



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CAMBIOS DE LA ACTIVIDAD COLINÉRGICA EN EL  
NÚCLEO ACCUMBENS INDUCIDOS POR EL CONSUMO  
CRÓNICO DE AZÚCAR”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ESTEPHANIA GARCÍA SICILIANO**

DIRIGIDA POR

**Dra. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, JUNIO 2021



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CAMBIOS DE LA ACTIVIDAD COLINÉRGICA EN  
EL NÚCLEO ACCUMBENS INDUCIDOS POR EL  
CONSUMO CRÓNICO DE AZÚCAR”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ESTEPHANIA GARCÍA SICILIANO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO**

**SINODALES**

**Dra. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO**

**DIRECTOR**

**M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE**

**ASESOR INTERNO**

**M.S.P. JUANA SUSANA FLORES ROBLES**

**SINODAL**

**M. en C. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ**

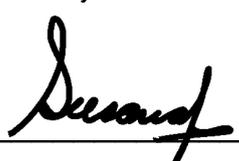
**SINODAL**



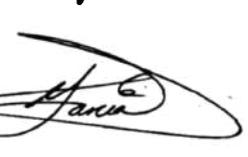
---



---



---



---

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido  | Página     |
|--|------------|
| <b>ÍNDICE GENERAL</b>  | <b>i</b>   |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b>   | <b>iii</b> |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>   | <b>i</b>   |
| <b>RESUMEN</b>   | <b>i</b>   |
| <b>1. ANTECEDENTES</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1. Memoria y Aprendizaje   | 2          |
| 1.1.1. Conceptos básicos de la memoria                             | 3          |
| 1.1.2. Clasificación de aprendizaje                                | 4          |
| 1.1.2.1. Aprendizaje asociativo                                    | 4          |
| 1.1.2.2. Aprendizaje no asociativo                                 | 5          |
| 1.1.3. Tipos de memoria  | 5          |
| 1.2. Memoria del sabor   | 6          |
| 1.2.1. Modelos de aprendizaje gustativo                            | 7          |
| 1.2.1.1. Memoria apetitiva del sabor                               | 7          |
| 1.3. Percepción de los sabores                                     | 8          |
| 1.3.1. Estructuras cerebrales involucradas en la memoria del sabor | 10         |
| 1.3.1.1. Núcleo accumbens  | 13         |
| 1.4. Sistema colinérgico   | 14         |
| 1.4.1. Síntesis.   | 15         |
| 1.4.2. Liberación  | 17         |
| 1.4.3. Regulación  | 20         |
| 1.4.4. Recaptura y degradación                                     | 20         |
| 1.4.5. Receptores  | 21         |
| 1.4.5.1. Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs)           | 21         |
| 1.4.5.2. Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs)          | 23         |
| 1.4.6. Vías colinérgicas   | 25         |
| 1.4.7. Sistema colinérgico y la memoria del sabor                  | 29         |
| 1.5. Núcleo accumbens y la memoria gustativa                       | 32         |
| 1.5.1. Relación entre núcleo accumbens y acetilcolina              | 34         |
| <b>2. HIPÓTESIS</b>  | <b>37</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. OBJETIVOS</b>   | <b>38</b> |
| 3.1. General  | 38        |
| 3.1.1. Objetivos específicos  | 38        |
| <b>4. METODOLOGÍA</b>   | <b>39</b> |
| 4.1. Sujetos  | 39        |
| 4.1.1. Esquemas del protocolo experimental  | 39        |
| 4.1.2. Habitación   | 39        |
| 4.1.3. Grupos experimentales  | 40        |
| 4.1.4. Grupo Novedoso y Grupo Familiar  | 40        |
| 4.1.5. Grupo Crónico  | 40        |
| 4.2. Cirugía  | 40        |
| 4.3. Habitación en la cámara de microdiálisis en libre movimiento                                     | 41        |
| 4.3.1. Esquemas de consumo durante la microdiálisis   | 41        |
| 4.4. Microdiálisis  | 41        |
| 4.4.1. Cuantificación de ACh por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)                      | 42        |
| 4.5. Histología   | 42        |
| 4.6. Análisis estadístico   | 43        |
| <b>5. RESULTADOS</b>  | <b>44</b> |
| 5.1. Consumos de líquido, alimento y peso corporal durante 14 días                                    | 44        |
| 5.2. Histología para ubicar colocación de cánulas y sondas cerebrales                                 | 47        |
| 5.3. Cambios en los niveles extracelulares de ach en el núcleo accumbens debidos al consumo de azúcar | 48        |
| <b>6. DISCUSIÓN</b>   | <b>51</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES</b>  | <b>53</b> |
| <b>8. REFERENCIAS</b>   | <b>54</b> |
| <b>ANEXOS</b>   | <b>64</b> |
| ANEXO 1. Tinción de Nissl   | 64        |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro   | Página |
|--|--------|
| Cuadro 1. Esquemas de consumo durante la microdiálisis. Se muestra el protocolo experimental que siguieron los tres grupos con los que se trabajó. | 39     |

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura  | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Papila gustativa. Las papilas gustativas se conforman por tres tipos de células receptoras (I, II, III). Las células de tipo IV son células basales y las de tipo V son células marginales. Modificado de Witt, 2019. | 9      |
| Figura 2. Esquema de la innervación gustativa de la lengua y la epiglotis. Modificado de Witt, 2019.  | 10     |
| Figura 3. Esquema de las rutas centrales del sabor activadas a partir del NTS. Ohla, 2019.  | 12     |
| Figura 4. Corte coronal de cerebro mostrando el Núcleo Accumbens  | 14     |
| Figura 5. Estructura molecular de la Acetilcolina   | 14     |
| Figura 6. Síntesis de Acetilcolina. Modificada de Izumi, 2018.  | 16     |
| Figura 7. Sinapsis de Acetilcolina. Florez, 3ª edición.   | 18     |
| Figura 8. Receptor nicotínico. Modificada de Hendrickson, 2013.   | 22     |
| Figura 9. Receptor muscarínico. Modificado de Eglen, et cols. 2001.   | 24     |
| Figura 10. Sistemas colinérgicos en el cerebro humano. Perry et al., 1999.  | 29     |
| Figura 11. Representación esquemática del NAc en el cerebro de rata. Ubicado en la región anterior rostral del cerebro (número 9, círculo amarillo). Modificada de Redolar, 2014.   | 33     |
| Figura 12. Ganancia de peso durante 14 días. * $p < 0.05$ , # $p < 0.05$ .  | 45     |
| Figura 13. Consumo de alimento durante 14 días. * $p < 0.05$ , # $p < 0.05$ .   | 46     |
| Figura 14. Consumo de líquido durante 14 días. * $p < 0.05$ .   | 47     |
| Figura 15. Corte coronal de cerebro de rata. Se puede observar la correcta  |        |

ubicación de la cánula. Modificada de Paxinos y Watson, 1998. 48

Figura 16. Niveles extracelulares de ACh en el NAc Shell durante la  
microdiálisis. \* $p < 0.05$  49

Figura 17. Consumo de azúcar durante la microdiálisis 50

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## RESUMEN

El núcleo accumbens (NAc) es una región implicada en la respuesta a las recompensas naturales, el abuso y la dependencia a drogas, mecanismos de alimentación y motivación; además, se ha demostrado que el NAc tiene un papel importante en el aprendizaje gustativo debido a que interactúa con varios sistemas de neurotransmisión. Particularmente, la estimulación de los receptores a glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) en el NAc incrementa la liberación de dopamina (DA), que a su vez está asociada con el incremento en la liberación de acetilcolina (ACh) en la corteza insular (CI). Puesto que la formación de la memoria gustativa requiere de la actividad colinérgica y de la integridad del NAc, se decidió estudiar la participación de la ACh en el NAc durante la formación de la memoria gustativa. Para lograrlo, a través de microdiálisis en libre movimiento se cuantificaron los niveles extracelulares de ACh en el NAc Shell durante el consumo novedoso de una solución de azúcar al 10%, el consumo agudo durante 2 días, y crónico de 14 días de consumo *ad libitum*. Los resultados mostraron que la liberación de acetilcolina aumentó en las ratas que tomaron azúcar por primera vez a diferencia de las ratas que habían tenido una exposición previa, en donde no hubo aumento significativo. En el grupo crónico, la liberación de acetilcolina estuvo por encima de los otros dos grupos, lo cual se podría atribuir a una modificación en su sistema de liberación relacionado a los cambios tras la ingesta prolongada de un sabor dulce.

## 1. ANTECEDENTES

Desde el momento en que nacemos, nuestros cerebros están recibiendo una gran cantidad de información del mundo que nos rodea. Toda esta información que aprendemos y experimentamos se guarda en nuestro cerebro en forma de memorias. (Squire & Kandel, 2000)

Los humanos tenemos diferentes tipos de memoria, se puede clasificar por su temporalidad en corto plazo, dura de segundos a horas, mientras que memoria a largo plazo dura años. También tenemos una memoria de trabajo que nos permite mantener recuerdos por tiempo limitado. Somos tan buenos recordando cosas que tendemos a dar por sentado este logro. Si alguien nos pregunta nuestro número de teléfono o qué fue lo que desayunamos esta mañana, podríamos responder de inmediato, y la facilidad con la que respondemos puede hacer que sea difícil ver qué fenómeno tan notable es este (Cowan, 2008).

Podemos clasificar la memoria de acuerdo a los estímulos sensoriales recibidos en memoria icónica, ecoica, háptica, olfativa y gustativa. Escuchar la radio y recordar la canción de moda, buscar dentro de la bolsa y después de tocar varios objetos por fin reconocer las llaves, llegar a casa y percibir el aroma de nuestra comida favorita y poder saborearla. Es en esta clasificación de memoria en el que trabajaremos en esta tesis, la memoria gustativa o memoria del sabor, ha sido una memoria de suma importancia ya que el consumo de alimentos garantiza la subsistencia, errores en este tipo de memoria han ocasionado daños irreparables e incluso la muerte, y es esta la que nos permitirá saber que es seguro comer y que no lo es (Unsworth, 2014).

La memoria gustativa depende de sustratos neurales que trabajan en conjunto en su procesamiento. Iniciando en la boca con los estímulos recibidos por las papilas gustativas, mandando señales al Núcleo del Tracto Solitario (NTS) y Núcleo parabranchial (NPB), una parte de la información converge en la amígdala basolateral (BLA), otra parte de la información llega al núcleo ventroposterior-

medial del tálamo, de ahí a la Corteza Insular (CI) que es donde se integra con la vía gustativa. En la vía gustativa áreas como la Corteza prefrontal y el NAc interactúan para identificar el sabor (Miranda, 2012).

El NAc tiene un papel importante en el aprendizaje gustativo, regula el consumo de alimento y bebida, se encuentra asociado con el sistema límbico además de que posee proyecciones dopaminérgicas y colinérgicas (Wichman, 2012). El sistema colinérgico se encuentra involucrado en la detección del sabor y por ende en la memoria del mismo (Haam, 2017).

El objetivo de este trabajo fue evaluar a través de microdiálisis en libre movimiento los cambios en los niveles extracelulares de Ach en el NAc shell durante el consumo por primera vez de una solución de azúcar al 10%, este fue el grupo novedad, familiar con consumo de azúcar por dos días y crónico tras un consumo de 14 días.

### 1.1. Memoria y Aprendizaje

Se han hecho diversas metáforas para estudiar y entender la memoria, algunos la conciben como un registro de las experiencias vividas como una tableta de cera, otras implican que hay diferentes tipos de recuerdos, de conocimiento y momentos de nuestra vida, por lo tanto los recuerdos se almacenan en diferentes lugares, haciendo la comparación de la memoria con una biblioteca. En contraste con esta idea, otro concepto es que también pueden interconectarse como una red. La memoria no es pasiva y tenemos algunas metáforas que capturan algunas de sus características más dinámicas. Por ejemplo, el proceso de recuperar un recuerdo específico dentro del caótico cumulo de memorias de nuestras vidas ha llevado a la idea de que buscar recuerdos es como tratar de buscar algo en un bote de basura (Camos, 2018).

La memoria y el aprendizaje son procesos vitales esenciales desde hace millones de años en los organismos para la adaptación, la evolución y la supervivencia,

provocando cambios en los patrones de conducta a través de modificaciones físicas en el cerebro. Estos cambios son dependientes de la experiencia para la obtención de nueva información, que requieren desde cortos períodos hasta grandes períodos de tiempo, reflejados como adecuaciones anatómicas incluyendo la estructura del cerebro, favoreciendo al organismo para su adaptación al medio en que se encuentra (Téllez *et al.*, 2002).

Podemos definir al aprendizaje como la adquisición de nueva información o nuevas conductas, como el almacenamiento y evocación de esa información (Anderson, 2001). El aprendizaje es un fenómeno más general, y uno de sus componentes es la memoria. El aprendizaje implica memoria de forma indispensable, pero implican más fenómenos como atención, percepción, operaciones cognitivas como análisis, síntesis, categorizaciones, etc. (Bermúdez-Rattoni, 2001).

Una de las definiciones de memoria más recientes propuesta por Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá en el 2001, describe nuestra capacidad para usar el conocimiento adquirido como producto de la experiencia, uno de esos atributos del organismo que, al igual que el sentido del tacto o el equilibrio, pasan normalmente inadvertidos pero cuya ausencia puede resultar devastadora. La memoria, de tal forma nos permite generar estrategias, habilidades, artes, maniobras, alternativas, etc., para mostrar nuestra creatividad; usar las experiencias para sobrevivir en el futuro, incluso predecir cambios del medio ambiente que pueden ser desfavorables y así planear mejores tácticas contra las grandes situaciones cambiantes de la vida (Téllez *et al.*, 2002).

#### 1.1.1. Conceptos básicos de la memoria

Para poder formar una memoria se requieren de tres procesos básicos: la adquisición de la información, su consolidación y la evocación.

**Adquisición.** Es la etapa inicial de la memoria y se le conoce como codificación, en donde la información (dato, sensación o acontecimiento) es procesada y llega a nuestro cerebro, asociando distintos factores que son de importante

relevancia, como el análisis, la síntesis, la categorización, la relación con información previa, etc.; siendo de gran importancia el factor que proporciona un significado a esa información, ya que se retiene con mayor facilidad (Salmon y Butters, 1987).

Consolidación. El almacenaje de información no es inmediato, se necesita tiempo para que la información procesada a corto plazo se fortalezca y se almacene en memoria a largo plazo. Al proceso que permite que la información se mantenga por más de 24 horas en humanos, se denomina consolidación, e incluye los procesos necesarios para que ocurran los cambios plásticos en el cerebro que generen las representaciones físicas de las experiencias (Téllez et al., 2002).

