina también actúa como neurotransmisor clásico al ser liberado por neuronas histaminérgicas. Los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas están localizados exclusivamente en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior donde sus axones se proyectan de una forma divergente hacia múltiples áreas cerebrales que incluyen el hipotálamo, el tálamo, la corteza cerebral, la amígdala y el *septum pellucidum* (Beghdadi *et al.,* 2009).

La histamina es metabolizada por dos vías (figura 5), la primera es la oxidación, que se realiza por la diamino oxidasa, llevando a la histamina a ácido imidazol-acético; por otra parte la transmetilación, que es efectuada por la N-metiltransferasa, produciendo tele-metilhistamina (Arrang, 2007; Siegel *et al*., 2006).

Figura 5. Síntesis y metabolismo de histamina. Las flechas continuas indican la vía de formación y catabolismo de histamina en el cerebro, mientras que las flechas punteadas muestran vías adicionales que pueden ocurrir fuera del sistema nervioso: HDC, histidina descarboxilasa; HMT, histamina metiltransferasa; DAO, diamino oxidasa; MAO, monoamino oxidasa. En paréntesis se muestran aldehídos intermedios que han sido hipotetizados pero no aislados (modificado de Siegel *et al*., 2006).

La biosíntesis de histamina en el cerebro (figura 6) comprende dos pasos básicos: el transporte dentro de las células del precursor L-histidina y su procesamiento por la enzima histidina descarboxilasa; posteriormente la histamina que es sintetizada en el interior de las neuronas es transportada a vesículas por el transportador vesicular de monoaminas y liberada en las terminaciones sinápticas de las neuronas histaminérgicas (Arrang, 2007).

Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha observado que existe una mayor actividad de histidina descarboxilasa en el hipotálamo, mientras que se han encontrado niveles menores en el cerebelo y otras áreas del telencéfalo (Arrang, 2007).

En el cerebro de la rata, el núcleo tuberomamilar consta de un aproximado de 2000 neuronas histaminérgicas (Ericson *et al.,* 1987), mientras que en humanos se ha descrito una organización similar, excepto que el número de neuronas histaminérgicas es mayor (~64000) y ocupan una proporción más larga en el hipotálamo (Airaksinen *et al.,* 1991).

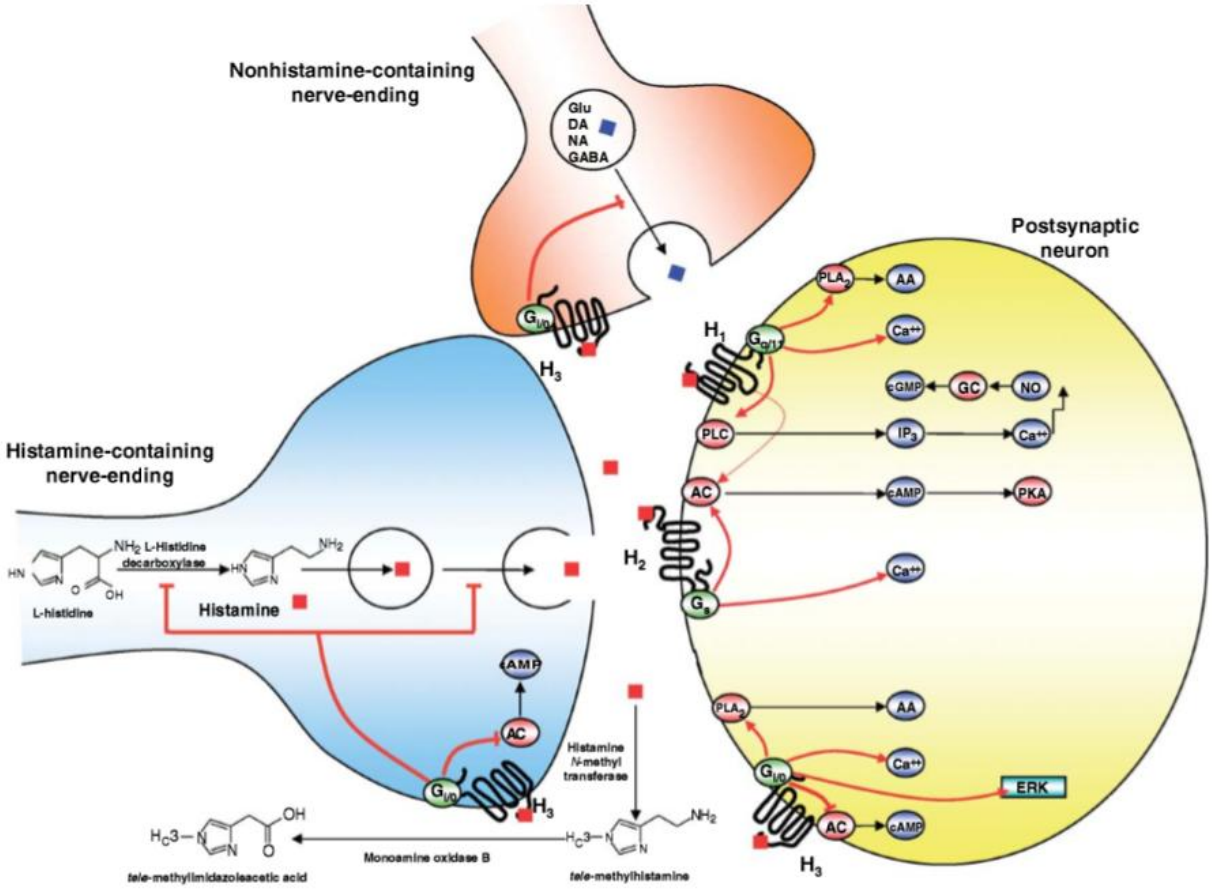

Figura 6. Metabolismo de histamina y señalamiento en el cerebro. AA, ácido araquidónico; AC, adenilato ciclasa; DA, dopamina; ERK, quinasa relacionada a señalamiento extracelular; GABA, ácido γ-aminobutírico; GC, guanilato ciclasa; Glu, glutamato; IP_3, inositol-1,4,5-trifosfato; NA, noradrenalina; PKA, proteína cinasa A; PLA_2, fosfolipasa A_2; PLC, fosfolipasa C; NO, óxido nítrico (modificado de Arrang, 2007)

Receptores histaminérgicos

Se han encontrado cuatro subtipos de receptores a histamina: H_1, H_2, H_3 y H_4; sin embargo sólo los 3 primeros se consideran participes en la actividad cerebral, ya que el cuarto receptor tiende a mostrar niveles muy bajos o nulos en el cerebro, caso contrario a lo observado en tejidos hematopoyéticos y diferentes líneas celulares fuera del sistema nervioso central donde se han encontrado altos niveles de expresión de dicho receptor (figura 7). Todos pertenecen a la superfamilia de receptores metabotrópicos con 7 dominios transmembranales acoplados a proteína G, (Arrang, 2007; Beghdadi *et al.,* 2009).

- **Receptor H_1.** Principalmente media las respuestas excitatorias en el cerebro como la despolarización de la membrana y/o un incremento en la frecuencia de disparo de muchas neuronas. También actúa como mediador en la mayoría de los efectos proinflamatorios de histamina (Arrang, 2007).
- **Receptor H_2.** Está presente en la activación de la adenilato ciclasa y por ende el subsecuente incremento en el AMPc y la activación de la proteína cinasa A, similar al receptor H_1 usualmente media la respuesta excitatoria en las neuronas. De igual forma el receptor H_2 interviene en procesos como la inhibición de quimiotáxis en neutrófilos polimorfonucleares, la secreción de IL-12 por monocitos y la inducción de producción de IL-10 (Arrang, 2007; Beghdadi *et al.,* 2009).
- **Receptor H_3.** Éste receptor se encuentra expresado principalmente en neuronas del sistema nervioso central y periférico. Estudios en cerebros de ratas y humanos han demostrado que los receptores H_3 presinápticos localizados en terminaciones nerviosas histaminérgicas actúan como un autorreceptor para controlar la síntesis y liberación de histamina y a su vez, actúan como heterorreceptor que influencia la liberación de otros neurotransmisores como dopamina, ácido γ-aminobutírico, noradrenalina, acetilcolina, serotonina y taquinina (Arrang, 2007). Debido a la localización de su expresión se ha sugerido que el receptor H_3 sea mediador en varias funciones del sistema nervioso central que afectan a una gran variedad de

conductas; en éste contexto la histamina ha mostrado tener un rol importante en la regulación del estado de alertamiento o excitación, la actividad motora, la ingesta de alimento y procesos de memoria y cognición (Beghdadi *et al.,* 2009).

- **Receptor H_4**. En contraste a los receptores anteriores, el H_4 es expresado predominantemente en células hematopoyéticas, y los agonistas a éste receptor han mostrado inducir quimiotáxis de mastocitos y eosinófilos, al igual que la producción de IL-16 por las células T (Beghdadi *et al.,* 2009).