Evocación. Es la recuperación de la información, a través de los diferentes procesos y estructuras cerebrales que contienen las representaciones de las experiencias (Stickgold, 2005).

### 1.1.2. Clasificación de aprendizaje

#### 1.1.2.1. Aprendizaje asociativo

Es un tipo de aprendizaje muy común, mediante el cual un sujeto aprende por la asociación entre dos o más fenómenos. Este aprendizaje supone un cambio en la conducta del sujeto que lo adquiere, hasta el punto de anticipar que determinadas estimulaciones o acciones van a acarrear la llegada de otros estímulos o consecuencias (Haselgrove, 2016).

Condicionamiento clásico. También conocido como pavloviano, es uno de los tipos de aprendizaje asociativo más básicos pero a la vez más fundamentales que se han investigado. Dos estímulos están relacionados debido a la percepción de que ambos suceden de manera contingente y próxima en el espacio y en el tiempo, observándose de manera repetida que la aparición o desaparición de un estímulo antecede o se encuentra relacionada con la aparición o desaparición de otro (Kirsch, 2004).

Condicionamiento operante. A diferencia del condicionamiento clásico, en donde el estímulo incondicionado (EI) se presenta sin importar si el organismo da una respuesta o no, en el condicionamiento instrumental el estímulo incondicionado es el resultado directo de la conducta (Gluck, Mercado y Myers, 2009).

#### 1.1.2.2. Aprendizaje no asociativo

Contrario al anterior, este tipo de aprendizaje es el que se da a través de un estímulo que cambia nuestra respuesta por ser repetitivo y continuo. Tolman, demostró con el fenómeno de aprendizaje latente (Tolman y Honzik, 1930) que los organismos pueden aprender acerca del entorno que les rodea por simple exposición a la situación, en ausencia de reforzamiento. La fuerza de la respuesta inicialmente evocada por un estímulo puede aumentar (sensibilización) o disminuir (habituaación) a consecuencia de tal exposición (Sauerhöfer, 2012).

Habituaación. Es una disminución en la respuesta innata ante un estímulo como consecuencia de la experiencia repetida con éste.

Sensibilización. Es un aumento en intensidad de la respuesta ante cualquier acontecimiento ambiental tras la exposición a un estímulo intenso (Klein, 1994). La sensibilización puede entenderse como el proceso opuesto a la habituaación.

#### 1.1.3. Tipos de memoria

Sensorial. Es muy breve, dura entre 200 y 300 milisegundos e inmediatamente desaparece o se transmite a la memoria a corto plazo. Su utilidad tiene que ver con el aquí y ahora. La información puede ser de tipo visual, auditiva, olfativa, gustativa (Cowan, 2008).

Corto plazo. También llamada operativa, selecciona y procesa la información de la memoria sensorial transformandola en una experiencia más significativa. Pueden permanecer de 5 a 15 segundos.

Largo plazo. Dura semanas, meses o incluso toda la vida. La información seleccionada para formar parte de la memoria a largo plazo, es retenida hasta

que deba ser evocada, la capacidad de almacenamiento es prácticamente ilimitada. Se ha dividido en dos tipos: declarativa y no declarativa (Schacter, 1996), también llamadas explícita e implícita (Knowlton & Squire, 1996).

Declarativa. Se compone de hechos y eventos que recordamos de forma consciente como la letra de nuestra canción favorita (Cousins, 2019).

No declarativa. También conocida como procedimental se almacena de manera inconsciente. Está implicada en el aprendizaje de diversas habilidades, un ejemplo de ello es andar en bicicleta. Es complicado expresarse con palabras, para corroborar su aprendizaje se necesitan pruebas implícitas.

## 1.2. Memoria del sabor

La memoria del sabor puede definirse como el almacenamiento de la información del sabor que podrá guiar ingestas futuras; incorpora las características intrínsecas del alimento como su valor hedónico asociado y sus características nutritivas o tóxicas asociadas al sabor (Gutiérrez et al., 2003; Núñez-Jaramillo, 2009).

La memoria del sabor surgió originalmente como una táctica de supervivencia humana. Desde el punto de vista evolutivo la memoria gustativa tiene gran relevancia debido a que nos permite discriminar cuáles estímulos son familiares y cuáles son novedosos. El aprendizaje de la asociación entre un estímulo gustativo y malestar gastrointestinal es una aversión aprendida que ha sido vital para numerosas especies, tal aversión puede impedir futuros envenenamientos. Este aprendizaje determinará la selección de la dieta de cada individuo, siendo característico en las especies omnívoras (Molero, 2007).

### 1.2.1. Modelos de aprendizaje gustativo

Los modelos utilizados en el aprendizaje gustativo permiten evaluar los procesos necesarios durante el reconocimiento de un estímulo novedoso, además de permitir el análisis de las etapas de adquisición, consolidación y evocación. Los modelos de aprendizaje gustativo se pueden clasificar en apetitivos y aversivos, éstos permiten evaluar los aspectos hedónicos de la recompensa o aversión por el mismo estímulo (Núñez *et al.*, 2010).

El reconocimiento del sabor es un modelo robusto que nos permite analizar los procesos de aprendizaje y memoria, asimismo es una herramienta para estudiar los diferentes estadios implicados en ella, i.e. codificación, almacenamiento y recuerdo (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Al consumir un sabor nuevo se genera una respuesta inicial de neofobia, que es un comportamiento innato que nos permite mejorar la evaluación de las consecuencias tras su ingestión, esto es útil para evitar la ingesta de sustancias tóxicas, un claro indicador es el menor consumo del sabor novedoso. La respuesta neofóbica dispara diversos eventos celulares involucrados en el aprendizaje y el recuerdo de las consecuencias apetitivas o aversivas de un estímulo gustativo. En caso de que se presenten malestares viscerales o toxicidad tras la ingesta, se desarrollará una aversión al sabor y se rechazará en ocasiones futuras, este aprendizaje se denomina aversión gustativa (AG). En cambio, si luego de la ingesta las consecuencias son positivas, el sabor se reconoce como seguro y se consumirá en mayor cantidad en futuras presentaciones. Este fenómeno es conocido como atenuación de la neofobia (AN) (Shinohara, 2019).

#### 1.2.1.1. Memoria apetitiva del sabor

El consumo de un alimento por primera vez suele hacerse con cautela, disminuyendo la cantidad ingerida como respuesta instintiva ante lo nuevo hasta evaluar las consecuencias en el organismo posteriores a su ingestión; a esto se le conoce en términos generales como neofobia al sabor. Si el alimento no generó síntomas de intoxicación, se crea una memoria gustativa segura, de tal forma que el consumo del alimento en el futuro se incrementará significativamente. A dicho incremento se le conoce como atenuación a la neofobia (Domjan, 1977; Ramos,

2020) y lleva a la formación de una memoria incidental gustativa. Adicionalmente, la asociación del sabor con características hedónicas o nutritivas, inducen a la formación de memorias que llevan a desarrollar preferencias gustativas condicionadas asociadas con consecuencias reforzantes, llevando a un incremento del consumo e interpretada como memoria de sabor apetitiva (Núñez-Jaramillo et al., 2009). En el laboratorio hay diferentes modelos para estudiar este tipo de memoria; por ejemplo, habituación, preferencia al sabor y atenuación de la neofobia (Nuñez-Jaramillo et al., 2010).

### 1.3. Percepción de los sabores

El sentido del gusto es un sistema quimiosensorial especializado, dedicado a la evaluación de sabores. Los sistemas gustativos detectan compuestos nutricionalmente relevantes y dañinos en los alimentos y desencadenan conductas innatas que conducen a la aceptación o rechazo de posibles fuentes de alimento (Yarmolinsky, 2009).

La sensación gustativa se produce por el estímulo de receptores específicos que están distribuidos por la cavidad oral. Para que se produzca dicho estímulo las sustancias químicas deben entrar en contacto físico con el receptor. En el humano existen dos sentidos químicos, el gusto y el olfato, íntimamente relacionados. El procesamiento de los estímulos gustativos inicia en la boca mediante los receptores agrupados en las papilas gustativas localizadas en la lengua, paladar, laringe, faringe y epiglotis (Lalonde y Eglitis 1961; Oakley, 1986; Smith y Frank 1993). Se ha estimado que en la lengua existen alrededor de 10,000 papilas gustativas, conteniendo cada una de 50 a 150 células receptoras gustativas, localizando su mayoría en la superficie dorsal de la lengua y decreciendo en número con la edad (Ojeda & Icardo, 2004; Kosslyn y Rosenberg, 2004; Purves et al., 2004).

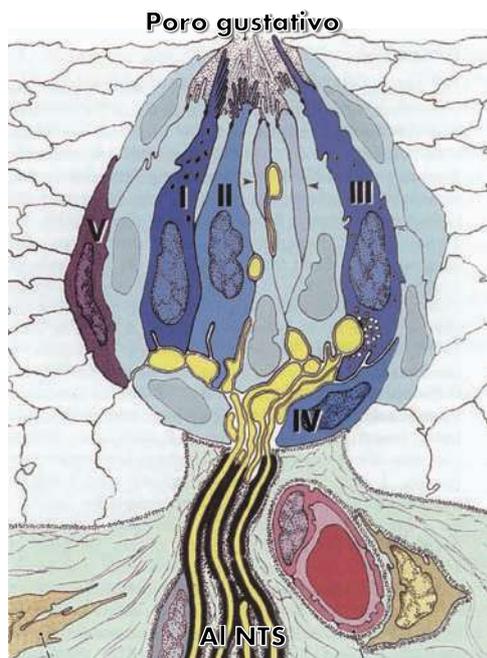


Figura 1. Papila gustativa. Las papilas gustativas se conforman por tres tipos de células receptoras (I, II, III). Las células de tipo IV son células basales y las de tipo V son células marginales. Modificado de Witt, 2019.

Cada botón gustativo consta de cuatro tipos de células (ver Figura 1), las tipo I que son delgadas y densas con una función de soporte, presentan corrientes iónicas implicadas en la transducción del sabor salado, las tipo II son claras y finas con pequeñas vellosidades en su extremo apical y las tipo III similares a las anteriores en forma y densidad pero con vesículas sinápticas en el área central, unas con contenido de acetilcolina y otras que almacenan catecolaminas, poseen receptores de transducción para el sabor dulce, amargo y umami. Las células tipo II y III son las encargadas de la transmisión sensorial, aunque las tipo III son las que realmente establecen sinapsis con las fibras nerviosas y median la transducción del sabor ácido. Las células tipo IV son consideradas como células progenitoras; también se piensa que actúan como “interneuronas” (Witt, 2019).

Estos receptores se conocen como células receptoras gustativas (TRC, por sus siglas en inglés) y se han descrito 3 tipos de ellas (tipo 1, 2 y 3). Se pueden encontrar TCR de todos los tipos en cada papila gustativa, lo cual significa que todas las papilas tienen la capacidad de procesar los cinco sabores básicos que son: dulce (asociado con carbohidratos), salado (asociado con sales y minerales),

amargo (asociado con alcaloides), agrio (asociado con ácidos) o umami (asociado con aminoácidos) (Chandrashekar et al., 2006).

### 1.3.1. Estructuras cerebrales involucradas en la memoria del sabor

Las rutas de procesamiento gustativas y viscerales para la formación de la memoria del sabor han sido ampliamente estudiadas a través de métodos anatómicos y electrofisiológicos (Bermúdez-Rattoni, 2004; Yamamoto, 1994), asociando estructuras con funciones elementales para su formación. Cuando las sustancias ingeridas activan a las TRC, se inician cascadas de activación, mediadas por la liberación de neurotransmisores, que envían información sobre las propiedades químicas de los sabores (ver Figura 2) a través de los nervios facial (VII, inerva la lengua anterior), glossofaríngeo (IX, inerva la lengua posterior y lateral) y vago (X, inerva los receptores en la faringe, laringe y epiglotis) hacia la parte rostral del Núcleo del tracto solitario (NTS) (Gutierrez y Sidney, 2001).

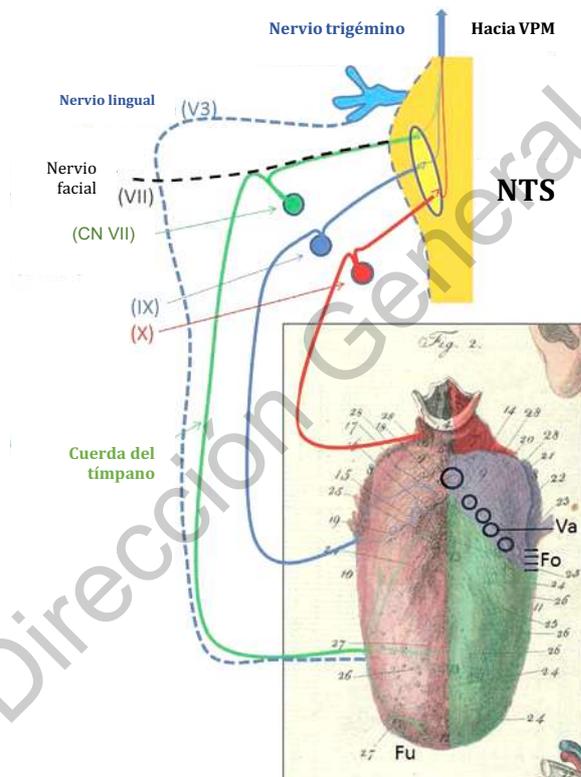


Figura 2. Esquema de la inervación gustativa de la lengua y la epiglotis. Modificado de Witt, 2019. Las fibras gustativas de la cuerda del tímpano (CT;

verde) inervan papilas fungiformes (Fu), que se distribuyen en los dos tercios anteriores de la lengua (área verde del lado izquierdo). Las fibras de CT acompañan al nervio trigémino. La parte posterior de la lengua está inervada por el nervio glossofaríngeo (área azul). Las fibras gustativas reciben estímulos de las papilas valladas (Va; marcadas con un círculo) y foliadas (Fo; área marcada con líneas). Las fibras gustativas del nervio vago inervan la epiglotis (área roja). Los nervios gustativos proyectan al tronco encefálico activando ahí la primera región del sistema nervioso central, el NTS.

Las proyecciones eferentes de la parte rostral del NTS conectan con el Núcleo parabraquial (NPB) el cual, a su vez, distribuye la información gustativa a través de la vía tálamo-cortical o a lo largo de la vía anterior-ventral como se muestra en la Figura 3. El NPB proyecta hacia tres zonas específicas: la región parvocelular del núcleo ventroposterior medial del tálamo (VPMpc), el núcleo central de la amígdala (cAMY) (Gutierrez y Sidney, 2001); estructura fundamental encargada de procesar el valor hedónico, no sólo de lo que se come, sino también de una gran gama de experiencias (Nuñez-Jaramillo et al., 2010). Y, finalmente, el hipotálamo lateral (HL).

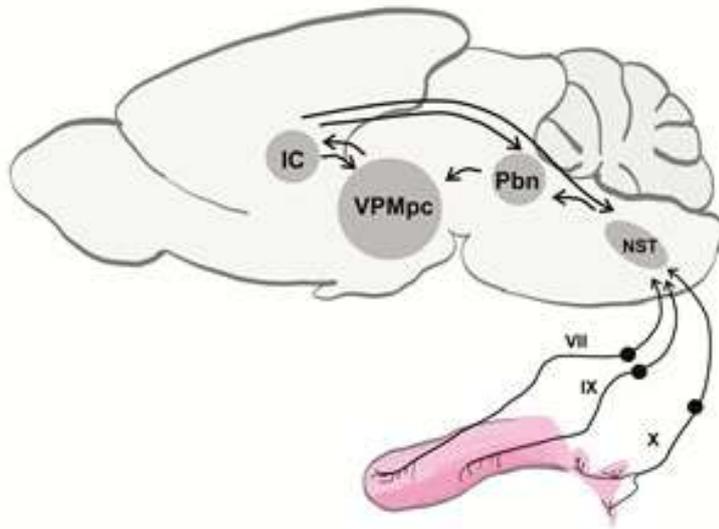


Figura 3. Esquema de las rutas centrales del sabor activadas a partir del NTS. Ohla, 2019.

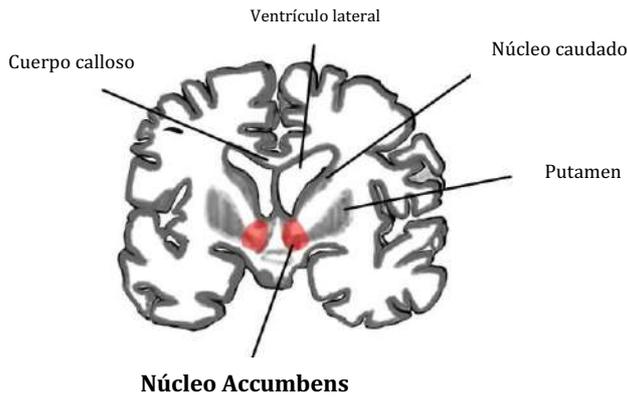
Por su parte, el VPMpc proyecta a la corteza gustativa (CG) (Gutierrez y Sidney, 2001), que funciona como una estructura integradora; ya que sus neuronas son capaces de responder a sabores, temperatura, tacto, dolor y al estado de las vísceras (Hanamori et al., 1998). Además, la corteza gustativa (CG) tiene una función primordial para representar el valor hedónico de los sabores que se adquiere con la experiencia de su ingestión (Nuñez-Jaramillo et al., 2010). Posteriormente, la CG proyecta hacia la corteza orbitofrontal (COF), a la que en ocasiones se le llama corteza gustativa secundaria. Por otro lado, la CG posee proyecciones recíprocas con cAMY, el cual, a su vez, proyecta recíprocamente con el HL. Finalmente; cAMY, HL, CG y COF poseen conexión unidireccional con el NAc. Con el paso del tiempo y de los estudios, se han asociado nuevos circuitos que participan en la formación de la memoria del sabor como la corteza perirrinal, la corteza prefrontal medial (CPFm) y muy importantemente con el NAc, el cual define la mayoría de los componentes de la vía gusto-recompensa (Núñez-Jaramillo et al., 2009).

En cuanto a la formación de memoria gustativa segura, parece implicar un circuito que incluye áreas del lóbulo temporal en el cerebro de la rata, destacando áreas como el hipocampo; la corteza insular, cuya lesión excitotóxica impide la atenuación de neofobia y cuya actividad, mediante la proteína c-Fos, varía con la familiaridad del sabor; la amígdala basolateral, estructura cuya lesión impide la atenuación de neofobia al sabor y modifica la actividad de c-Fos en otras áreas relacionadas, como la corteza perirrinal, estructura que muestra una mayor actividad de la proteína c-Fos ante la presentación de sabores novedosos (Yiannakas, 2017).

En lo que se refiere a las preferencias condicionadas al sabor, además de la participación de áreas cerebrales implicadas en el procesamiento del sabor, destaca la participación de los circuitos de neurotransmisión del sistema de reforzamiento que depende del circuito dopaminérgico mesocorticolímbico y en el que el núcleo accumbens juega un papel esencial. El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico comparte conexiones anatómicas funcionales con estructuras del circuito de procesamiento de sabores (Liu, 2018).

#### 1.3.1.1. Núcleo accumbens

El NAc está localizado en el cerebro medio rostrobasal (ver Figura 4) y es el principal componente del estriado ventral. Anatómicamente el NAc está subdividido en tres regiones: El NAc core y NAc shell, las cuales ocupan dos tercios de la estructura y son claramente diferenciadas. El tercer compartimento corresponde al NAc rostral o polo rostrobasal (Delfs et al., 1998). Éste recibe una significativa inervación que corresponde a la principal entrada dopaminérgica proveniente del área ventral tegmental (VTA), inervación glutamatérgica procedente del hipocampo, amígdala y corteza prefrontal, así como una inervación noradrenérgica del locus coeruleus (LC) y del NTS. Así, mismo, el NAc establece conexiones salientes GABAérgicas con el pálido ventral y el VTA (Redolar, 2014).



**Núcleo Accumbens**

Figura 4. Corte coronal de cerebro mostrando el Núcleo Accumbens. Magalhães, 2017.

#### 1.4. Sistema colinérgico

La transmisión colinérgica involucra todas las sinapsis donde la acetilcolina (ver estructura molecular, Figura 5) actúa como principal neurotransmisor, la cual se descubrió en 1921 y fue el primer neurotransmisor caracterizado tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central de los mamíferos. La acetilcolina tiene actividad en una variedad de órganos, sus principales funciones son las motoras, neuroendocrinas, parasimpáticas y sensoriales. La acetilcolina es una molécula orgánica cuya fórmula es  $C_7H_{16}O_2$ , y puede actuar como neurotransmisor excitatorio así como inhibitorio a través de sus dos principales receptores: los nicotínicos y los muscarínicos.

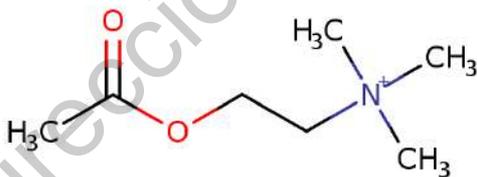


Figura 5. Estructura molecular de la Acetilcolina

Todas las regiones de la corteza cerebral están inervadas por acetilcolina, por lo que no es de extrañar que la función cortical esté fuertemente influida por la acetilcolina. Por ello varios grupos neuronales están relacionados esencialmente con fenómenos de activación cortical, el paso del sueño a la vigilia y también con la memoria. Así la actividad colinérgica es esencial para mantener el ritmo hipocampal.

Por otra parte, las lesiones en el núcleo basal de Meynert en animales de experimentación provocan pérdida de memoria, que se revierte tras la administración de agonistas. Las vías corticales procedentes de este núcleo juegan un papel preponderante en los procesos de aprendizaje mediante cambios en la liberación cortical de acetilcolina, que modulan la respuesta cortical a un determinado estímulo.

Las vías colinérgicas del hipocampo parecen estar también involucradas en procesos de memoria y asociación. El conjunto, la inervación colinérgica de áreas corticales límbicas, sugiere su participación en procesos de consolidación de la memoria y componentes emocionales.

Finalmente, las neuronas colinérgicas del estriado juegan un papel primordial en el control de la actividad motora. La degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson origina un predominio colinérgico, con hipertonia y rigidez. Por el contrario, la degeneración de las neuronas intrínsecas estriatales, características de la corea de Huntington, origina una hiperactividad dopaminérgica que se caracteriza por movimientos estereotipados.

#### 1.4.1. Síntesis.

Por neurotransmisión colinérgica se entiende el conjunto de sinapsis que tienen a la acetilcolina como neurotransmisor. La biosíntesis de la acetilcolina tiene lugar en el axoplasma de la terminación nerviosa colinérgica en un solo paso enzimático, a saber, la acetilación de la colina por la acetil coenzima A (acetil-CoA), proceso en el que interviene la enzima colina acetiltransferasa (CAT) (Ver

Figura 6). La enzima CAT se encuentra ubicada, en su mayor parte, en los terminales nerviosos, en estrecha relación con la síntesis y liberación de acetilcolina, aunque también se ha detectado en el resto de estructuras neuronales. La CAT parece relativamente específica de las neuronas colinérgicas. Gracias al uso de anticuerpos frente a esta enzima, se sabe que la enzima se sintetiza en el soma neuronal, y posteriormente es transportada a lo largo del axón hasta la terminación nerviosa colinérgica, que será donde tenga lugar la síntesis de acetilcolina.

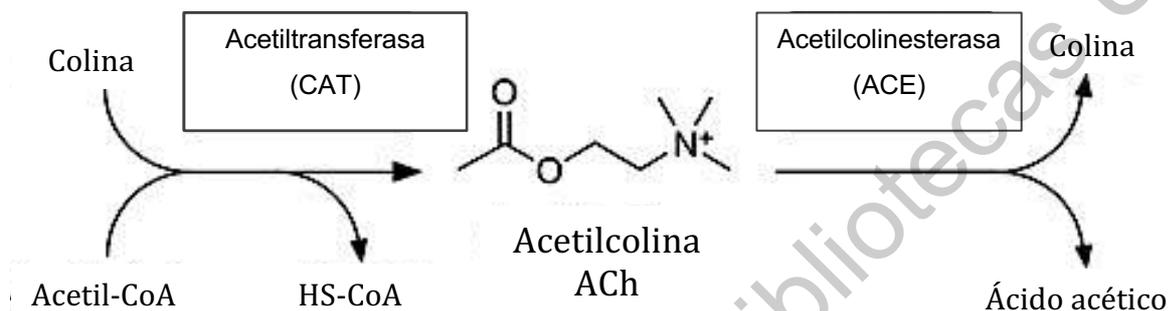


Figura 6. Síntesis de Acetilcolina. Modificada de Izumi, 2018.

La acetil-CoA necesaria para la síntesis de la acetilcolina se fabrica principalmente en la mitocondria, y puede derivarse de la glucosa, del citrato y del acetato mientras que la colina puede provenir de tres fuentes, a saber:

1. Colina plasmática: se sintetiza principalmente en el hígado y va a penetrar en las terminaciones colinérgicas valiéndose de dos transportadores ubicados en el plasmalema, uno de baja afinidad (presente en la mayoría de las células) y otro de alta afinidad (específico de las terminaciones nerviosas colinérgicas) dependiente de la presencia de sodio extracelular y de adenosina trifosfato (ATP).
2. Del metabolismo de la fosfatidilcolina de la membrana plasmática, de la propia neurona colinérgica. Este lípido de la membrana plasmática puede provenir de la dieta o ser sintetizado en el hígado.
3. Del espacio intersináptico: la colina que se produce en la propia sinapsis colinérgica como consecuencia de la degradación enzimática de la acetilcolina va

a ser recapturada de nuevo hacia la terminación colinérgica, utilizando los mismos transportadores que la colina plasmática. Se estima que aproximadamente un 50-80% de la colina empleada en la síntesis de la acetilcolina posee este origen, lo que supone una fuente adicional de este precursor de la síntesis del neurotransmisor (Flores Soto y Segura Torres, 2005).

En condiciones fisiológicas, se estima que la concentración plasmática de colina es de alrededor de 10  $\mu\text{M}$ , y la  $K_m$  del transportador de colina es de 1-5  $\mu\text{M}$ , con lo que el suministro de colina a la terminación colinérgica para la síntesis de acetilcolina está de sobra garantizado. Farmacológicamente, el transportador de colina de alta afinidad se caracteriza porque puede ser bloqueado por hemicolinio, así como por fármacos que puedan interferir con el gradiente intracelular de  $\text{Na}^+$ , entre otros la ouabaína, el 2,4-dinitrofenol o la azida sódica.

#### 1.4.2. Liberación

La acetilcolina recién sintetizada es almacenada fundamentalmente en el terminal colinérgico presináptico, y puede hacerlo de tres formas:

1. De forma libre, disuelta en el citoplasma
2. En vesículas sinápticas, en ocasiones asociada a otro neurotransmisor
3. Asociada lábilmente a membranas y susceptible, por lo tanto, de desprenderse con facilidad.

En condiciones de reposo, las moléculas de acetilcolina pueden liberarse espontáneamente al espacio sináptico en forma molecular o cuántica, originando los "potenciales miniatura" (MEPP) en la membrana postsináptica, cuya magnitud está considerablemente por debajo de la necesaria para iniciar el potencial de acción. Las vesículas sinápticas son la base morfológica de la descarga cuántica, en su interior contiene la cantidad mínima de moléculas de acetilcolina necesarias para producir los MEPP que se observan espontáneamente en la membrana postsináptica. El almacenamiento de la acetilcolina en el interior de las vesículas sinápticas se realiza mediante un transportador cuya estructura primaria está

compuesta por doce dominios transmembranales con los dominios aminoterminal y carboxilterminal en el citoplasma. El proceso de acumulación en el interior vesicular del sustrato se realiza mediante un proceso de intercambio protónico dependiente de la acción de una ATPasa-H<sup>+</sup>-dependiente, quien crea el gradiente electroquímico por acumulación de protones en el interior de la vesícula que serán intercambiados por el transportador, por acetilcolina y ATP (Ver Figura 7). Este proceso de captación puede ser inhibido estereoespecíficamente por el vesamicol, por fármacos que inhiben la ATPasa-H<sup>+</sup>-dependiente como la N-metilmaleimida, tributilina o bafilomicina y por fármacos que disipan el gradiente protónico intracelular.