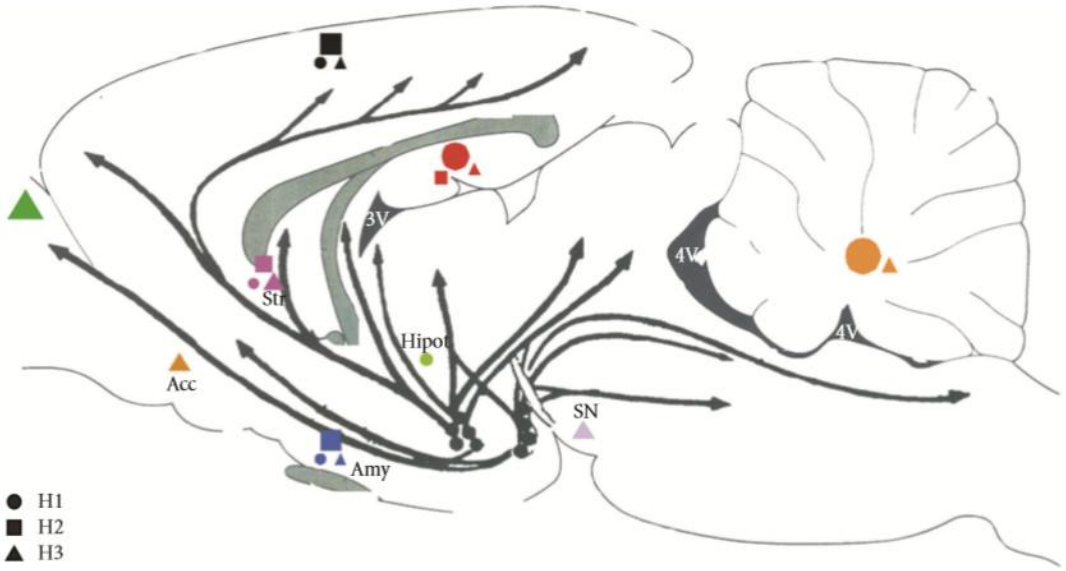

Figura 7. Principales proyecciones histaminérgicas y distribución de los receptores a histamina en el cerebro de rata. Las figuras marcadas muestran los principales sitios donde se localiza cada subtipo de receptor. En áreas que tienen más de un subtipo la figura con mayor tamaño indica cuál subtipo predomina. Acc, núcleo accumbens; Amy, amígdala; Hipot, hipotálamo; Str, cuerpo estriado; SN, sustancia nigra (modificado de Köhler *et al.,* 2011).

La caracterización de los subtipos de receptores a histamina se logró gracias a múltiples ensayos inmunohistoquímicos, clonación de genes, pruebas con agonistas y antagonistas con diversos grados de afinidad (figura 8) y con animales

genéticamente modificados para carecer de dichos receptores (Arrang, 2007; Siegel *et al*., 2006).

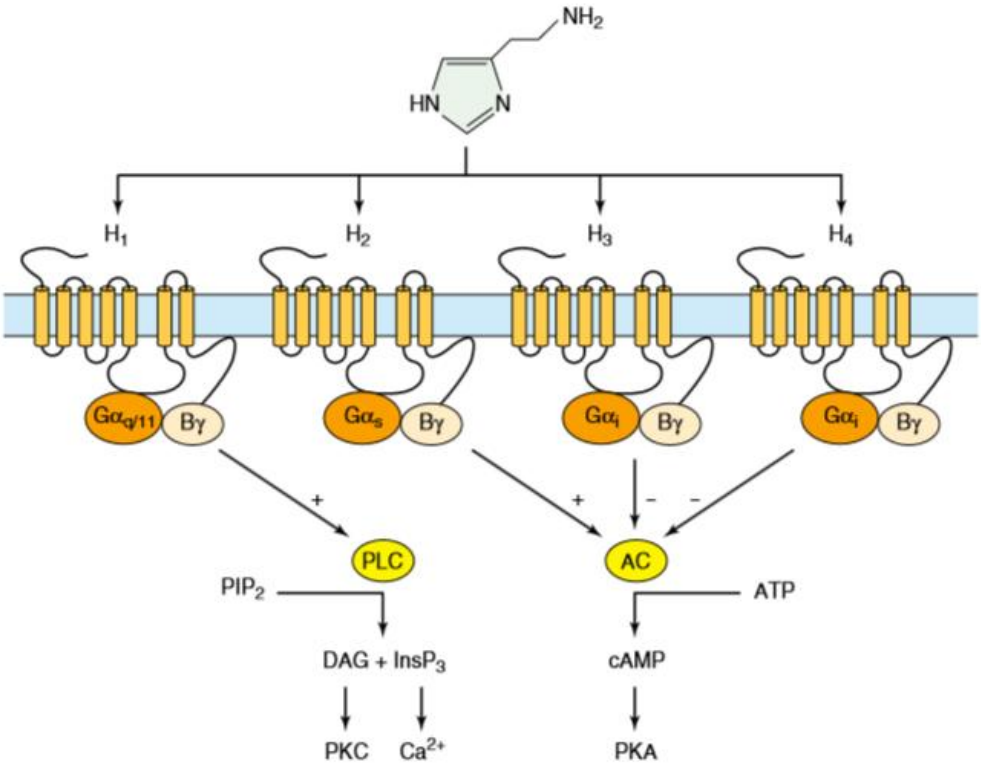

Figura 8. Principales vías de señalización de los receptores de histamina. Se observa la unión de la histamina a los cuatro receptores acoplados a proteína G y la variedad de vías señalización intracelular. El receptor H_1 activa el metabolismo del fosfatidilinositol mientras que los otros receptores ya sea positiva (receptor H_2) o negativamente (receptores H_3 y H_4) regulan la actividad de la adenilato ciclasa. Cabe mencionar que existen vías de señalización adicionales que se han descrito pero que no se muestran en la figura. PIP_2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLC, fosfolipasa C; AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosin trifosfato; AMPc, AMP cíclico; PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa A (modificado de Siegel *et al*., 2006).

Diversos estudios han demostrado que el receptor H_3 puede funcionar como heterorreceptor inhibitorio, y de éste modo su activación puede modular otros sistemas de neurotransmisión, por ejemplo al disminuir la liberación de acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina y otros péptidos. Sin embargo la histamina también puede aumentar la actividad de algunos de estos sistemas de neurotransmisión a través de los receptores H_1 y/o H_2 (Siegel *et al.,* 2006).

Histamina, memoria y aprendizaje

Son varias las funciones fisiológicas que se piensa tiene la histamina en el cerebro, y todas están relacionadas con su capacidad para aumentar la excitabilidad neuronal (Siegel *et al.,* 2006).

La activación de las neuronas histaminérgicas puede inhibir la síntesis y la liberación de varios neurotransmisores como GABA, acetilcolina, glutamato, dopamina y norepinefrina, los cuales a su vez están involucrados en procesos de aprendizaje y memoria (Brabant *et al.,* 2013).

Como se ha mencionado las neuronas donde se sintetiza la histamina están localizadas en el núcleo tuberomamilar (Ericson *et al.,* 1987; Brabant *et al.,* 2013; Beghdadi *et al.,* 2009), y a su vez los axones de éstas neuronas histaminérgicas inervan muchas regiones cerebrales desde la corteza prefrontal hasta la médula espinal, también se incluyen la amígdala y el núcleo basal magnocelular (NBM), áreas que participan en procesos esenciales de consolidación de la memoria en eventos aversivos (Torrealba et al., 2012; Brabant *et al.,* 2013).

Otro sistema de neurotransmisión importante es el sistema colinérgico, encontrado en diferentes regiones cerebrales como la amígdala y en regiones del NBM, el cual es la principal fuente de inervación colinérgica de la neocorteza; éstas neuronas a su vez están interconectadas con la actividad de otros sistemas de neurotransmisores, y diversos estudios sugieren que el sistema histaminérgico modula las vías colinérgicas en el NBM, ya que desde ésta región las neuronas histaminérgicas proyectan sus fibras eferentes de manera ipsilateral hacia todo el sistema nervioso central (Bacciottini *et al.,* 2001).

Pese a la compleja actividad neuromoduladora entre los sistemas histaminérgicos y colinérgicos, se ha observado una clara relación entre la histamina y los procesos de aprendizaje y memoria (Bacciottini *et al.,* 2001).

La modulación de la plasticidad sináptica inducida por histamina no es igual con la activación de los receptores H_1, H_2 o H_3, pero si es atribuible a una interacción con los sitios de unión de poliaminas en el complejo receptor NMDA (Bacciottini *et al.,* 2001).

En otros estudios de manipulación farmacológica se ha logrado incrementar la actividad de la histamina en el cerebro, lo cual facilita la consolidación de la memoria en tareas de aprendizaje (Brabant *et al.,* 2013) a la vez que estudios conductuales en modelos animales han proporcionado una amplia evidencia experimental de que los receptores a histamina también están involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria (Bacciottini *et al.,* 2001).

Se sabe también que la conducta alimenticia es impulsada por interacciones complejas entre estructuras cerebrales organizadas jerárquicamente, sistemas de neurotransmisión y estímulos endócrinos periféricos modulados por ritmos circadianos y señales ambientales, todos estos factores cambian la conducta y alteran aspectos homeostáticos y hedónicos de apetito y gasto de energía y se ha observado que la histamina afecta ambos lados del balance de energético, disminuyendo el consumo y aumentando el gasto de energía (Passani *et al.,* 2010).

Las neuronas histaminérgicas son cruciales para mantener un alto nivel de excitación durante una conducta motivada, ya que se ha observado que la actividad histaminérgica muestra un ritmo circadiano con altos niveles durante el periodo activo y bajos durante el periodo de sueño (Passani *et al.,* 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

Muchos modelos experimentales que estudian la formación de la memoria gustativa se basan en protocolos donde los sujetos de estudio pasan por una privación de líquidos de hasta 24 horas en las diferentes etapas del condicionamiento aversivo al sabor, lo que involucra variables importantes que tienen que ver con la saciedad y homeostasis, motivación y cambios circadianos, entre otros. Por tal motivo resulta de importancia la implementación de un protocolo donde los sujetos no estén privados de líquidos y así comparar los efectos de la privación o de la saciedad sobre la motivación y su impacto en el estado anímico y su relación durante el aprendizaje y la memoria

Asimismo, debido a que el sistema histaminérgico juega un papel clave en la regulación de la ingesta mediada por el hipotálamo, y que está involucrado en varios tipos de aprendizaje es importante conocer de qué manera la histamina en la corteza insular participa particularmente en conductas motivadas como lo es el aprendizaje de los sabores.

IV. HIPÓTESIS

- En un protocolo donde los sujetos no estén privados de agua durante el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) la memoria aversiva será menor en comparación de un CAS en animales privados de agua.

- La administración de un agonista o un antagonista a los receptores histaminérgicos H_3 en la corteza gustativa modificará el condicionamiento aversivo al sabor de manera diferencial si los sujetos están privados o no de agua.

V. OBJETIVOS

- Caracterizar un modelo de condicionamiento aversivo al sabor (CAS) en ratas macho manteniendo la libre demanda de consumo de agua durante el experimento.

- Evaluar, bajo un esquema de no privación de líquidos, los efectos del agonista para los receptores de histamina H_3, *R-α-metilhistamina* (RAMH), y del antagonista pirilamina en la corteza insular durante la adquisición del CAS.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Se emplearon ratas macho cepa Wistar, con un peso entre 200 a 250g a su llegada al laboratorio. Los sujetos fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) campus Juriquilla, Querétaro. En el laboratorio las ratas se mantuvieron en aclimatación durante 7 días; se separaron en cajas individuales (45 x 25 x 20 cm) con agua y alimento *ad libitum* bajo un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 horas (9:00 am–9:00 pm oscuridad, 9:00 pm – 9:00 am luz) y una temperatura de 23 ± 2 °C. Todos los experimentos se realizaron durante la fase de actividad de los roedores (oscura 9:00 am - 9:00 pm).

Todos los procedimientos realizados siguieron las normas establecidas por el Comité de Ética y Cuidado Animal del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Así también, fueron acordes con la normatividad internacional para el manejo y uso de animales de experimentación (National Institutes of Health, www.nih.gov).

Caracterización de protocolos

CAS sin privación de agua

El primer objetivo fue la caracterización de un protocolo experimental para el condicionamiento aversivo al sabor sin privación de agua. Durante el protocolo los animales tuvieron acceso libre tanto al alimento como al agua (figura 9).

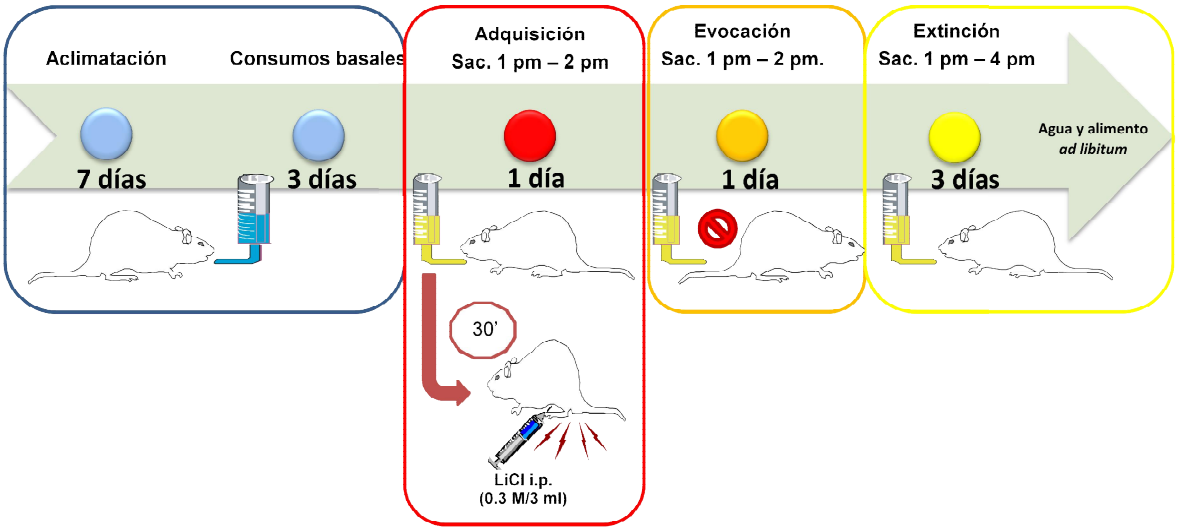

Figura 9. Representación del protocolo del CAS sin privación de agua. En color azul se observan los tiempos para el proceso de aclimatación (7 días) y para el registro de consumos basales (3 días). En color rojo el día de adquisición de la aversión al sabor novedoso, la primera exposición y posteriormente la inyección intraperitoneal de LiCl. Marcado en naranja el día de la evocación o prueba, existe una disminución de consumo del sabor novedoso en su segunda exposición. Finalmente en color amarillo los días empleados para la extinción de la aversión.

Registro de consumos basales

Se presentaron por 3 días probetas con 40 ml de agua en un horario de 11:00 am – 4:00 pm, se registró el consumo de agua en cada hora (12:00 pm, 1:00 pm, 2:00 pm, 3:00 pm y 4:00 pm) mientras que el alimento continuó siendo *ad libitum*. Posterior al registro del líquido consumido se devolvieron a los animales los bebederos con agua *ad libitum*. Durante éstos 3 días los animales fueron manipulados para reducir el estrés causado por el contacto inicial con el experimentador.

Establecimiento del horario para el CAS

De acuerdo a los registros de consumos basales de agua, se empleó el horario de 1:00 pm – 2:00 pm para la presentación del sabor novedoso, debido a que durante dicho horario el consumo de agua fue mayor a 5 ml, cantidad adecuada para poder formar la aversión al sabor.

Condicionamiento aversivo al sabor

* Adquisición (ADQ)

Se presentó una probeta con 40 ml de una solución de sacarina (0.1%) durante 1 hora (1:00 pm – 2:00 pm); al finalizar el tiempo de exposición se retiró la probeta y se registró el consumo, 30 min después de haber sido retirada la probeta con sacarina, se inyectó intraperitonealmente 3 ml de solución de LiCl (0.3 M). Los sujetos fueron devueltos a sus cajas donde volvieron a tener agua y alimento *ad libitum*.

* Evocación de memoria aversiva (EVO)

Durante este día se realizó la prueba para confirmar que se había formado una aversión al sabor novedoso, de igual manera se presentó una probeta con 40 ml de una solución de sacarina (0.1%) por una hora (1:00 pm – 2:00 pm) realizándose posteriormente el registro del consumo. Al finalizar la exposición a la sacarina, se regresaron los bebederos con agua a los sujetos.

* Extinción de la aversión (EXT)

Durante los siguientes 3 días se continuó con las presentaciones de los 40 ml de solución de sacarina (0.1%) ahora en un horario de 1:00 pm – 4:00 pm, esto para evaluar la extinción de la aversión, de igual manera se registró el consumo correspondiente a cada hora (2:00 pm, 3:00 pm y 4:00 pm). Al finalizar el tiempo de exposición se regresaron los bebederos con agua para su consumo libre.

Grupos farmacológicos

Una vez establecido el protocolo para el condicionamiento aversivo al sabor sin privación de líquidos, se procedió con el segundo objetivo, el cual fue evaluar los efectos de un agonista y un antagonista para los receptores a histamina H_3 y H_1 respectivamente, en la corteza insular (figura 10).

Para este protocolo se tuvieron 3 grupos:

* Control - solución salina isotónica estéril (NaCl 0.9 %)
* R-α-metilhistamina (RAMH) (10 µM, Sigma/Aldrich)
* Pirilamina (PYR) (100 mM, Sigma/Aldrich)

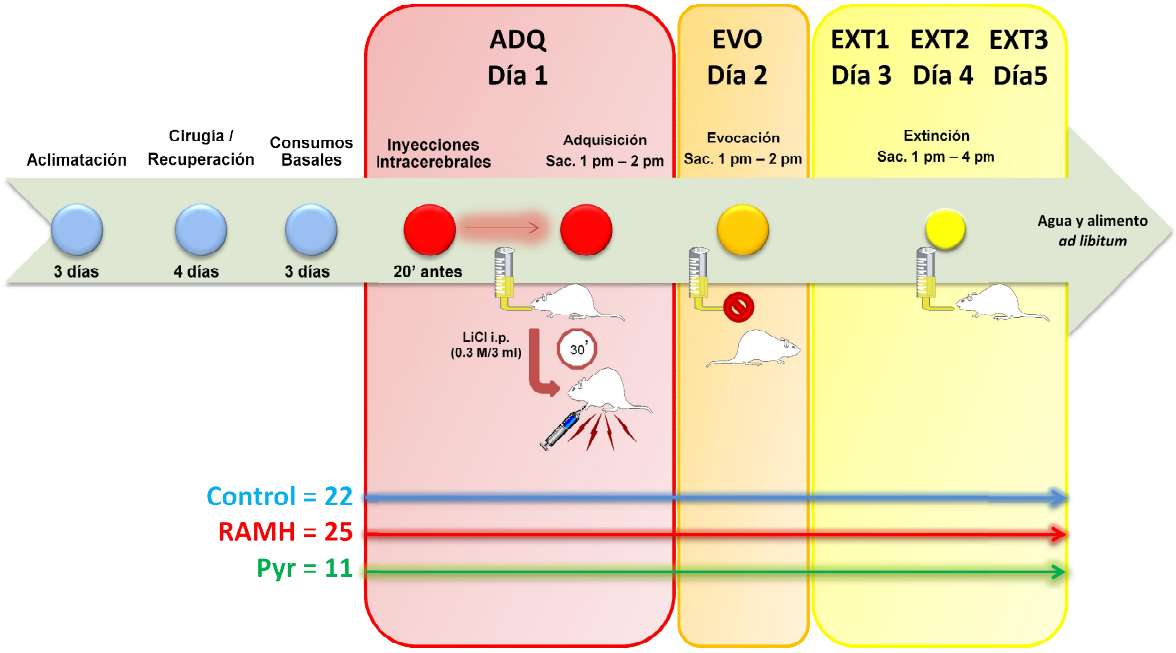

Figura 10. Protocolo empleado para generar el CAS sin privación de agua en los grupos control, RAMH y pirilamina. Se inicia con la aclimatación al vivario (3 días) seguida de la cirugía estereotáxica para colocar las guías cánulas y una recuperación a dicho proceso (4 días) para continuar con el registro de los consumos basales de agua (3 días). Durante el día de la adquisición de la aversión (ADQ), 20 minutos antes de la exposición al sabor novedoso se realizan las inyecciones intracerebrales en donde se administra el reactivo correspondiente a cada grupo, y de igual manera, 30 minutos después de la hora de exposición, la inyección i.p. de LiCl. Para la evocación (EVO) se hace una segunda exposición al estímulo, de igual forma para los 3 días de extinción de la aversión (EXT1, EXT2 y EXT3).