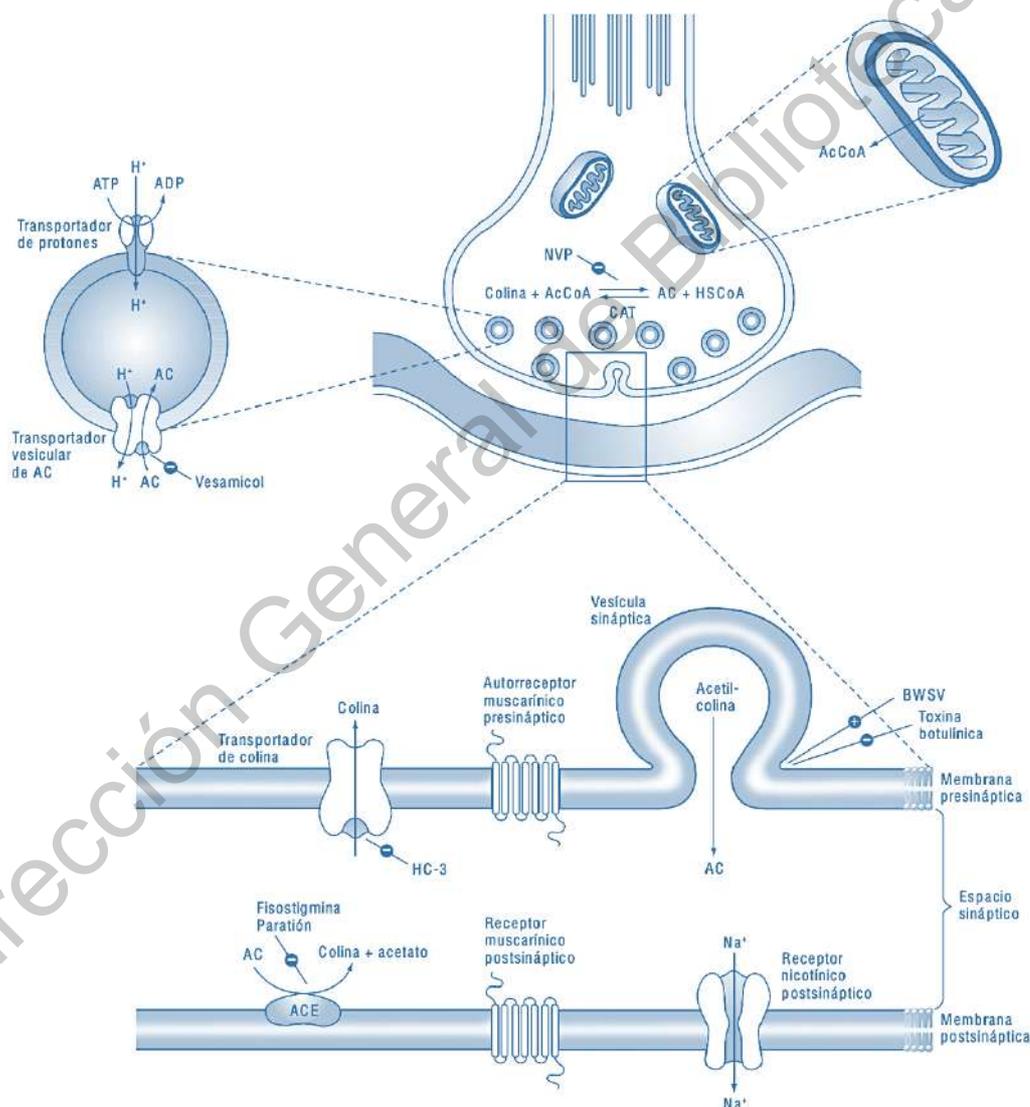


Figura 7. Sinapsis de Acetilcolina. Florez, 1988.

Cuando un potencial de acción despolariza la terminación colinérgica, provoca de forma rápida y pasajera la abertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana presináptica, con lo que el  $\text{Ca}^{2+}$  penetra en el interior a favor del gradiente electroquímico. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la terminal servirá para activar la denominada maquinaria de la exocitosis formada, entre otras, por proteínas plasmalemales (syntaxina, SNAP-25) y vesiculares (sinaptobrevina), además desencadena la movilización de la acetilcolina, tanto de la fracción que está en forma libre como de la asociada a las vesículas sinápticas. Éstas interactúan con la membrana presináptica y descargan su contenido en el espacio sináptico; posteriormente retornan y se recuperan. Si la estimulación nerviosa es muy prolongada, disminuye el número de vesículas de la terminal, pero su síntesis se recupera con mayor rapidez que la de la propia acetilcolina.

Existen sustancias que inhiben la liberación de acetilcolina. Entre ellas destacan las toxinas producidas por el *Clostridium botulinum*, el *Clostridium tetani* o la excretada por la araña viuda negra  $\alpha$ -latrotoxina. Las neurotoxinas del grupo de los *Clostridia* son la toxina tetánica y siete serotipos de toxina botulínica (A-G). La activación neurotóxica requiere la rotura del puente disulfuro de las cadenas polipépticas, posibilitando la interiorización de la cadena ligera en cuya secuencia se encuentra el dominio proteásico responsable de la inactivación.

La propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica la despolariza, lo que permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje. La apertura de estos canales permite que en su vecindad se formen zonas de alta densidad de  $\text{Ca}^{2+}$ , donde su concentración llega a ser de hasta 1000 veces la concentración en reposo.

El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  afecta a diversas proteínas, entre ellas, aquellas involucradas en la exocitosis, en un proceso donde la sinaptotagmina, parece funcionar como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , que termina de manera súbita el proceso de fusión de la vesícula una vez que se han formado complejos por

proteínas como la syntaxina, la SNAP-25, el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) y proteínas de unión a NSF o SNAPs.

#### 1.4.3. Regulación

El proceso de neurotransmisión requiere, para su efectividad, una delimitación tanto espacial como temporal.

Una vez liberada al espacio intersináptico, la acetilcolina interactúa con sus receptores para ejercer las acciones específicas en cada órgano y es degradada inmediatamente. Si bien la acetilcolina puede hidrolizarse espontáneamente, este proceso es cien millones de veces más rápido con enzimas colinesterásicas en el espacio intersináptico y que la desdoblan en acetato y colina, sustrato que será rápidamente recaptado por el terminal presináptico gracias al SRCAA.

En los vertebrados se encuentran presentes dos tipos de colinesterasas: la acetilcolinesterasa (ACE) y la butirilcolinesterasa (BuCE). Se especula con una función protectora de la ACE por parte de la BuCE, ya que hidroliza acetilcolina a concentraciones que causarían la inhibición de la ACE e interactúa con multitud de inhibidores, pudiendo proteger de esta manera la ACE de ser inhibida.

La regulación de la síntesis se debe al hecho de que la bomba de colina de alta afinidad resulta inhibida por un exceso de acetilcolina y acelerada por bajos niveles lo que hace que resulte como punto de control (Prado, 2002).

#### 1.4.4. Recaptura y degradación

Los efectos del neurotransmisor concluyen con la desactivación enzimática o la recaptura en el botón terminal.

En la recaptura de colina, ésta entra en las neuronas colinérgicas a través de dos transportadores:

1. Un transportador de alta afinidad dependiente de simporte de  $\text{Na}^+$  (que también cotransporta  $\text{Cl}^-$ ). Tiene una  $K_M$  de 1-5  $\mu\text{M/L}$ , por enzima de la cual se satura.
2. Un transportador de baja afinidad, no saturable, y no dependiente de  $\text{Na}^+$  ni específico de neuronas colinérgicas que, aunque puede transportar la colina principalmente transporta la propia acetilcolina. Tiene una  $K_M$  de 100  $\mu\text{M/L}$ .

Una vez producida la acetilcolina en el terminal es capaz de inhibir a la enzima responsable de su síntesis, la colina acetil transferasa en un feedback negativo.

El catabolismo de la acetilcolina ocurre en la hendidura sináptica, en este sitio se localiza la acetilcolinesterasa que hidroliza en fracciones de segundo a la acetilcolina en colina y acetato. La colina es recapturada nuevamente por la presinápsis para iniciar un nuevo ciclo de síntesis del neurotransmisor.

#### 1.4.5. Receptores

Los receptores de membrana, cuya función principal es la transducción de señales, pueden dividirse en dos tipos:

1. Los receptores que permiten la apertura de canales iónicos, como los nicotínicos para ACh,  $\text{GABA}_A$  y los de glicina, que poseen un sitio de unión para el neurotransmisor y contiene el canal iónico responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula.
2. Un segundo tipo de receptor que interactúa con proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteína G), como los colinérgicos de tipo muscarínico (Chen, 2019).

##### 1.4.5.1. Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs)

Los ligand-gated ion channels (LGICs), o receptores ionotrópicos, por sí mismos constituyen un canal iónico donde su activación permite un flujo selectivo de iones al interior celular, como podemos ver en la Figura 8, y este modifica el potencial

de reposo de la neurona. El grado de despolarización o hiperpolarización de la membrana celular determina la generación o no de la señal propagada y, por tanto, de la transmisión de la información.

Los LGICs pertenecen a la superfamilia de canales iónicos que incluye: receptores de glutamato (NMDA, kainato, AMPA), receptores purinérgicos de ATP (P2X), y miembros de la subfamilia de receptores de tipo cys-loop (CL) que comprende receptores: nicotínicos de acetilcolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, glicina, serotonina y de zinc. Estructuralmente, los receptores tipo cys-loop presentan dos cisteínas altamente conservadas en el dominio amino terminal importantes para la unión del ligando y, todos sus miembros, están constituidos por cinco subunidades dispuestas de forma asimétrica formando un poro por donde se da el flujo iónico.

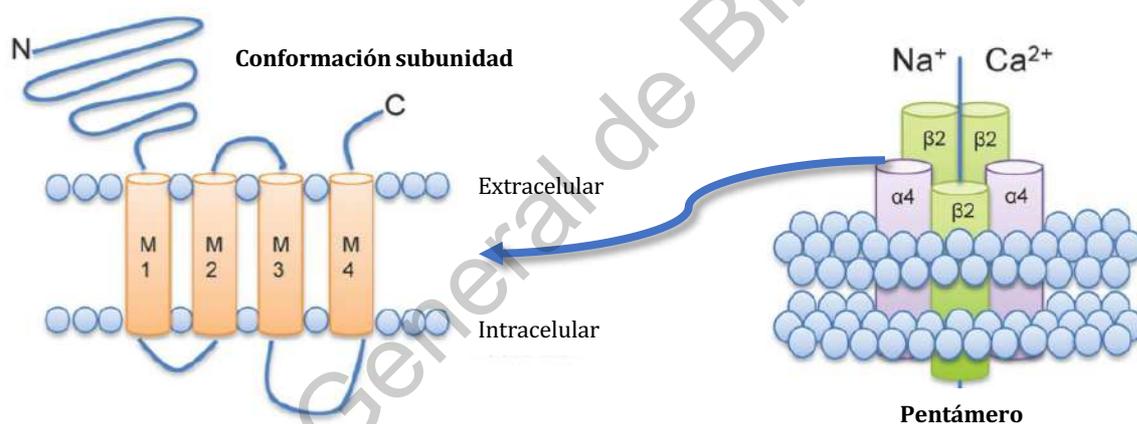


Figura 8. Receptor nicotínico. Modificada de Hendrickson, 2013.

Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4), en forma de  $\alpha$ -hélice, un dominio amino y otro carboxilo terminal localizados en la región extracelular, así como un dominio citoplasmático con sitios de fosforilación. Los aminoácidos que constituyen la  $\alpha$  hélice del segmento TM2 presentan propiedades anfipáticas y conforman el poro del receptor.

Las distintas combinaciones de las subunidades favorecen un número elevado de receptores nicotínicos de acetilcolina con propiedades farmacológicas y

localizaciones muy variadas. Los receptores nicotínicos pueden localizarse en neuronas, unión neuromuscular o en los ganglios autónomos y según la naturaleza de los receptores nicotínicos muestran variaciones aún cuando sean codificados por genes homólogos.

Los receptores nicotínicos son pentámeros compuestos por distintas subunidades, tal como lo muestra la Figura 8. En los vertebrados existen diecisiete subunidades homólogas que componen los receptores nicotínicos ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), siendo la configuración más frecuente la compuesta por dos subunidades  $\alpha$  idénticas, una  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$ ; relacionadas en secuencia y estructura terciaria formando un poro central.

La distribución cerebral de los receptores nicotínicos es relativamente homogénea y no se restringe a determinadas vías. Sin embargo, es más densa en algunas regiones como el tálamo, la corteza y los ganglios basales. Su ubicación puede ser presináptica, postsináptica o perisináptica y, en comparación con los receptores muscarínicos de acetilcolina, presenta una menor densidad cerebral.

Ya que los receptores nicotínicos forman canales permeables a los cationes, la unión de la acetilcolina a estos receptores origina un flujo de iones positivos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Donde principalmente se produce entrada de iones sodio y una salida de iones potasio específicamente para los receptores ( $\alpha 3$ )( $\beta 4$ ) y ( $\alpha 4$ )( $\beta 2$ ), aunque también se ha descrito la entrada a la célula de iones calcio en el caso de los receptores ( $\alpha 4$ )( $\beta 2$ ) y ( $\alpha 7$ ).

#### 1.4.5.2. Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs)

Los receptores muscarínicos son elementos esenciales de la transmisión colinérgica de muchos procesos fisiológicos: transmisión interneuronal en el SNC, ganglios vegetativos y plexos nerviosos, contracción del músculo liso, génesis y conducción de estímulos cardíacos, y secreciones exocrina y endocrina. Aunque inicialmente se consideró que los receptores muscarínicos pertenecían a una sola especie, la diferente selectividad de algunos receptores en territorios específicos, mostrada frente al antagonista pirenzepina, inició un proceso de diferenciación de subtipos de receptores que culminó con el clonado al menos de cinco subtipos

moleculares. Todos ellos presentan una estructura molecular enteramente diferente de la de los nicotínicos. Pertenecen a la gran familia de receptores de membrana que presentan siete dominios transmembranales, asociados a proteínas G (Ishii, 2006).

Los receptores muscarínicos mAChRs se encuentran asociados a una proteína con acción enzimática (GTPasa) y se les conoce como receptores acoplados a nucleótidos de guanina o receptores acoplados a proteína G (GCPRs) (Ver Figura 9). La cantidad de GCPRs es muy abundante habiéndose descrito más de 1000 tipos distintos. Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARs) y los mAChRs forman parte de este tipo de receptores y son los que se encuentran mejor caracterizados estructuralmente (Maeda, 2019).

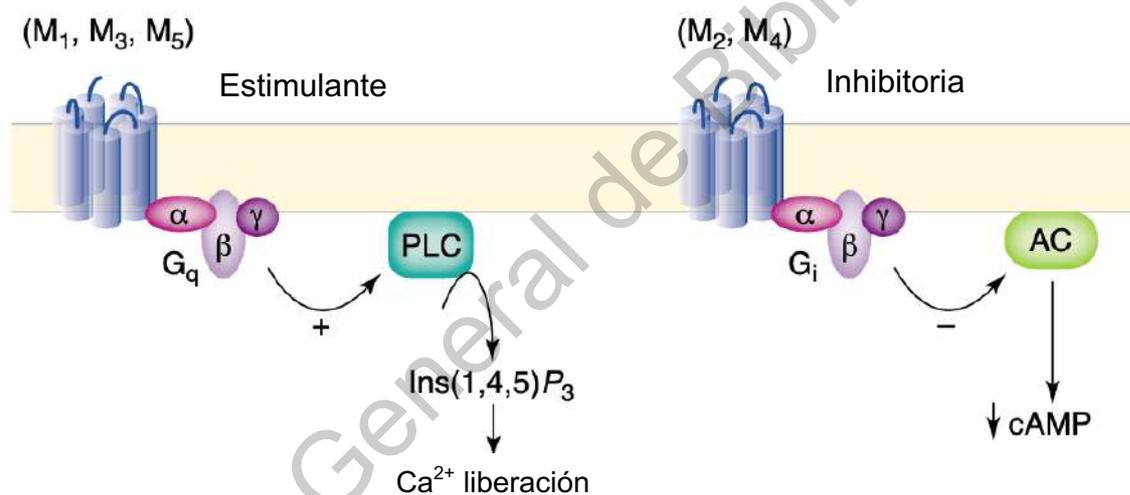


Figura 9. Receptor muscarínico. Modificado de Eglén, et cols. 2001.

Todos los subtipos de receptores muscarínicos se encuentran distribuidos en neuronas del SNC, repartidos de forma irregular, ubicados en zonas neuronales, dendritas y terminaciones axónicas tanto de neuronas colinérgicas como no colinérgicas. En las neuronas ganglionares del sistema vegetativo, incluidas las de los plexos mientéricos de la pared gástrica, se encuentran preferentemente receptores M1. En los tejidos periféricos, los receptores M2 predominan en el corazón (nodos sinoauricular y auriculoventricular, y músculo auricular) y, en

mucho menor grado, en otras células musculares lisas. Los receptores M3 se encuentran principalmente en células secretoras y en células musculares lisas. Los M4 están presentes en las células endoteliales vasculares, en neuronas ganglionares, vasos deferentes y útero (Kruse, 2012).

#### 1.4.6. Vías colinérgicas

El sistema colinérgico podría ser el sistema neurotransmisor neuromodulador más importante en el cerebro. La distribución y morfología de las neuronas colinérgicas es muy variada. Las que tienen axones cortos se pueden considerar como interneuronas, son muy abundantes en el estriado, donde establecen una estrecha relación funcional con las neuronas dopaminérgicas, cuyas terminales son muy abundantes en esta zona. Los núcleos de los pares craneales tienen también abundantes interneuronas colinérgicas, lo mismo que toda la médula espinal. Otras interneuronas colinérgicas se encuentran en la corteza cerebral de los roedores, pero no tienen su equivalente en primates. Se distribuye en una variedad de núcleos diferentes, de los cuales dos grupos el prosencéfalo basal y pedunculopontina tienen proyecciones divergentes extensas y, en la corteza y el tálamo, incluido el núcleo reticular, también tienen proyecciones convergentes.

Las proyecciones colinérgicas desde el prosencéfalo basal hasta la corteza y el tálamo se consideran esenciales para controlar la atención selectiva, y el hecho de que el 90% de las proyecciones del tronco encefálico hacia el tálamo sean colinérgicas es de particular interés en vista de la importancia del tálamo en conciencia consciente.

Las vías cerebrales colinérgicas con axones largos tienen una localización más difusa que las aminérgicas, y no siempre sus cuerpos celulares se corresponden con núcleos definidos. La vía colinérgica que sale de la base del cerebro anterior, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el septum, la banda diagonal de Broca, pallidum ventral y, sobre todo el núcleo basal de Meynert, se extiende hasta el bulbo olfativo, corteza, amígdala y/o hipocampo, quedando toda la vía del sistema de recompensa cerebral bajo su influencia.

Se han realizado diversas descripciones de las vías colinérgicas, Sir Henry Dale (1973), fue el primero que planteó la hipótesis de la presencia central de transmisión colinérgica. La demostración de la presencia en el sistema nervioso central de acetilcolina y colina acetil transferasa, síntesis de ACh y liberación de ACh en el SNC, y los efectos centrales y periféricos de muscarínicos y anticolinesterasas.

- Vía Septo-hipocampal

Esta vía es una de las mejores vías colinérgicas descritas. A diferencia del cuerpo estriado, la gran mayoría de la inervación colinérgica del hipocampo, el bulbo olfatorio, la amígdala y el neocórtex proviene de fuentes extrínsecas localizadas en el prosencéfalo basal. El neocórtex y el hipocampo de roedores adultos contienen cuerpos celulares intrínsecos ChAT positivos que pueden proporcionar aproximadamente el 30% de su inervación colinérgica. Por lo tanto, las fuentes extrínsecas representan hasta el 70% de la entrada colinérgica cortical en el cerebro de los roedores y esta proporción puede ser incluso mayor en el primate adulto.

El septum ocupa una posición fundamental en el cerebro, conectando los centros inferiores del SNC con las áreas límbicas. Se han identificado muchas vías que proyectan desde estos centros inferiores hasta el septum. Las neuronas dopaminérgicas proyectan hacia el septum lateral desde el Tegmento Ventromedial.

Se ha descubierto que esta vía dopaminérgica ejerce una influencia inhibitoria sobre la vía colinérgica del hipocampo septal. Se ha descubierto que la apomorfina, agonista dopaminérgico de acción directa, reduce la tasa de renovación de ACh (TRACH) en el hipocampo. Además, la inyección local del antagonista de la dopamina, haloperidol, o el agotamiento de la dopamina septal mediante la inyección local de 6-hidroxidopamina en el tabique o el área AIO da como resultado un aumento de la TRACH del hipocampo.

Sin embargo, dado que las terminales nerviosas dopaminérgicas están ubicadas en el tabique lateral y los cuerpos celulares colinérgicos están ubicados en el

tabique medial, se debe involucrar una interneurona para conectar los dos. Un candidato más probable para este neurotransmisor es GABA. La inyección intraseptal del agonista de GABA muscimol, como la apomorfina, reduce la TRACH en el hipocampo.

- Neuronas colinérgicas corticales

Existe mucha evidencia de que la fuente principal de las terminales colinérgicas ubicadas en la corteza cerebral es un grupo de cuerpos celulares ubicados cerca del área septal. Una fuente de neuronas colinérgicas que se proyectan a la corteza cerebral es un grupo de neuronas que se ubican en la extremidad ventromedial del globo pálido y se extiende caudalmente desde el septum al NBM. Se ha encontrado que las proyecciones a las estructuras neocorticales mediales están inervadas por estructuras más rostrales y las proyecciones a las estructuras neocorticales más orientadas lateralmente están inervadas por células ubicadas caudalmente.

Esta vía podría considerarse parte de la vía ventral tegemental propuesta por Shute y Lewis (1975). Se sabe que las neuronas colinérgicas corticales se ven afectadas por una serie de fármacos con poderosos efectos conductuales. Tanto la corteza como el área septal reciben proyecciones serotoninérgicas de los núcleos dorsal y medial de raphe; por lo tanto, existe la posibilidad de una interacción entre estas neuronas y las colinérgicas corticales. La proyección colinérgica del prosencéfalo basal hacia la corteza también está regulada por un mecanismo GABAérgico fásicamente activo.

- Neuronas Colinérgicas estriatales

El estriado contiene una de las mayores concentraciones de ACh. El complejo estriado tiene cuatro componentes principales de los cuales todos contienen neuronas colinérgicas: el caudado y el putamen, denominados colectivamente neostriado, y el tubérculo olfatorio y el núcleo accumbens también conocido como estriado límbico. La concentración de neuronas colinérgicas en el estriado límbico es particularmente alta alrededor de las islas de Calleja. Estas neuronas no parecen tener proyecciones fuera del cuerpo estriado. De hecho, el complejo

estriado proporciona el ejemplo más conocido de una estructura telencefálica que recibe casi toda su entrada colinérgica de las interneuronas del circuito local. Además de estas proyecciones locales, el cuerpo estriado también recibe lo que probablemente sea una inervación colinérgica relativamente menor de las neuronas positivas para ChAT del prosencéfalo basal. Por otra parte, se han reportado receptores muscarínicos y nicotínicos en el estriado. Los nicotínicos parecen estar localizados en terminales serotoninérgicas y catecolaminérgicas. Parece ser que las neuronas colinérgicas son intrínsecas de esta área.

El parkinsonismo refleja una deficiencia de dopamina en el cuerpo estriado. Una de las vías más conocidas del SNC es la vía dopaminérgica nigroestriatal, que se proyecta desde la zona compacta de la sustancia negra al caudado-putamen. Se sabe que la ACh interactúa de manera recíproca con la dopamina en el cuerpo estriado. La dopamina inhibe la descarga neuronal en el cuerpo estriado y los agonistas dopaminérgicos aumentan el contenido estriado de ACh, presumiblemente debido a una disminución en la liberación.

La interacción entre ACh y DA en el cuerpo estriado también puede incluir un enlace GABAérgico. Otra proyección del cuerpo estriado que parece regular las neuronas colinérgicas del estriado es la vía corticoestriatal, que muy probablemente utiliza el neurotransmisor excitador, el glutamato.

Los resultados de Mitchell (1980) predecirían un aumento en la liberación de ACh por agentes miméticos de GABA, a menos que se localice una interneurona inhibidora entre las neuronas de ACh y glutamato.

- Proyecciones colinérgicas al núcleo interpeduncular

El núcleo habenuar medial contiene neuronas ovaladas, ligeramente positivas a ChAT. Aunque no se ha comprobado esto directamente mediante métodos de transporte e inmunohistoquímicos combinados, es razonable suponer que estas neuronas envían proyecciones colinérgicas al núcleo interpeduncular a través del tracto habenulo-interpeduncular.

La mayoría de los receptores son nicotínicos, también hay algunos receptores muscarínicos. La mitad de las neuronas colinérgicas que terminan en el núcleo

interpeduncular surgen en otra parte, pero atraviesan la habénula. Los resultados de Lehmann y Fibiger (1981) respaldan aún más una fuente extra-habenular de neuronas colinérgicas interpedunculares. Usando histoquímica de AChE en combinación con difluorofosfato, han reportado una probable proyección colinérgica desde la rama horizontal del núcleo de la banda diagonal hacia el núcleo interpeduncular.

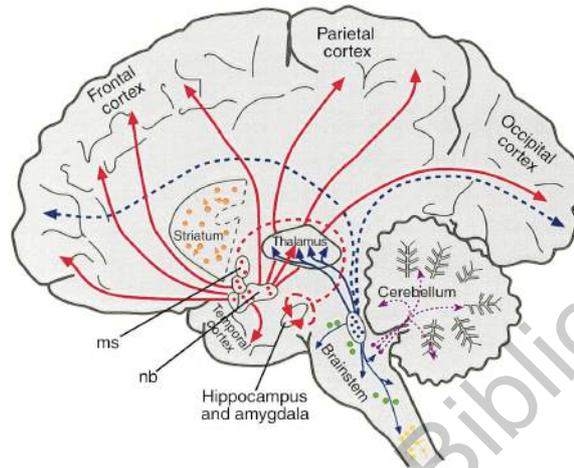


Figura 10. Sistemas colinérgicos en el cerebro humano. Perry et al., 1999. Las dos vías principales se proyectan ampliamente a diferentes áreas del cerebro: neuronas colinérgicas basal-prosencéfalo (rojo), y neuronas tegmentarias dorsales dorsales pedunculopontino-laterales (azul). Las interneuronas estriadas (naranja), núcleos de pares craneales (círculos verdes), núcleos vestibulares (violeta); y preganglionares y motoneuronas de la médula espinal (amarillo) forman parte de otros grupos de neuronas colinérgicas.

#### 1.4.7. Sistema colinérgico y la memoria del sabor

La acetilcolina, es un neurotransmisor involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria (Squire & Davis, 1981). Particularmente el NBM es el núcleo colinérgico que proyecta hacia la CI (Malenka, Nestler, & Hyman, 2009).

Se ha reportado que la actividad colinérgica está involucrada en el procesamiento de sabores novedosos tales como azúcar, ya que al probar este sabor por primera vez se inducen incrementos en los niveles extracelulares de acetilcolina dentro de la corteza insular (CI), cambio que no se refleja cuando el sabor se vuelve familiar (Miranda & Bermúdez-Rattoni, 2007).

El desempeño de los animales durante el aprendizaje gustativo varía en función de los niveles de ACh. En el mismo sentido, la administración de fármacos agonistas colinérgicos facilita la memoria del sabor, mientras que los antagonistas de los receptores de ACh provocan un deterioro de la misma (Ruetti et al., 2009).

La estructura cerebral principalmente implicada en la memoria del sabor es la CI. Por ejemplo, para investigar el papel del sistema colinérgico sobre la memoria gustativa se midió la liberación de ACh en la CI en respuesta a la novedad del sabor (Miranda, Ramírez-Lugo & Bermúdez-Rattoni, 2000). En este trabajo se observó, a través de microdiálisis, que la liberación de ACh era mayor ante el sabor novedoso, lo cual se relacionaba con un menor consumo de estos animales. Por el contrario, cuanto menos novedoso era el sabor, mayor era el consumo del estímulo gustativo y se producía menos liberación de ACh. En relación a la AG, también pudo observarse una liberación de ACh en la CI durante la adquisición de esta tarea (en la cual se presenta igualmente un sabor novedoso), pero no durante el recuerdo de la misma (Miranda & Bermúdez-Rattoni, 1999). Es decir, la novedad induce la liberación de ACh en ambos paradigmas.

Acorde a los resultados de Berman et al., (2000) la administración del fármaco antes del estímulo gustativo deterioró el aprendizaje de AG, tanto al evaluar esta memoria a corto plazo (4h luego del condicionamiento) como a largo plazo (24h). Sin embargo, el antagonista muscarínico no fue efectivo cuando se administró antes del EI o del test, se podría concluir que el sistema colinérgico se encuentra involucrado en la detección del sabor y por ende en la memoria del mismo (Ferreira, Gutiérrez, De La Cruz & Bermúdez-Rattoni, 2002; Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, De La Cruz, Núñez-Jaramillo & Bermúdez-Rattoni, 2003; Gutiérrez, Téllez & Bermúdez-Rattoni, 2003; Ramírez-Lugo, Miranda, Escobar, Espinosa & Bermúdez-Rattoni, 2003). Sin embargo, estos resultados no señalan que este sistema de neurotransmisión esté implicado en la adquisición de la asociación entre el sabor y sus consecuencias.

De modo aún más específico, Ramírez-Lugo et al. (2003) estudiaron qué tipo de receptores muscarínicos se encuentran implicados en la AG, sus resultados indicaron que el sistema colinérgico a través de los receptores post-sinápticos

tiene un papel importante en las etapas tempranas de la formación de memoria gustativa, pero su antagonismo no afecta el recuerdo si el bloqueo de los receptores se produce luego de que se consolidó la información. En contraste con lo anterior, Naor y Dudai (1996) hallaron que el fármaco sí deterioró la memoria de AG. Las discrepancias entre estos resultados pueden deberse, por ejemplo, a la dosis utilizada en cada uno de los trabajos, ya que la de Ramírez-Lugo et al., (2003) fue de 0.5mM, mientras que la de Naor y Dudai fue de 1mM (1996).