Cirugía

Al término de la aclimatación al vivario del laboratorio (3 días), se realizó en los sujetos cirugía estereotáxica colocando bilateralmente cánulas de acero inoxidable de 12 mm ± 0.5 mm de longitud, dirigidas a la corteza insular teniendo como referencia las siguientes coordenadas a partir de Bregma: anteroposterior + 1.2 mm, mediolateral +/- 5.5 mm y dorsoventral -3 mm, lo antes mencionado de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998). Las cánulas colocadas sirvieron como guía al momento de utilizar los inyectores para realizar las infusiones. Después de la cirugía, las ratas tuvieron 1 semana de recuperación con agua y alimento *ad libitum* antes de continuar con el experimento, los últimos 3 días de recuperación se hizo el registro de consumos basales de agua.

Inyecciones intracerebrales

El día de la adquisición a la aversión, 20 min antes de la exposición al sabor novedoso, se realizaron las inyecciones intracerebrales, utilizando inyectores (agujas dentales) del número 30 conectándose por uno de sus lados con una jeringa Hamilton de 10 μl por medio de un tubo delgado de polietileno. Se cargaron las jeringas con la solución a inyectar de acuerdo al grupo.

Las jeringas Hamilton de ambos inyectores se colocaron en una bomba de inyección automática, la cual se programó para expeler 0.5 μl en cada lado a una razón de 0.5 μl/min. Se colocaron los inyectores en las guías cánulas de tal modo que sobresalieran 3 mm más allá de la punta de la cánula para alcanzar la corteza insular. El tiempo de inyección en la bomba tuvo una duración de 1 min por sujeto, al término, se dejaron los inyectores en el sitio durante 1 min más con el fin de no provocar reflujo del líquido inyectado al quitarlos. Una vez transcurrido este tiempo, se retiraron los inyectores y se regresó al animal a su caja.

Condicionamiento aversivo al sabor

Al finalizar las inyecciones intracerebrales se continuó con la fase de adquisición de la aversión, de igual forma para los siguientes días se realizaron la evocación y la extinción de la memoria aversiva (1 y 3 días de duración respectivamente) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Histología

Al término del experimento los sujetos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital inyectado intraperitonealmente (1 ml/0.5 kg), posteriormente se perfundieron intracardialmente con solución salina (0.9%). Se extrajeron los cerebros y se conservaron en una solución de formaldehído (10%) durante 4 días. Posteriormente los cerebros se cambiaron a una solución de sacarosa (30%), en la que se mantuvieron durante un mínimo de cuatro días hasta el momento del corte.

Los cerebros fueron sacados de la solución de sacarosa y se colocaron en el micrótomo a una temperatura de -27 ± 2 °C, se realizaron los cortes con un grosor de 50 µm y se colocaron en portaobjetos marcados para su identificación, dejándose secar al ambiente por un día. Posteriormente se realizó la tinción de los portaobjetos para su análisis al estereoscopio.

VII. RESULTADOS

Análisis histológico

La figura 11 muestra una foto representativa de la adecuada localización de los tractos de la guía de los inyectores en la corteza insular.

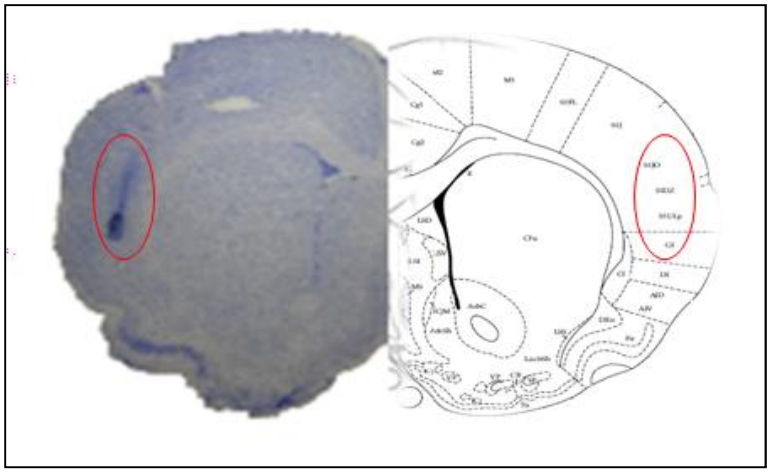

Figura 11. Microfotografía que muestra del lado izquierdo, la posición de la cánula e inyector en la corteza insular, del lado derecho diagrama de corte coronal de la misma zona (modificado de Paxinos y Watson, 1998).

Análisis estadístico

Los consumos obtenidos en los 4 diferentes horarios (12:00 pm – 1:00 pm, 1:00 pm – 2:00 pm, 2:00 pm – 3:00 pm y 3:00 pm – 4:00 pm), así como los resultados del CAS durante las diferentes etapas del protocolo se analizaron estadísticamente mediante una prueba de t pareada o ANOVA simple aplicando una prueba post-hoc Fisher en caso de ser necesario. El valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Todos los resultados fueron expresados con el valor de la media ± el error estándar.

1) **Consumos de agua durante los 4 horarios probados para la determinación del horario óptimo para la presentación del sabor novedoso durante el CAS.**

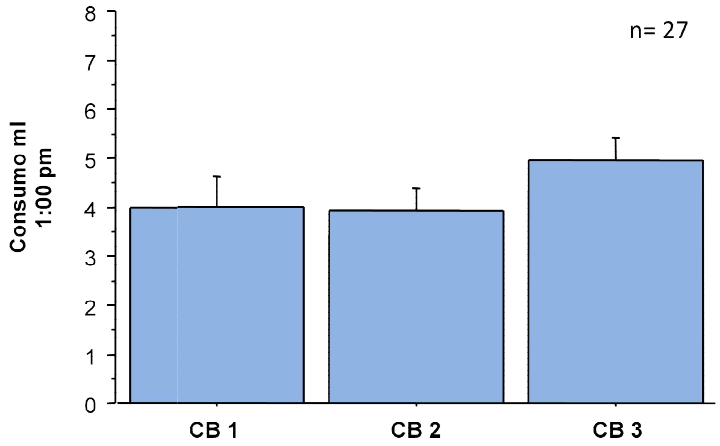

Figura 12. Consumo de agua durante el horario de 12:00 pm – 1:00 pm registrado durante los 3 días de consumos basales (CB). No existen diferencias significativas $p < 0.05$

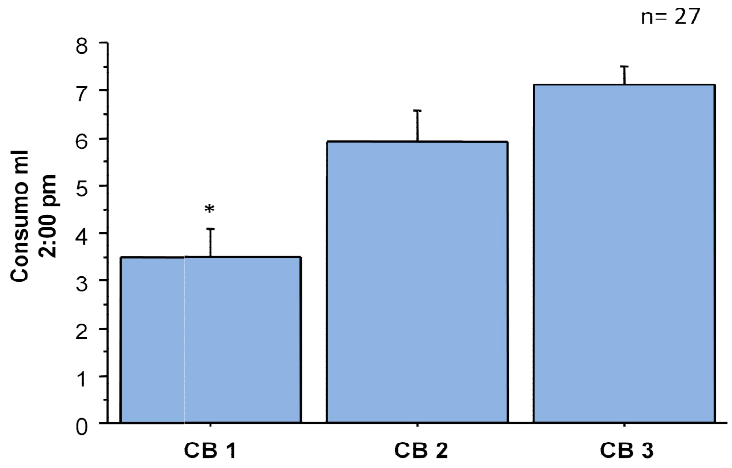

Figura 13. Consumo de agua durante el horario de 1:00 pm – 2:00 pm registrado durante los 3 días de consumos basales (CB). Se muestran diferencias significativas entre el día 1 y los días 2 y 3. (*) $p < 0.05$