En varios trabajos también se analizó el papel de los antagonistas muscarínicos sobre la memoria del sabor a través del paradigma de AN. Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz et al. (2003), Gutiérrez, Téllez et al. (2003), así como Núñez-Jaramillo et al. (2008), estudiaron el efecto de la escopolamina administrada en la CI sobre la AN. La droga se administró de modo previo o posterior a la presentación del estímulo novedoso, y se halló que ambos tratamientos impiden la atenuación de la neofobia observada en el grupo control, es decir, que los animales bajo el efecto de la droga mostraron un menor consumo del EC (sacarina) cuando se presentó posteriormente. Además, investigaron el efecto tiempo-dependiente del antagonista inyectándolo 15min, 30min, 2h, 4h, 8h y 12h luego de la ingesta del sabor novedoso. Luego de 24h de esa primera ingesta, se evaluaron a los sujetos y observaron que la escopolamina previene la AN cuando es inyectada 15min, 30min, 2h y 4h luego del consumo de la sacarina. Cuando el fármaco se administra luego de esos intervalos ya no afecta la consolidación de la información acerca del sabor novedoso.

Además de la CI, existen otras regiones cerebrales involucradas en la memoria del sabor, aunque los sistemas que controlan no son específicos de la memoria gustativa, sino del procesamiento general de la información. Se sabe que el sistema de memoria compuesto por el lóbulo temporal medial (hipocampo y áreas adyacentes, como la corteza entorrinal, perirrinal, y parahipocampal) funciona como un almacén temporal de la memoria, mientras que la neocorteza actuaría como un depósito más permanente y a largo plazo, y es independiente del funcionamiento del lóbulo temporal medial (Álvarez & Squire, 1994). Más específicamente, la corteza perirrinal es un área de asociación que al ser dañada

induce múltiples déficit cognitivos, y aquí la actividad colinérgica es sumamente relevante. En esta región se integran distintos tipos de información sensorial, y sus células parecen estar involucradas en la formación de la huella de memoria pero no en el proceso asociativo o en el recuerdo de la aversión aprendida (Gutiérrez, De La Cruz, Rodríguez-Ortiz & Bermúdez-Rattoni, 2004).

Para evaluar la participación del sistema colinérgico en la corteza perirrinal sobre la memoria del sabor, Gutiérrez et al. (2004) realizaron los procedimientos de AG y AN, y administraron escopolamina antes o después de la presentación del sabor novedoso. Los resultados son similares a los hallados en la CI. En la AG, el antagonista muscarínico administrado de modo previo al EC deterioró el condicionamiento, tanto cuando se evaluó la memoria a corto plazo como a largo plazo. Sin embargo, la escopolamina no tuvo efecto cuando se administró luego de la presentación del sabor novedoso, por lo que esta droga no interfiere con la asociación entre la traza de memoria y el malestar gastrointestinal. Debido a que el efecto de la escopolamina sobre la AN y la AG varía en función del momento en el cual se administra el fármaco, puede concluirse que ambos procedimientos inciden sobre procesos corticales diferentes una vez que el animal probó el sabor y formó la huella mnémica del mismo, aversiva o apetitiva.

La actividad colinérgica demuestra un papel determinante en la memoria del sabor, específicamente en la codificación y el reconocimiento de los estímulos novedosos, y de sus consecuencias.

### 1.5. Núcleo accumbens y la memoria gustativa

Las investigaciones acerca de la función NAc se han enfocado principalmente en recompensa, adicción y motivación (Gutierrez y Sidney, 2001; Weiss et al., 1992; Mongenson et al., 1980). Sin embargo, también existen evidencias que indican que el NAc juega un papel crucial durante la formación de la memoria, debido a que comparte conexiones anatómicas funcionales con una gran variedad de estructuras que se encuentran íntimamente involucradas con el circuito de

procesamiento de los sabores (Pedroza-Linás et al., 2009; Ramírez-Lugo et al., 2006 y 2007). Se ha sugerido que durante el desarrollo de la memoria gustativa el NAc tiene una participación importante (Maldonado-Irizarry *et al.* 1995; Kelley and Swanson 1997; Rada *et al.* 1997; Stratford y Kelley 1997; Saul'skaya y Mikhailova 2003), ya que permite integrar las señales gástricas-vagales relacionadas con los procesos digestivos (Mehendale *et al.* 2004) y también se ha demostrado su participación durante la detección de sabores novedosos disminuyendo la actividad neuronal espontánea (Lee et al., 1998).

El NAc core proyecta hacia el pálido ventral, al núcleo entopeduncular y la sustancia nigra compacta (Heimer et al., 1991). Por otro lado, el NAc shell proyecta hacia la parte medial del pálido ventral (PV), el hipotálamo, el área ventral tegmental, núcleo parabraqueal y la sustancia nigra compacta (Zaham, 2000).

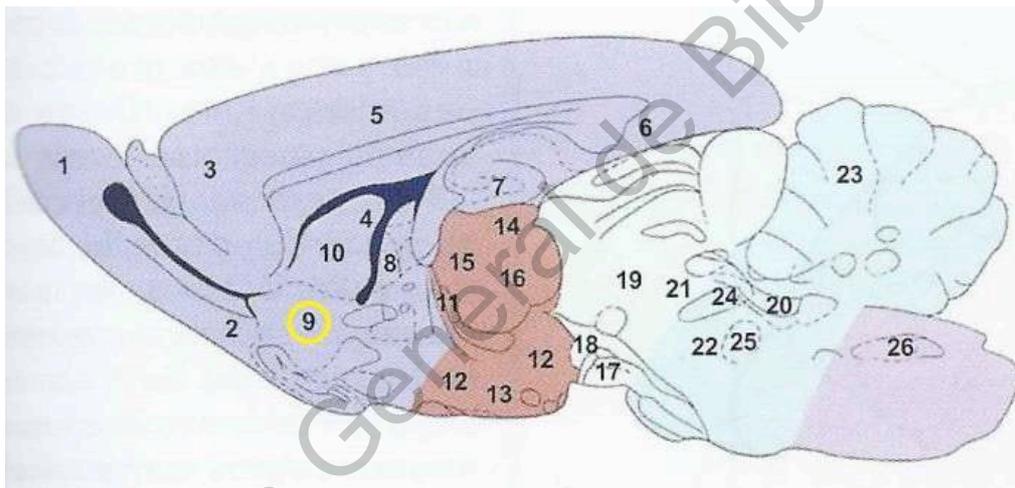


Figura 11. Representación esquemática del NAc en el cerebro de rata. Ubicado en la región anterior rostral del cerebro (número 9, círculo amarillo). Modificada de Redolar, 2014.

Diversos trabajos en la literatura indican que el NAc-shell y el NAc-core difieren histoquímicamente en términos de sus proyecciones aferentes y eferentes por lo que producen respuestas diferenciales hacia una gran variedad de estímulos. Por ejemplo, existen evidencias que muestran que ambas subregiones se encuentran implicadas en la formación de la memoria aversiva, sin embargo, en la formación

de una memoria segura está implicado solamente el NAc-shell y muy estrechamente implicado en el procesamiento del valor hedónico de los sabores, ya que la administración intracerebral de agonistas dopaminérgicos en el NAc-shell producen un incremento en el consumo de sabores menos agradables al paladar, tales como Quinina (Bassareo et al., 2002). Por otro lado, Yamamoto et al. (2006), demostraron que lesiones en el área ventral tegmental, cuyas aferencias alcanzan fundamentalmente al NAc-shell, reducen el consumo de azúcar, siendo el sabor dulce preferido frente a sabores salados, amargos y ácidos. Así mismo, la inactivación reversible del NAc-shell mediante la administración intracerebral de anisomicina interrumpe la atenuación de neofobia al sabor.

#### 1.5.1. Relación entre núcleo accumbens y acetilcolina

El papel que juega la actividad colinérgica en torno a la memoria del sabor ha sido ampliamente estudiada ya que se sabe que la acetilcolina está implicada en procesos de atención, procesamiento de información sensorial y su asociación, modula cambios plásticos en la corteza auditiva y somatosensorial.

El NAc está involucrado en la detección novedosa, durante el reconocimiento del sabor, las neuronas del NAc muestran una disminución de su actividad neuronal espontánea al consumir un alimento novedoso (Kelley, 2004). La infusión oral de un sabor apetitivo estimulante, como una dulce solución de chocolate, incrementa rápidamente la liberación de DA (Glass, 1999), en cambio un estímulo aversivo como es una solución salina saturada no altera los niveles basales de DA en el NAc shell (Di Chiara, 2002). Los receptores muscarínicos son cruciales en el NAc shell, pero no en el NAc core, por la formación de cualquiera de las dos, memoria apetitiva o memoria aversiva al sabor. Tomados juntos, parece que el NAc está involucrado no únicamente en la detección de un estímulo novedoso, sino que además en el procesamiento del estímulo con valor hedónico a través de diferentes sistemas de neurotransmisión.

El NAc se divide en dos sub-regiones: parte medial o central denominada Shell que se relaciona con el componente límbico y el lateral o core que se relaciona con el componente motor (Zahm, 2000). El NAc se encuentra implicado en el refuerzo, en la ingesta, en la actividad motriz, en el desarrollo de las adicciones, en los procesos de aprendizaje y memoria, y además es considerado una interfase entre la motivación y el comportamiento dirigido a metas (Pedroza-Llinás, Ramírez-Lugo, Guzmán-Ramos, Zavala-Vega & Bermúdez-Rattoni, 2009).

Los resultados de estos estudios nos permiten concluir que la transmisión colinérgica es necesaria en el NAc Shell tanto en memoria segura como aversiva, por lo que la actividad muscarínica es necesaria para el aprendizaje de un sabor. Bloquear los receptores muscarínicos en un área tan fundamental para el procesamiento del sabor, como el NAc, provoca un deterioro en el aprendizaje de los animales acerca de los sabores que se les presentan, y de sus consecuencias, esto varía de acuerdo a la región del NAc en que se realice el bloqueo (Taha & Fields, 2005)

La actividad colinérgica en la memoria de los sabores, desempeña un papel clave, específicamente en la codificación y el reconocimiento de los estímulos novedosos, y de sus consecuencias (Hampel, 2018).

Se ha demostrado que los sabores dulces debido a su valor hedónico positivo generan una mayor preferencia de consumo, pero poco se sabe acerca de los cambios neuroquímicos producidos en la memoria por efecto del consumo crónico de sabores apetitivos, como es la azúcar.

En la literatura está ampliamente demostrado que el sistema colinérgico, en la corteza insular, estructura que recibe información gustativa, olfativa y visceral, facilita el procesamiento de la relevancia del estímulo incrementando los niveles de ACh en respuesta a un sabor novedoso y disminuye gradualmente a medida que el sabor se vuelve familiar (Miranda et al., 2000), sin embargo, no se conoce si el consumo crónico de azúcar cambia de forma significativa los niveles de ACh en el NAc, estructura que se sabe también tiene una participación importante en el reconocimiento de sabores; por lo que resulta importante conocer los cambios en los niveles extracelulares de ACh, específicamente en el NAc Shell, la

subregión altamente ligada con estímulos apetitivos, comparando el consumo crónico con el consumo novedoso y familiar.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **2. HIPÓTESIS**

Los niveles extracelulares de ACh en el núcleo accumbens shell presentarán cambios significativos dependiendo del grado de familiaridad al azúcar.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. General

Cuantificar por medio de la técnica de microdiálisis en ratas en libre movimiento, los niveles extracelulares de ACh en el núcleo accumbens Shell inducidos por el consumo de azúcar durante la novedad, la familiaridad y después del consumo crónico durante 14 días.

##### 3.1.1. Objetivos específicos

- Determinar si existen diferencias en el peso corporal de los animales, en el alimento consumido y en la ingesta de líquido en los tres grupos experimentales.
- Evaluar los cambios en los niveles extracelulares de ACh en el NAc-shell durante el consumo novedoso, familiar y crónico de una solución azucarada al 10% como único líquido de ingesta disponible.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Sujetos

Se utilizaron 12 ratas macho de la cepa Wistar con un peso 280 a 300 g.

#### 4.1.1. Esquemas del protocolo experimental

Cuadro 1. Esquemas de consumo durante la microdiálisis. Se muestra el protocolo experimental que siguieron los tres grupos con los que se trabajó.

| Tiempo (días) | 1          | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1                  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8       | 9            | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16                    | 17 | 18            | 19        | 20         | 21         | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
|---------------|------------|---|---|---|---|---|---|--------------------|---|---|---|---|---|---|---------|--------------|----|----|----|----|----|----|-----------------------|----|---------------|-----------|------------|------------|----|----|----|----|----|
| Novedad       | Habitación |   |   |   |   |   |   | Consumo Agua       |   |   |   |   |   |   | Cirugía | Recuperación |    |    |    |    |    |    | Linea base Agua       |    | Microdiálisis | Perfusión | Histología |            |    |    |    |    |    |
| Familiar      | Habitación |   |   |   |   |   |   | Consumo Agua       |   |   |   |   |   |   | Cirugía | Recuperación |    |    |    |    |    |    | Linea base Agua       |    | Microdiálisis | Perfusión | Perfusión  | Histología |    |    |    |    |    |
| Crónico       | Habitación |   |   |   |   |   |   | Consumo Azúcar 10% |   |   |   |   |   |   | Cirugía | Recuperación |    |    |    |    |    |    | Linea base Azúcar 10% |    | Microdiálisis | Perfusión | Perfusión  | Histología |    |    |    |    |    |

#### 4.1.2. Habitación

Tras su llegada del bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM, los animales se colocaron en cajas individuales (45 x 25 x 20 cm) dentro del *vivarium* del laboratorio con alimento y agua *ad libitum* durante 7 u 8 días, esto con el fin de lograr la habitación al ciclo invertido de luz-oscuridad: 12 h de luz / 12 h de oscuridad (8 a.m. a 8 p.m.), siendo el ciclo de oscuridad y fase de actividad el que se utilizó para la realización de todos los experimentos. Se mantuvo la temperatura regulada a  $23 \pm 2$  °C y humedad relativa del  $60 \pm 5$  %.

Todos los métodos usados siguieron las normas establecidas por el Comité de Bioética y Cuidado Animal del Instituto de Neurobiología de la UNAM, lo establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Así como también, los lineamientos del buen manejo y ética experimental aplicados internacionalmente para el manejo y uso de animales de experimentación.