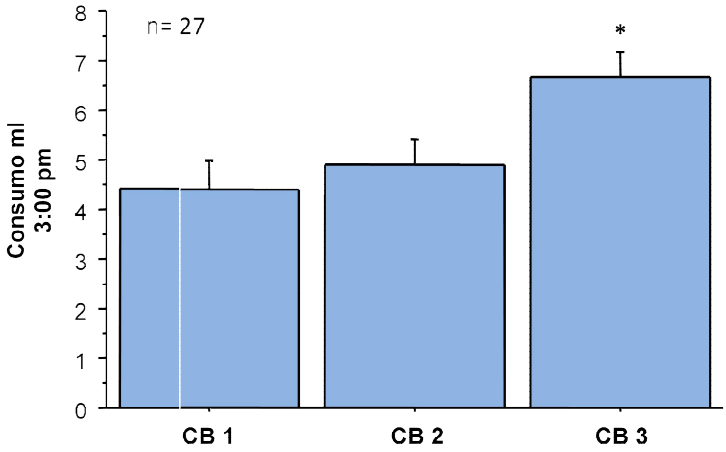

Figura 14. Consumo de agua durante el horario de 2:00 pm – 3:00 pm registrado durante los 3 días de consumos basales (CB). Existen diferencias significativas entre el día 3 y los días 1 y 2. (*) $p < 0.05$

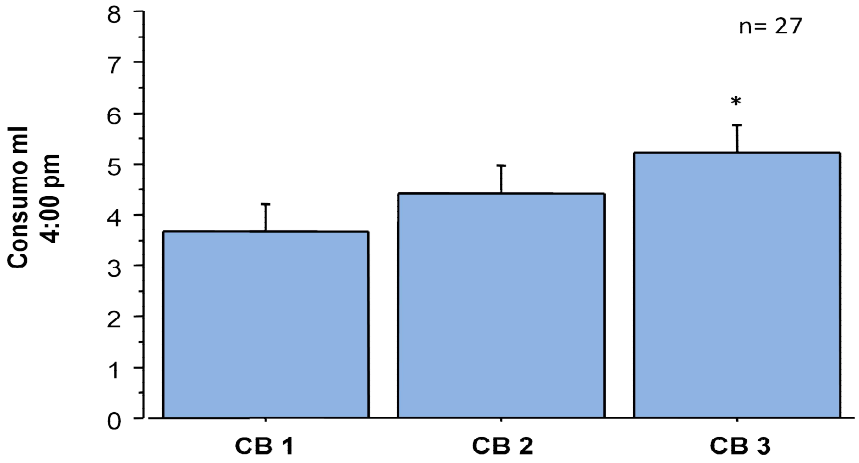

Figura 15. Consumo de agua durante el horario de 3:00 pm – 4:00 pm registrado durante los 3 días de consumos basales (CB). Hay diferencias significativas entre el día 1 y el día 3 (*) $p < 0.05$

Las figuras 12, 13, 14 y 15 muestran los resultados de los consumos basales registrados en los 4 horarios diferentes (1:00 pm, 2:00 pm, 3:00 pm y 4:00 pm) que se probaron para determinar el horario óptimo a emplear en el protocolo del CAS sin privación. Se observa una tendencia en el aumento de consumo de agua de acuerdo al día, es decir, el consumo durante el día CB 1 fue menor al registrado en el día CB 2, y éste a su vez fue menor al registrado en el día CB 3; dicho aumento en el consumo puede ser explicado debido a la posible familiaridad de los sujetos con la presencia de las probetas con agua, ya que fuera de éstos horarios los sujetos tenían bebederos. De igual manera, una prueba de t pareada muestra diferencias significativas durante los horarios 2:00 pm, 3:00 pm y 4:00 pm entre los diferentes días de consumos basales. Por lo tanto, el horario seleccionado para la presentación del sabor novedoso durante el CAS fue de 1:00 pm – 2:00 pm, ya que durante éste horario en el día CB 3 se logró el mayor consumo de agua (7 ml).

2) Consumos durante el CAS en el horario óptimo seleccionado 1:00 pm – 2:00 pm.

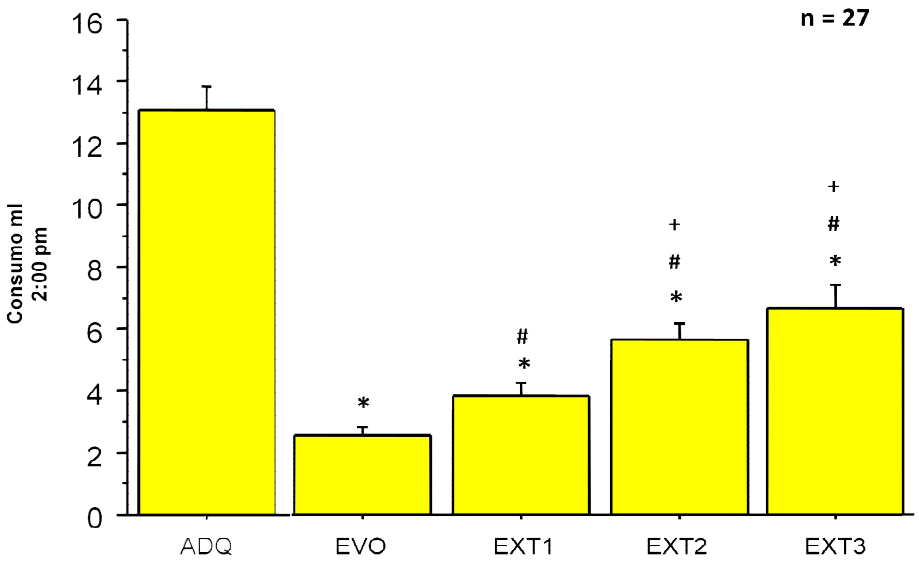

Figura 16. Consumo de sacarina durante el horario de 1:00 pm – 2:00 pm. Existen diferencias significativas entre el día ADQ (*) y los siguientes días; entre el día EVO (#) y los 3 días de extinciones y entre el día EXT1 (+) y los días EXT2 y EXT3. $p < 0.05$.

En la figura 16 se muestran los ml de sacarina consumida durante el horario de 1:00 pm – 2:00 pm en el día de adquisición (ADQ), el día de la evocación (EVO) y los 3 días de extinciones (EXT1, EXT2 y EXT3). La prueba de ANOVA simple reveló diferencias significativas entre los consumos de sacarina en cada uno de los días, lo que indica que bajo el esquema de no privación de líquidos durante el horario 1:00 pm – 2:00 pm se puede observar un CAS debido a que el consumo de sacarina se redujo significativamente en el día de la evocación de la memoria aversiva (EVO) o día de prueba de memoria. Asimismo se pudo observar que la extinción de la aversión es significativa a lo largo de los 3 días posteriores (EXT1, EXT2 y EXT3) ya que los sujetos aumentaron gradualmente el consumo de sacarina.

3) Evaluación de la extinción de la aversión en el horario de 2:00 pm – 3:00 pm.

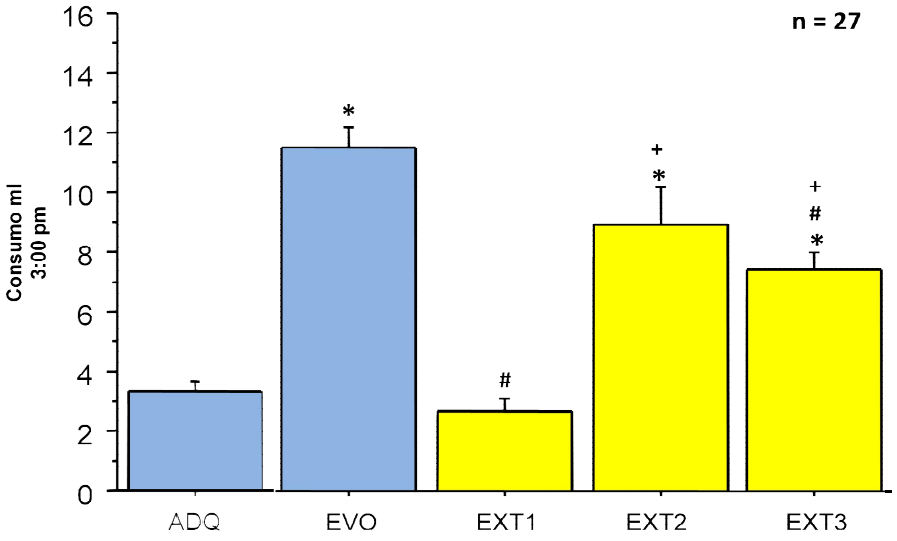

Figura 17. Consumo de agua (azul) y sacarina (amarillo) en el horario de 2:00 pm – 3:00 pm. Existen diferencias significativas entre el día ADQ (*) y los días EVO, EXT2 y EXT3; entre el día EVO (#) y los días EXT1 y EXT2 y entre el día EXT1 (+) y los días EXT2 y EXT3. $p < 0.05$.

Durante el horario de 2:00 pm – 3::00 pm en los días ADQ y EVO se cambiaron las probetas con sacarina por probetas con agua, ya que en ambos días el tiempo de exposición a la sacarina fue solamente de 1 hora; en el día ADQ se observa una disminución en el consumo de agua posterior a la exposición a la sacarina posiblemente debido a la inyección i.p de LiCl, mientras que en el día EVO el consumo de agua aumenta debido a la aversión formada a la sacarina que fue presentada en la hora previa. Para los 3 días de extinción de la aversión (EXT1, EXT2 y EXT3) se mantuvieron las probetas con sacarina durante 2 hrs más después del horario de 1:00 pm – 2:00 pm, como se indicó en la metodología, se observa que en este horario, pese a tener 1 hora previa con sacarina, el consumo de ésta tiende a aumentar, lo que indica una pérdida de la aversión formada en el día ADQ.

4) Evaluación de la extinción de la aversión en el horario de 3:00 pm – 4:00 pm.

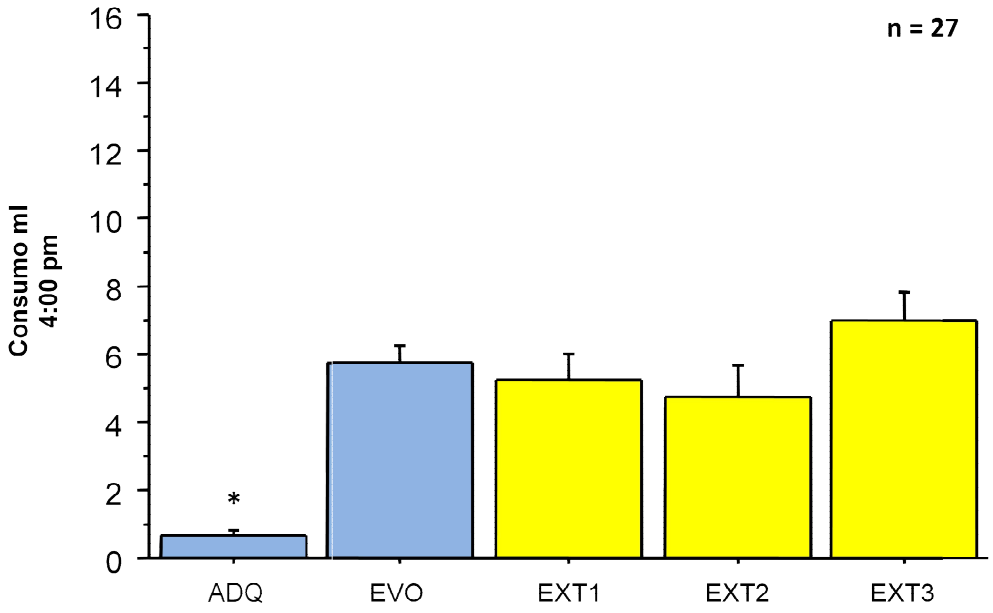

Figura 18. Consumo de agua (azul) y sacarina (amarillo) durante el horario de 3:00 pm – 4:00 pm. Se observan diferencias significativas entre el día ADQ (*) y el resto de los días. $p < 0.05$.

En la figura 18 se muestran los consumos registrados en el horario 3:00 pm – 4:00 pm. Los resultados muestran que existe una disminución significativa del consumo de agua en el día ADQ, sugiriendo que los animales aún se encontraban bajo el efecto de la inyección i.p. de LiCl. Por otra parte, el consumo de agua del día EVO vuelve a ser consistente con los consumos basales de días previos. De igual forma, para los días EXT1, EXT2 y EXT3 se registra la segunda hora extra de exposición a la sacarina, su consumo se muestra irregular pero no hay diferencias significativas entre ellos.

5) Consumo de agua durante el horario de 12:00 pm – 1:00 pm en los grupos farmacológicos

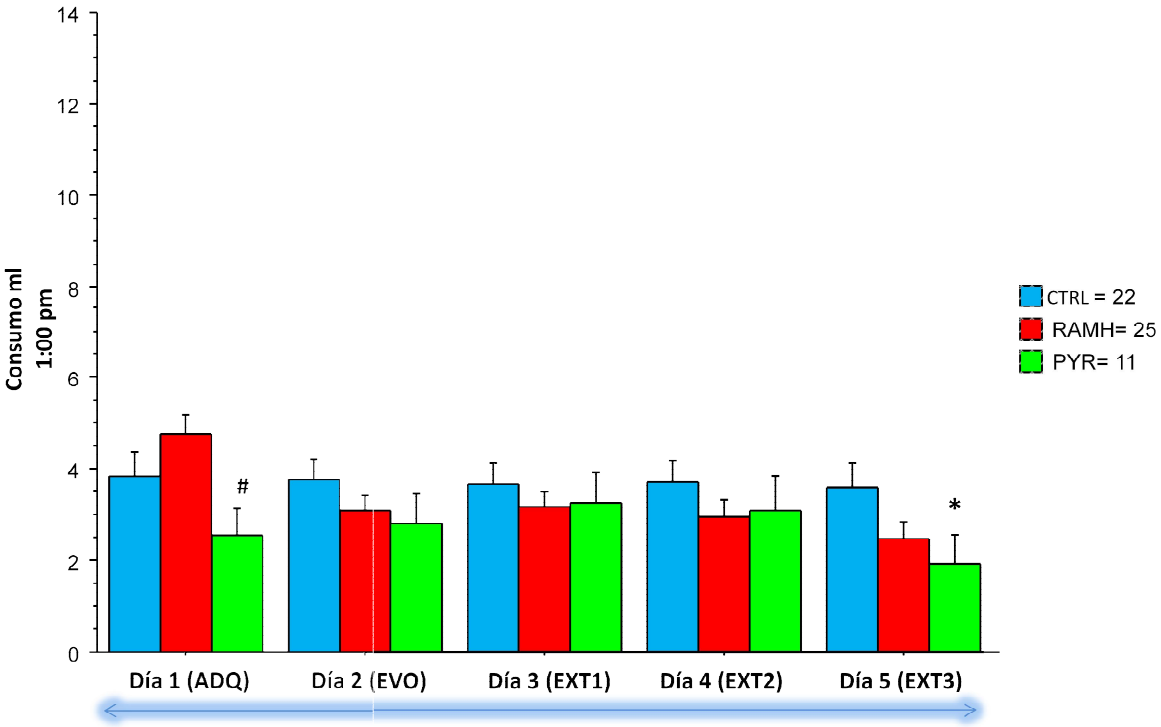

Figura 19. Consumo de agua (flecha color azul) durante el protocolo de CAS sin privación de líquidos en el horario de 12:00 pm – 1:00 pm. Se observan diferencias significativas en el día 1 (ADQ) entre los grupos RAMH y PYR (#), al igual que en el día 5 (EXT3) entre los grupos CTRL y PYR (*) $p < 0.05$

Los resultados muestran consumos similares a lo largo de los días para cada uno de los grupos, sin embargo la prueba post-hoc de Fisher indicó que hay diferencias significativas entre el grupo RAMH y el grupo PYR en el día 1 y entre los grupos CTRL y PYR en el día 5.

6) Consumo de sacarina durante el horario de 1:00 pm – 2:00 pm en los grupos farmacológicos

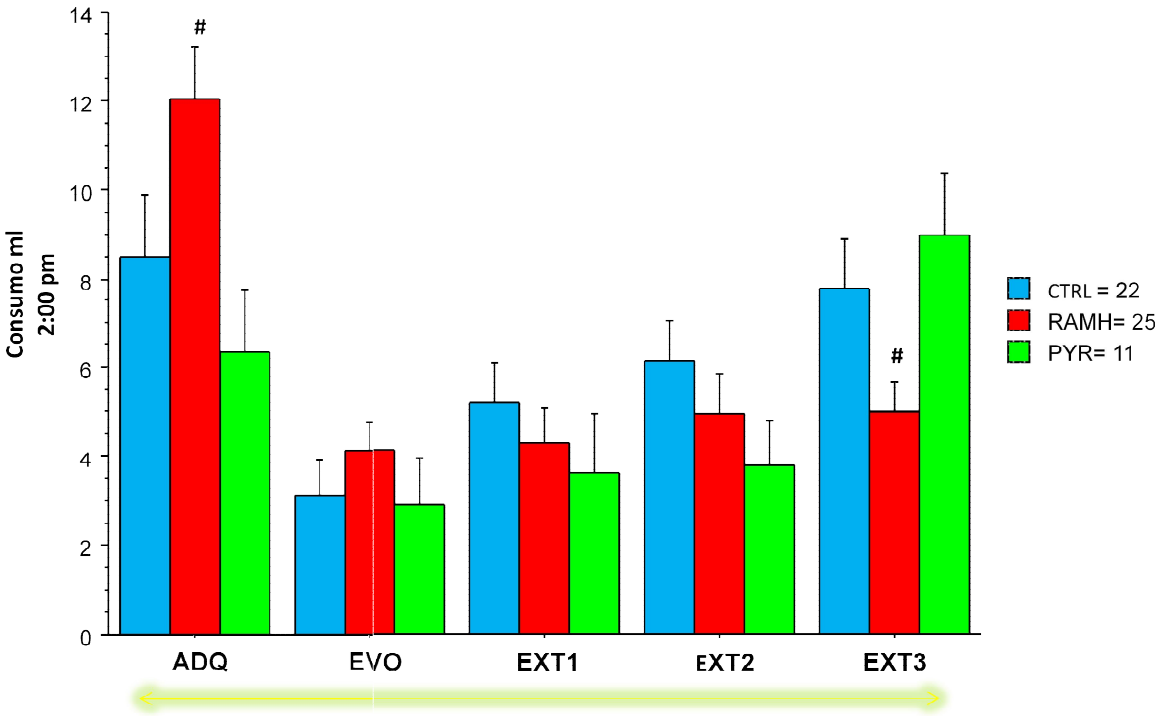

Figura 20. Consumo de sacarina (flecha color amarillo) durante el CAS sin privación en el horario de 1:00 pm – 2:00 pm. Se observan diferencias significativas entre el grupo RAMH y los grupos CTRL y PYR en el día ADQ (#) ocurriendo lo mismo en el día EXT3 entre el grupo RAMH y los grupos CTRL y PYR (#). $p < 0.05$

En la figura 20 se muestran los consumos de sacarina durante el horario de 1:00 pm – 2:00 pm donde el grupo control (CTRL) mostró un comportamiento de un CAS clásico, teniendo un consumo elevado el día ADQ en comparación con el día EVO, los días EXT1, EXT2 y EXT3 se observó un aumento gradual en el consumo de sacarina. La prueba post-hoc de Fisher mostró que existen diferencias significativas entre el grupo RAMH y los grupos CTRL y PYR en los días ADQ y EXT3, en el primer día el consumo de sacarina fue significativamente mayor comparado con los otros dos grupos, posiblemente asociado al efecto de la inyección intracerebral previa del antagonista a los receptores a histamina H_3.