#### 4.1.3. Grupos experimentales

Al término de la aclimatación, los animales fueron divididos en tres grupos:

#### 4.1.4. Grupo Novedoso y Grupo Familiar

Durante 14 días los animales tuvieron acceso a alimento sólido (pellets) y a agua *ad libitum*. Diariamente se registró el peso corporal, el peso del alimento y el volumen de líquido consumidos. Todas las mediciones se realizaron en un intervalo de tiempo entre las 11 y las 13 horas todos los días. Al término de este periodo los animales fueron sometidos a cirugía estereotáxica.

#### 4.1.5. Grupo Crónico

Durante 14 días las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a alimento sólido (pellets) y al consumo de una solución de azúcar al 10%. Al igual que para el grupo novedoso y familiar, diariamente se registró el peso corporal, el peso del alimento y el volumen de líquido consumidos. Todas las mediciones se realizaron en un intervalo de tiempo entre las 11 y las 13 horas todos los días y al término de este periodo las ratas fueron sometidos a cirugía estereotáxica.

#### 4.2. Cirugía

Al término del periodo de 14 días, las ratas fueron sometidas a cirugía estereotáxica para ser implantadas unilateralmente con una guía cánula para microdiálisis, bajo profunda anestesia con una mezcla de xilacina y ketamina (3 mL/kg y 7 mL/kg, respectivamente) así como 3 mL de solución salina isotónica para prevenir deshidratación. La cánula fue dirigida al NAc-shell utilizando coordenadas de referencia: anteroposterior, +1.6 mm; lateral, +0.9 mm; ventral, -6.0 mm; desde Bregma según Atlas de Paxinos, 1998 y fijada a cráneo a través de 2 tornillos y acrílico dental. Al final se insertó un estilete en la guía cánula para evitar su obstrucción durante el periodo de recuperación, el cual tuvo una duración de 5 días, durante los cuales los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento y agua para los grupos novedoso y familiar y el grupo crónico, tuvo acceso a un bebedero con agua y a otro bebedero con la solución azucarada al 10%.

#### 4.3. Habitación en la cámara de microdiálisis en libre movimiento

En el último día de recuperación las ratas fueron privadas de líquido por 18 h, a cada rata se le presentó una probeta graduada de 50 mL con 40 mL de líquido según el grupo experimental en un tiempo total de acceso de 15 min (único período de acceso a líquidos por día). El consumo se llevó a cabo dentro de la cámara de microdiálisis. Se registraron los consumos correspondientes a cada probeta en la bitácora (con incertidumbre de 0.5 mL). Este procedimiento se llevó a cabo por tres días consecutivos para habituar a los animales a la cámara y establecer una línea base de consumo.

##### 4.3.1. Esquemas de consumo durante la microdiálisis

- Novedoso. Tuvieron acceso a una solución de azúcar al 10% durante 15 min por un día (día 23) (n=4).
- Familiar. Tuvieron acceso a una solución de azúcar al 10% durante 15 min por dos días (día 23 y 24) (n=4).
- Crónico. Tuvieron acceso *ad libitum* a una solución de azúcar al 10% durante 22 días y en el día de microdiálisis (día 23) solamente tuvieron acceso a sacarosa durante 15 min (n=4).

#### 4.4. Microdiálisis

Al finalizar la línea base las ratas fueron sometidas a los experimentos de microdiálisis según el grupo experimental correspondiente. Ver cuadro 1.

El procedimiento de microdiálisis inició conectando la sonda de microdiálisis de 3 mm (Eicom CX-I-12-03. 807.000.00) a una bomba de microinyección con un flujo constante de 2  $\mu$ L/min de una solución Ringer (pH 7.4) de la siguiente composición: 118 mM NaCl, 2.5mM de CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.7 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> y 1 mM de neostigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE)). Una vez que el flujo fue continuo se insertó la sonda

de microdiálisis a la guía cánula de la rata en el NAc-shell y la rata fue colocada en la cámara de microdiálisis.

Los primeros 60 minutos se consideraron como período de estabilización, tiempo requerido para que los neurotransmisores regresen a sus niveles basales por lo que no se realizó la colecta durante este tiempo. Al término de los 60 min, se tomaron muestras en intervalos de 15 min, colectando 30µL por muestra. El procedimiento general de muestreo de microdiálisis consistió en 17 fracciones: 4 fracciones de liberación basal; en la fracción 5, se presentó la probeta con solución de azúcar al 10%. Después del consumo, se colectaron 9 fracciones más. Las fracciones colectadas fueron congeladas inmediatamente a -30°C o analizadas por HPLC.

#### 4.4.1. Cuantificación de ACh por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizó una columna para separación de acetilcolina (AC-Gel, 2.0mm x 150mm. Eicom 680.050.00). ACh y Ch son eléctricamente inertes y por ello necesitan ser convertidos a  $H_2O_2$  antes de la detección. Para ello se utilizó un reactor enzimático, que contiene la acetilcolinesterasa y colina oxidasa (AC-ENZYM II 3x4mm. Eicom 680.230.00) a 30°C. La elución fue analizada a través de un detector electroquímico con electrodo de platino (EPSILON-BASi) con una ganancia de 10nA a un potencial de 350mV vs electrodo de referencia Ag/AgCl. El flujo se conservó a 0.6 mL/min. La fase móvil estuvo conformada 50 mM de Bicarbonato de sodio, 300mg de octil sulfato de sodio, 50mg EDTA ajustado a pH 8.1 filtrado con 0.22µm y aforado a 1L. Los valores de acetilcolina, se calcularon con base a estándares externos con concentraciones conocidas (curva de calibración de 4 puntos). Los resultados se calcularon a partir de las lecturas del área del pico y los niveles de acetilcolina fueron expresados en pmol/ 20µL.

#### 4.5. Histología

El día posterior al término del protocolo a seguir, las ratas fueron sacrificadas con una dosis de pentobarbital (113.4 mg/kg) y perfundidas intracardialmente con

una solución salina isotónica. Al término de este procedimiento se extrajeron los cerebros y se colocaron en viales en una solución de formaldehído al 10% para conservarlos. Luego de 7 días se cambiaron a una solución de azúcar al 60%, por 6 días. Posteriormente se cortaron en secciones coronales de 50 $\mu$ m usando un micrótopo; las rebanadas obtenidas fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, para teñirlas con la técnica de Nissl (Ver anexo 1). Una vez teñidos se examinaron en un microscopio estereoscópico para determinar el lugar en que la guía cánula de microdiálisis fue colocada, los sujetos cuya sonda de microdiálisis estuvo fuera del NAc shell y que presentaron necrosis tisular, fueron excluidos del análisis (n = 4).

#### 4.6. Análisis estadístico

Se realizó una ANOVA de medidas repetidas seguida de una prueba *post-hoc* de Bonferroni para comprobar las diferencias que hubo en el peso corporal, consumo de alimento y líquido a lo largo de 14 días. Valores menores a  $p < 0.05$  fueron considerados significativamente diferentes.

Por otro lado, se realizó una prueba de ANOVA simple para analizar las diferencias en el consumo de mililitros de solución azucarada durante la prueba de microdiálisis entre los tres grupos experimentales. Los valores menores a  $p < 0.05$  fueron considerados significativamente diferentes.

Para los datos obtenidos de la liberación de los niveles extracelulares de ACh se utilizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas a lo largo de las fracciones de microdiálisis, así como una prueba *post hoc* de Bonferroni, para determinar el valor de diferencia significativa. Los valores menores a  $p < 0.05$  fueron considerados significativamente diferentes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Consumos de líquido, alimento y peso corporal durante 14 días

Durante los 14 días de consumo crónico se midieron los cambios que cada grupo tuvo tanto en peso corporal como en el consumo de alimento y de líquido.

El comportamiento del peso a lo largo de los 14 días se muestran en la (Figura 15). La prueba ANOVA de medidas repetidas no mostró diferencia significativa en el peso corporal entre grupos ( $F_{2,9}=0.872$ ,  $p> 0.05$ ), pero no así debido al día, donde se mostró efecto significativo ( $F_{=13,26}=118.787$ ,  $p< 0.05$ ) y en su interacción ( $F_{26,117}= 2.329$ ,  $p<0.05$ ). La prueba post hoc reveló en el día 12 diferencia significativa entre el grupo crónico con respecto al grupo novedoso y familiar ( $*p<0.05$ ). Y en el día 13 diferencia significativa entre el grupo crónico y familiar ( $#p<0.05$ ). El consumo crónico de azúcar ocasionó una tendencia al aumento con respecto al grupo familiar y novedad en el peso corporal de los animales, mientras que en el grupo novedad y familiar tienen un comportamiento similar a lo largo de los días.

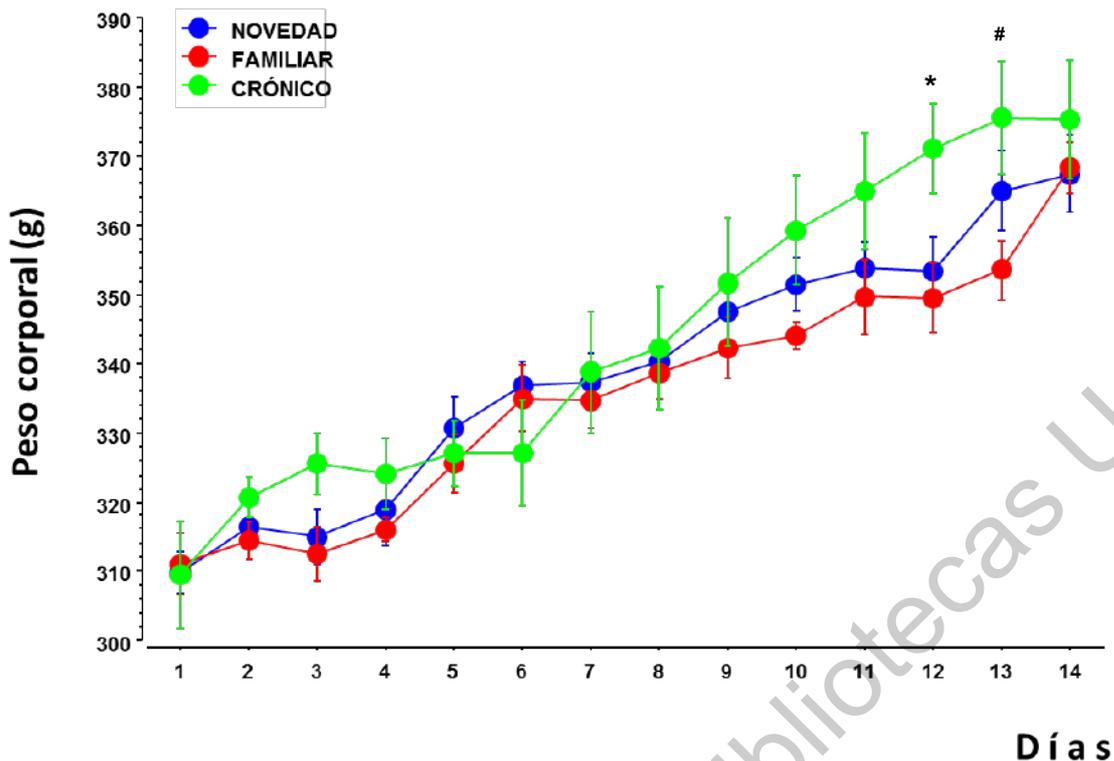


Figura 12. Ganancia de peso durante 14 días. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.05$ .

Los resultados del consumo de alimento a lo largo del periodo de consumo 14 días se muestran en la (Figura 16). La prueba ANOVA de medidas repetidas mostró efecto significativo debido a los grupos ( $F_{2,9}=70.670$ ,  $p < 0.05$ ), los días ( $F_{13,26}=7.715$ ,  $p < 0.05$ ) y a su interacción ( $F_{26,117}=3.540$ ,  $p < 0.05$ ). La prueba post hoc de Bonferroni ( $p < 0.05$ ) no mostró diferencia significativa entre el grupo novedad y familiar. El grupo novedad y crónico difieren significativamente los 14 días de tratamiento con Bonferroni (\* $p < 0.05$ ), mientras que el grupo familiar y crónico muestran diferencia significativa a partir del día 3 y se mantiene hasta el día 14 (# $p < 0.05$ ). La gráfica nos muestra la disminución del consumo de alimento sólido desde el primer día en el grupo crónico y se mantiene a lo largo de los 14 días.

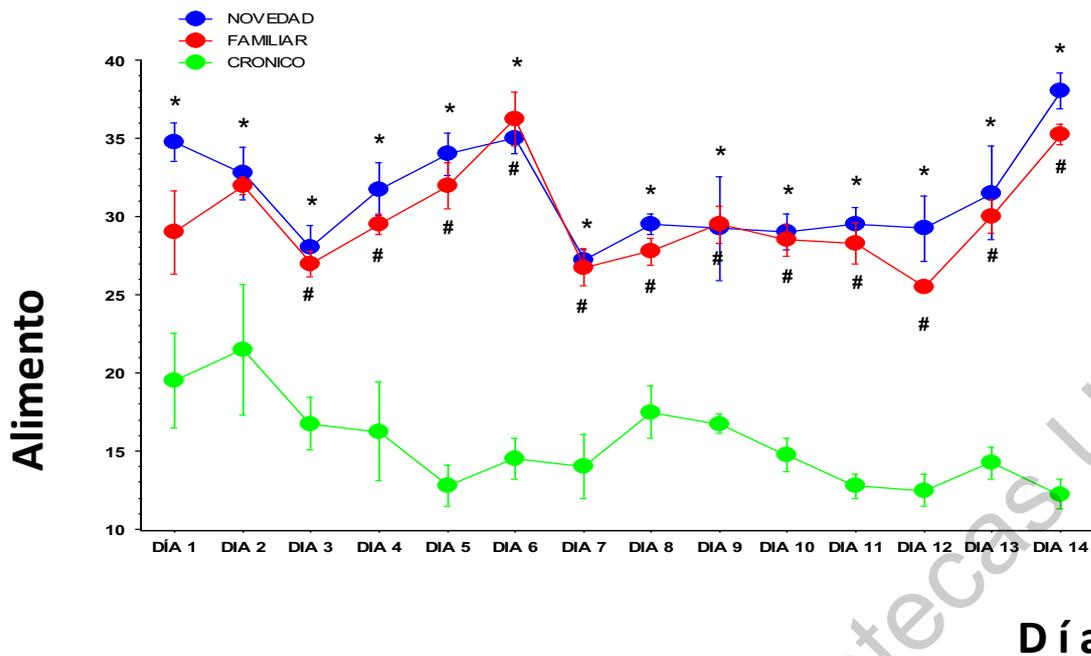


Figura 13. Consumo de alimento durante 14 días. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.05$ .