Por otra parte en los días EXT1, EXT2 y EXT3 se observó que al grupo RAMH le fue difícil extinguir la aversión a la sacarina ya que su consumo fue similar al día de la prueba (EVO) y como se mencionó previamente, fue significativamente menor en el día EXT3 en comparación a los grupos CTRL y PYR lo que indica que la participación del antagonista RAMH durante el momento de la adquisición de la aversión haya modificado la manera en que los sujetos asociaron el sabor novedoso con el malestar gástrico, reflejando una tardada extinción de la aversión.

De igual forma el grupo PYR logró un CAS durante el protocolo y aunque la extinción de la aversión fue menor en comparación al grupo CTRL, fue más consistente en comparación al grupo RAMH, teniendo un consumo mayor el día EXT3.

7) Consumos durante el horario de 2:00 pm – 3:00 pm en los grupos farmacológicos.

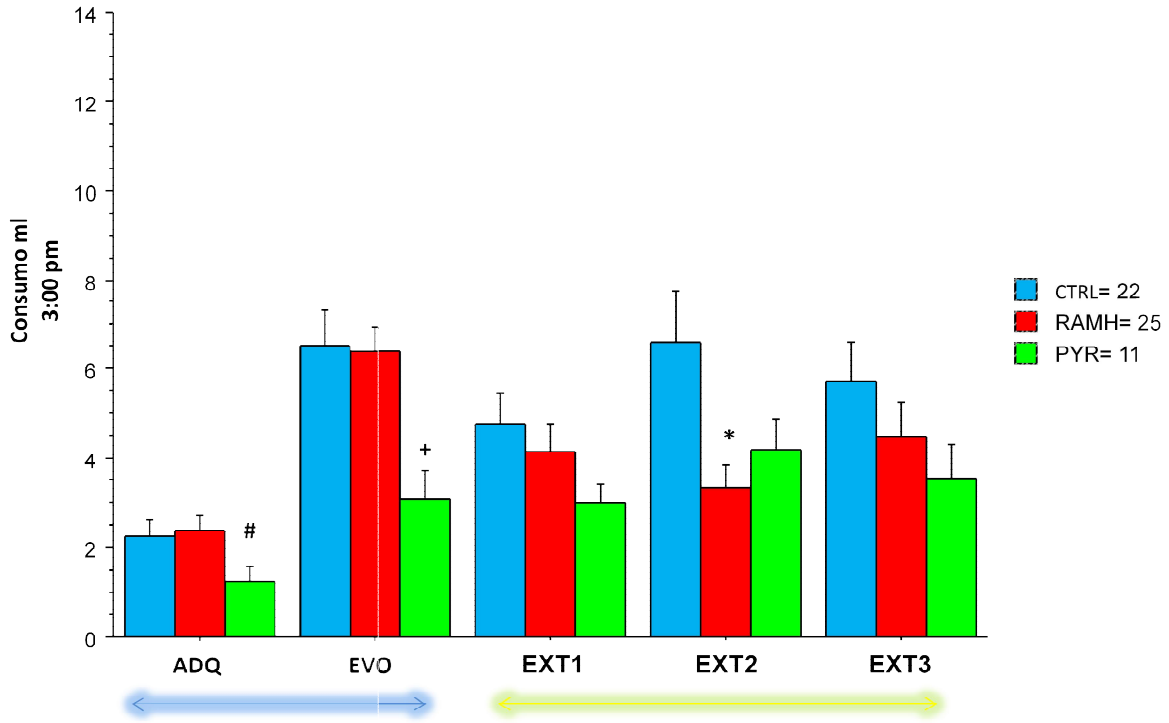

Figura 21. Consumo de agua (flecha azul) y sacarina (flecha amarilla) durante el protocolo de CAS sin privación de líquidos en el horario de 2:00 pm – 3:00 pm. Se observan diferencias significativas entre los grupos RAMH y PYR en el día ADQ (#), mientras que en el día EVO hay diferencias significativas entre el grupo PYR y los grupos CTRL y RAMH (+), finalmente el día EXT2 muestra diferencias significativas entre los grupos CTRL y RAMH (*). $p < 0.05$

La figura 21 muestra que, como se indicó en la metodología, durante el horario de 2:00 pm – 3::00 pm en los días ADQ y EVO se cambiaron las probetas con sacarina por probetas con agua, y los 3 días de extinción de la aversión (EXT1, EXT2 y EXT3) se mantuvieron las probetas con sacarina durante 2 hrs más después del horario de 1:00 pm – 2:00 pm. En el día ADQ se observó que los tres grupos tuvieron una disminución en el consumo de agua posterior a la exposición a la sacarina, probablemente debido a la inyección i.p de LiCl, existiendo diferencias significativas entre los grupos RAMH y PYR.

En el día EVO se observó en los grupos CTRL y RAMH que el consumo de agua aumenta posiblemente a que la sacarina fue presentada en la hora previa, sin embargo el grupo PYR tuvo diferencias significativas con los grupos CTRL y RAMH, indicando que el efecto del agonista a los receptores H_3 pudo modificar el comportamiento que los sujetos mostraron al consumir agua, sabor que se debía asociar como seguro.

Para el día EXT2 se observan diferencias significativas entre los grupos CTRL y RAMH, existiendo un mayor consumo de sacarina del primero con respecto al segundo, todo esto en la segunda hora de exposición a la sacarina, el efecto del RAMH parece notarse nuevamente al hacer que la extinción de la aversión sea más lenta que en el grupo CTRL.

8) Consumos durante el horario de 3:00 pm – 4:00 pm en los grupos farmacológicos.

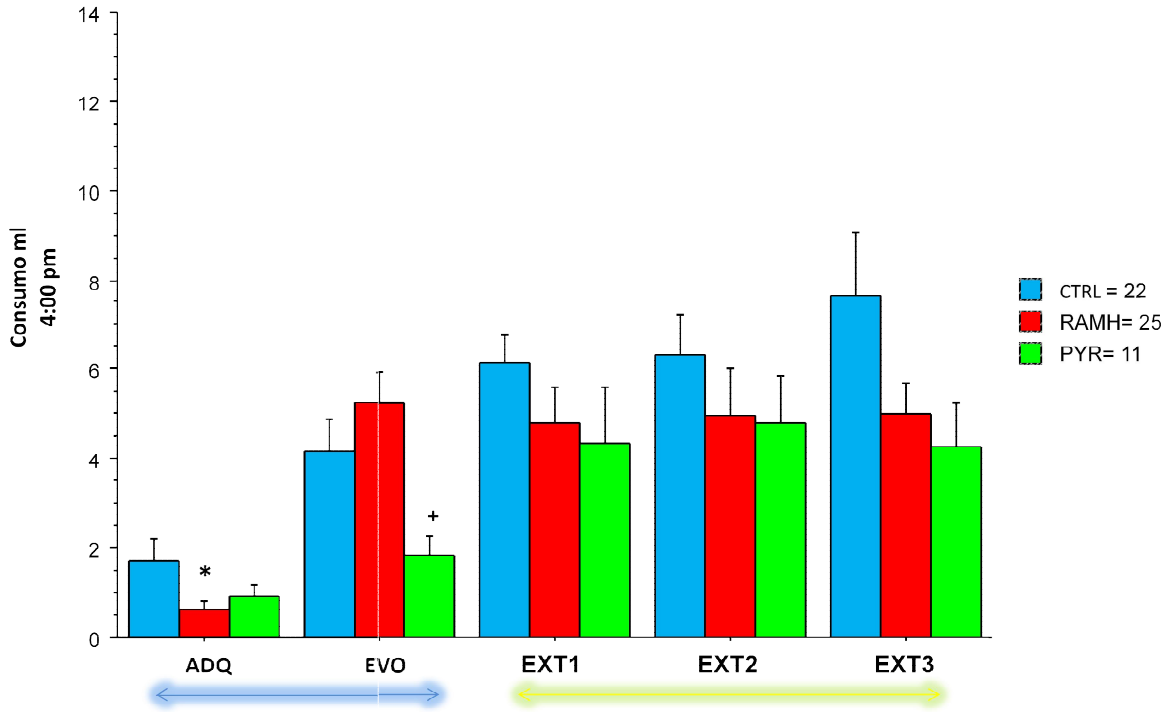

Figura 22. Consumos de agua (flecha azul) y sacarina (flecha amarilla) durante el protocolo de CAS sin privación de líquidos en el horario de 3:00 pm – 4:00 pm. Se observan diferencias en el día ADQ entre los grupos CTRL y RAMH (*) y en el día EVO entre el grupo PYR y los grupos CTRL y RAMH (+). $p < 0.05$

En la figura 22 se observan los consumos registrados en el horario 3:00 pm – 4:00 pm. Los resultados muestran que existe una disminución significativa del consumo de agua en el día ADQ por parte del grupo RAMH, sugiriendo que los animales de dicho grupo se encontraban aún bajo el efecto de la inyección i.p. de LiCl, y que aparentemente éste efecto fue mayor por la presencia del antagonista.

Por otra parte, en los grupos CTRL y RAMH el consumo de agua en el día EVO vuelve a ser consistente con los consumos basales de días previos, sin embargo

el grupo PYR mostró un consumo significativamente menor en comparación con los grupos mencionados.

De igual forma, para los días EXT1, EXT2 y EXT3 se registra la segunda hora de exposición a la sacarina, su consumo se muestra irregular pero no hay diferencias significativas entre ellos.

VIII. DISCUSION

El protocolo de CAS propuesto en este trabajo permitió comprobar que es posible formar una aversión a un sabor novedoso sin que los sujetos se encuentren privados del consumo de líquidos, demostrando que los procesos motivacionales que llevan a los sujetos a realizar una tarea de aprendizaje pueden verse alterados al modificar dicha variable, pero ése cambio no tiene mayores efectos en el protocolo de un CAS tradicional (Miranda *et al*., 2003; Núñez-Jaramillo *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos también hacen énfasis en considerar éstos factores motivacionales ya que una conducta motivada que inicie por estímulos internos o externos tendrá como finalidad la satisfacción de una necesidad fisiológica o cognitiva (Escobar Briones *et al*., 2011; Miñana-Solis *et al*., 2009), en el caso de un CAS tradicional, la satisfacción de un estado de sed.

Previamente se ha demostrado que los animales que se encuentran bajo horarios restringidos para la ingesta de alimentos y/o líquidos pueden llegar a presentar un estado catabólico crónico, desarrollando así una excitación o un incremento en la alerta producido por la presentación del alimento o el líquido y que el aprendizaje de dichas condiciones puede hacer que éstas conductas permanezcan aún cuando los animales no están privados (Anne-Marie Poulin *et al*., 2008).

Por otra parte, los estudios farmacológicos realizados en este trabajo localizados en la corteza insular demostraron que la manipulación de su actividad moduladora en procesos de memoria y aprendizaje es de suma importancia (Núñez-Jaramillo et al., 2010; Bermúdez-Rattoni, 2014), ya que la presencia de neuronas histaminérgicas en la corteza insular tiene efectos en otros sistemas de neurotransmisión, como el sistema colinérgico, y a pesar de la compleja actividad neuromoduladora entre ambos sistemas se ha observado una relación entre la histamina y los procesos de aprendizaje (Bacciottini *et al.,* 2001).

Evidencias previas como el trabajo de Purón-Sierra y colaboradores en 2010 muestran que el bloqueo del receptor H_1 en el núcleo basal magnocelular, o la activación del receptor H_3 en la corteza insular modifican la formación de la memoria aversiva, pero no su evocación, lo que sugiere que durante distintas tareas de aprendizaje asociativo, los subtipos de receptores a histamina tienen funciones opuestas, relacionadas con la regulación de la actividad colinérgica producida tanto en la corteza insular como en el núcleo basal magnocelular.

De igual manera, en 2014 Purón-Sierra y colaboradores demostraron que los subtipos de receptores a histamina H_1 y H_3 tienen una actividad moduladora en la liberación de acetilcolina, y que la activación de dichos receptores por la administración del agonista al receptor H_3, RAMH, en la corteza insular, o del antagonista del receptor H_1, pirilamina, en el núcleo basal magnocelular produce un efecto que impide la adquisición de la aversión durante un protocolo de CAS tradicional, diferente a lo reportado en éste trabajo donde la administración en la corteza insular del agonista RAMH tuvo efectos en el proceso de extinción de la aversión haciendo que los sujetos tardaran más en asociar el sabor de la sacarina como “seguro”, mientras que el antagonista pirilamina mostró efectos similares en la misma área cerebral. Ambos trabajos mencionados previamente apoyan la propuesta de que los axones de las neuronas histaminérgicas que se encuentran en el núcleo tuberomamilar, inervan la mayoría de las regiones cerebrales incluyendo la corteza insular.

IX. CONCLUSIONES

- Es posible lograr formar una aversión a un sabor novedoso en un modelo experimental donde los animales no están privados al consumo de líquidos durante amplios periodos de tiempo, sin embargo la robustez de dicha aversión puede ser menor en comparación a un CAS tradicional.

- En comparación a previos resultados, con un régimen de privación de agua (Purón *et al.,* 2010), la activación de los receptores H_3 durante la adquisición del CAS en ratas NO privadas de líquidos, no tiene efectos sobre la formación de la memoria de aversión; pero si induce un retardo en la extinción de la aversión al sabor.

- La actividad de la histamina en la corteza insular podría estar regulando procesos relacionados con saciedad durante el aprendizaje, evocación y extinción de la memoria de aversión al sabor.

- En conjunto, los resultados señalan la importancia de tomar en cuenta las alteraciones neuroquímicas causadas por la privación de líquidos en modelos de aprendizaje como el CAS.

X. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Airaksinen M.S., Paetau A, Paljarvi L, Reinikainen K, Riekkinen P, Suomalainen R, Panula P. 1991. Histamine neurons in human hypotalamus: Anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. Neuroscience 44, 465-481.
- Anne-Marie Poulin, Elena Timofeeva. 2008. The dynamics of neural activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. Elsevier, Brain Research.
- Arrang JM. 2007.Histamine and schizophrenia. International review of neurobiology, Paris, France. Vol. 78. doi: 10.1016/S0074-7742(06)78009-6
- Bacciottini L, Passani MB, Mannaioni PF, Blandina P. 2001. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. Behavioural Brain Research.
- Beghdadi W, Porcherie A, Schneider BS, Morisset S, Dubayle D, et al. 2009. Histamine H_3 receptor-mediated signaling protects mice from cerebral malaria. PLoS ONE 4(6): e6004.
- Bermudez-Rattoni F y Prado-Alcalá RA. 2001. Memoria. Dónde reside y cómo se forma. México, D.F.: Editorial Trillas.
- Bermudez-Rattoni F 2014. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. Neurobiology of learning and memory.
- Brabant C, Charlier Y, Tirelli E. 2013. The histamine H3-receptor inverse agonist Pitolisant improves fear memory in mice. Behavioural Brain Research.
- Craig,W. 1918. Appetites and aversions as constituents of instincts. *Biol.Bull.* 34, 91–107.
- Ericson H, Watanabe T, Kohler C. 1987. Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: Delineation of subgroups with antibody against L-histidine decarboxylase as a marker. Comp. Neurol. 263, 1-24.

- Escobar Briones C, Aguilar Roblero RA. 2011. Neural basis of motivational and cognitive control. Cambridge, Massachusetts : MIT Press
- Goio M, Federman N, Navarro N, Marisa V, Würschmidt A. 2012. Cerebro y Memoria. 1ª ed. Ministerio de Educación de la Nación. Buenos Aires.
- Hanamori 1998
- Hebb, D. O. 1955. Drivesand the C.N.S. (ConceptualNervous System). *Psychol.Rev.* 62, 243–254.
- Kandel E, Schwartz J y Jessell T. 2001. Principios de Neurociencia. 4ª ed. Madrid: McGraw Hill-Interamericana.
- Köler CA, da Silva WC, Benetti F, Bonini JS. 2011. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. Neural Plasticity, Vol. 2011. doi: 10.1155/2011/328602
- Mendoza et al 2005
- Miranda MI y Bermudez-Rattoni F. 2007. Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. Neurobiol. Learn. Mem. 87, 343-351.
- Miranda MI, LaLumiere RT, Buen TV, Bermudez-Rattoni F y McGaugh JL. 2003. Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. Eur. J. Neurosci. 18, 2605-2610.
- Miranda MI, Rodríguez-García G, Reyes-López JV, Ferry B y Ferreira G. 2008. Differential effects of β-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. Neurobiol. Learn. Mem. 90, 54-61.
- Miranda Mi. 2012. Taste and odor recognition memory: the emotional flavour of life. Neuroscience.
- Moraga-Amaro R, Cortés-Rojas A, Simon F, Stehberg J. 2014. Role of the insular cortex in taste familiarity. Neurobiology of learning and memory.
- Núñez-Jaramillo et al 2010
- Passani MB, Blandina P, Torrealba F. 2010. The histamine H3 receptor and eating behavior. Pharmacology and experimental therapeutics. JPET. doi: 10.1124/jpet.110.171306.

- Paxinos G. 1995. The Rat Nervous System. 2ª ed. San Diego: Academic Press.
- Paxinos G y Watson C. 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4ª ed. New York: Academic Press.
- Purón-Sierra L, Miranda MI. 2014. Histaminergic modulation of cholinergic release from the Nucleus Basalis Magnocellularis into Insular Cortex during taste aversive memory formation. PLoS ONE 9(3): e91120. doi: 10.1371/journal.pone.0091120
- Purón-Sierra L, Sabath E, Nuñez-Jaramillo L, Miranda MI. 2010. Blockade of nucleus basalis magnocellularis or activation of insular cortex histamine receptors disrupts formation but not retrieval of aversive taste memory. Neurobiology of Learning and Memory. doi: 10.1016/j.nlm.2009.10.001
- Purves D, George J Augustine, David Fitzpatrick, William C Hall, Anthony-Samuel Lamanita, James O Mcnamara, S Mark Williams. 2004. Neuroscience, Sinauer Associates Inc. USA-
- Romero Bermúdez Erika, Hernández Garzón Natalia A. 2011. El papel de la memoria en el proceso lector. Universidad Manuela Beltrán, Bogotá, Colombia.
- Siegel George J, Alberts R Wayne, Brady Scott T, Price Donald L. Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7a Edición. Academic Press. 2006.
- Torrealba F, Riveros ME, Contreras M, Valdes JL. 2012. Histamine and motivation. Sistems Neuroscience. doi: 10..3389/fnsys.2012.00051
- Yamamoto T, Azuma S y Kawamura Y. 1984. Functional relations between the cortical gustatory area and the amygdala: electrophysiological and behavioral studies in rats. Exp. Brain Res. 56, 23-31.