Así mismo, se encontraron diferencias significativas en la cantidad de líquido que consumieron (Figura 17). La prueba ANOVA de medidas repetidas mostró efecto significativo debido a los grupos ( $F_{2,9}=28.384$ ,  $p < 0.05$ ), los días ( $F_{13,26}=3.356$ ,  $p < 0.05$ ), y efecto significativo debido a la interacción ( $F_{26,117}=1.681$ ,  $p < 0.05$ ).

El grupo familiar y novedad presentan diferencia significativa respecto al grupo crónico, exceptuando los días 5, 7 y 13 (\* $p < 0.05$ ).

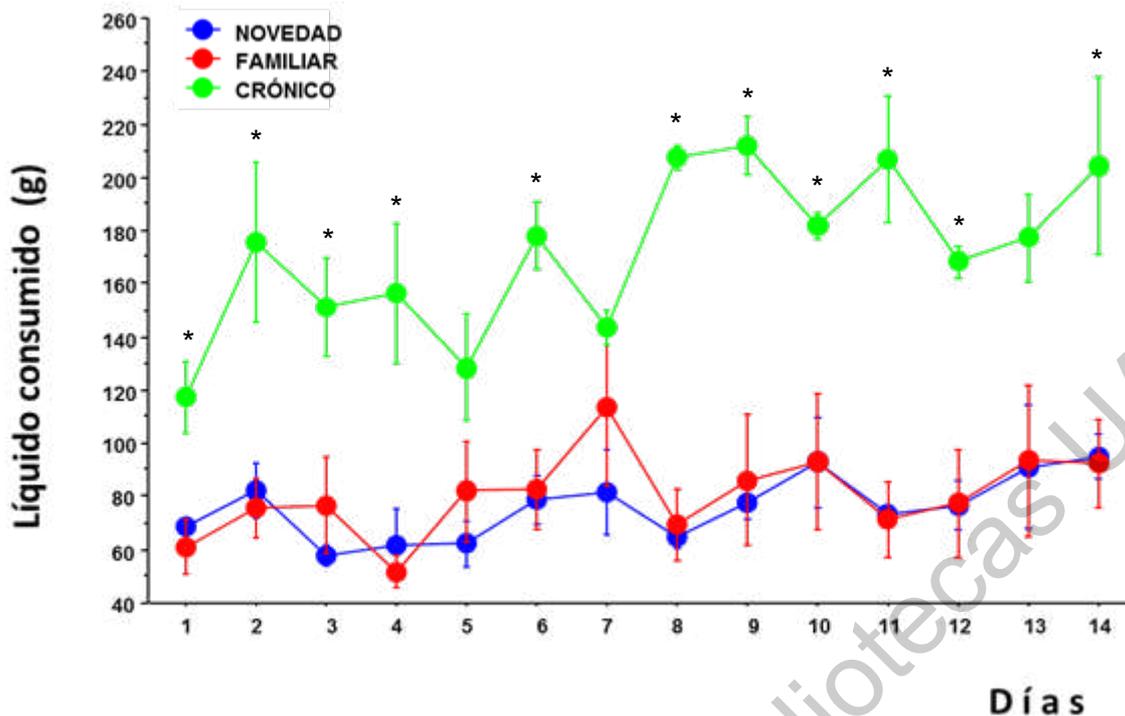


Figura 14. Consumo de líquido durante 14 días. \* $p < 0.05$ .

## 5.2. Histología para ubicar colocación de cánulas y sondas cerebrales

Al concluir el protocolo de microdiálisis, los cerebros fueron teñidos y dichas muestras fueron examinadas en un estereoscopio para determinar la correcta ubicación de la sonda (Figura 18).

Los resultados obtenidos en las histologías, permitieron descartar a aquellas ratas en las que la sonda de microdiálisis se encontraba en un sitio diferente al NAc Shell y/o presentaban necrosis tisular.

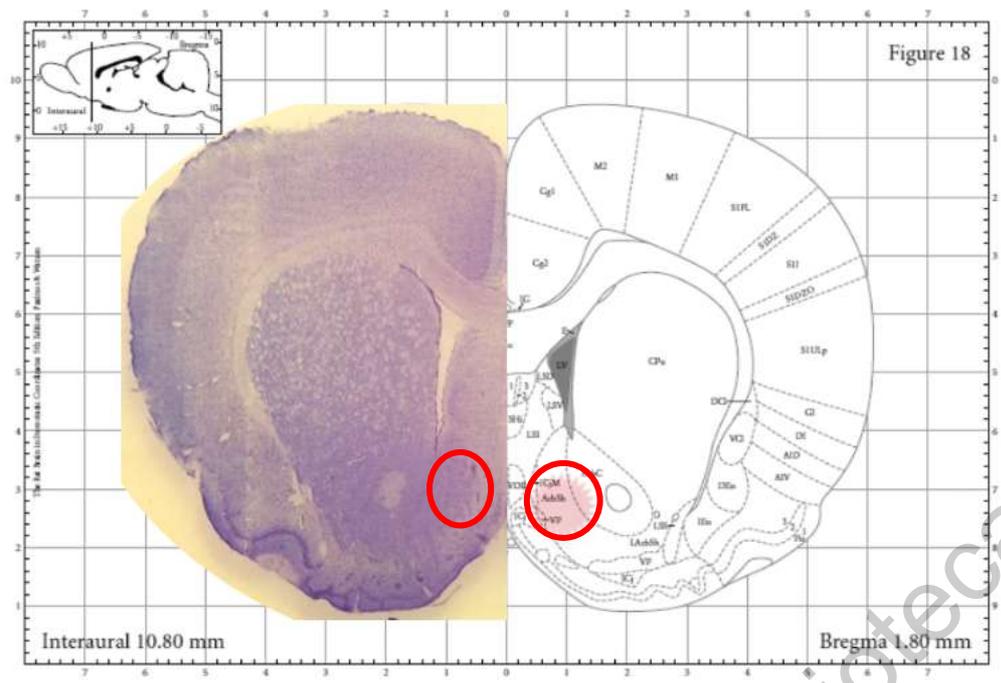


Figura 15. Corte coronal de cerebro de rata. Se puede observar la correcta ubicación de la cánula. Modificada de Paxinos y Watson, 1998.

5.3. Cambios en los niveles extracelulares de ach en el núcleo accumbens debidos al consumo de azúcar

Dirección General de Bibliotecas UAQ

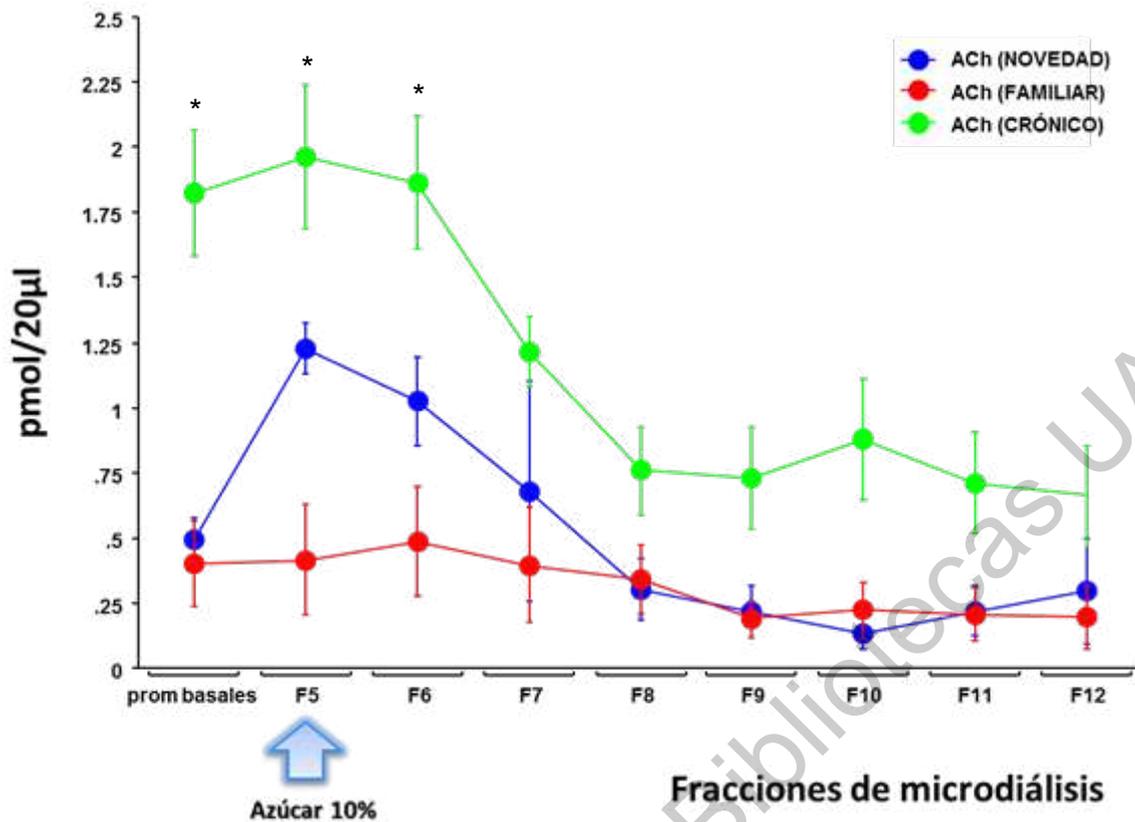


Figura 16. Niveles extracelulares de ACh en el NAc Shell durante la microdiálisis. \* $p < 0.05$

En la figura 19 muestra el porcentaje de ACh con respecto a la liberación basal. Una ANOVA de medidas repetidas mostró efecto significativo entre grupos ( $F_{2,8}=14.711$ ,  $p < 0.05$ ), un efecto de las fracciones ( $F_{8,16}=13.945$ ,  $p < 0.05$ ), y efecto su interacción ( $F_{16,64}=2.878$ ,  $p < 0.05$ ). La prueba post hoc de Bonferroni mostró diferencia significativa entre los grupos familiar y crónico desde el promedio de las fracciones basales hasta la fracción 6, el grupo novedad y crónico mostró diferencia significativa únicamente en el promedio de las basales.

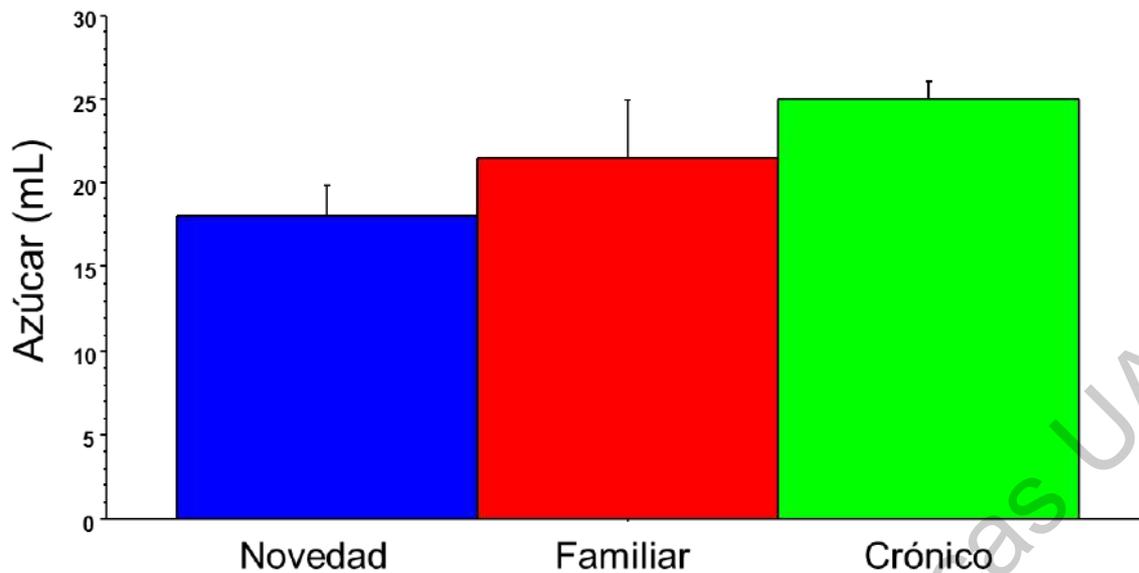


Figura 17. Consumo de azúcar durante la microdiálisis

La figura 20 muestra los mL de consumo de azúcar ingeridos por los diferentes grupos durante el día de la microdiálisis. Una ANOVA simple demostró que no tenemos diferencia significativa entre grupos. Podemos mencionar que el grupo que tuvo mayor consumo de azúcar fue el grupo crónico seguido del familiar y posteriormente el grupo novedad.

## 6. DISCUSIÓN

El primer objetivo de esta tesis fue determinar si existen diferencias en el peso corporal de las ratas, así como en el consumo de alimento y la ingesta de líquido entre los tres grupos, para lo cual se tomaron mediciones diariamente durante el tratamiento. En el peso corporal no se observaron cambios significativos en los primeros 10 días, el día 12 se tuvo diferencia significativa en el grupo crónico respecto a los demás, en el día 13 la diferencia se observó únicamente entre el grupo crónico y familiar, esto puede deberse, a que los animales compensaron el exceso de calorías reduciendo la ingesta en la dieta sólida. En lo referente al consumo de líquido, se observó que el grupo crónico incrementó el consumo de líquido de manera significativa a lo largo de los 14 días a diferencia de los que consumieron solo agua, quienes mantuvieron su consumo estable. El grupo crónico bebió más líquido, a la vez que consumió significativamente menos alimento sólido que los grupos con acceso a agua. Este comportamiento se ha reportado en estudios previos (Vera et al, 2018; Caynas et al., 2019).

El segundo objetivo de esta tesis fue evaluar los cambios en los niveles extracelulares de ACh en el NAc Shell durante el consumo novedoso, familiar y crónico de una solución de azúcar al 10% como único líquido de ingesta disponible. Se evaluó por medio de microdiálisis en ratas de libre movimiento los cambios en los niveles extracelulares de ACh en el NAc Shell. En lo referente a los consumos de la solución durante la microdiálisis, no se observó diferencia entre los grupos. No obstante, el volumen de líquido ingerido por el grupo que bebió la solución por primera vez fue menor; lo cual concuerda con reportes previos (Kelley, 2004), los cuales indican que, ante un sabor novedoso, ingieren pequeñas cantidades del líquido. Dicha ingesta aumenta a medida que el sabor se vuelve familiar. En días posteriores a este primer contacto, se observó un aumento creciente del volumen de solución consumido, indicando una atenuación a la neofobia y, a su vez revela una memoria incidental apetitiva.

Los resultados aquí obtenidos mostraron un aumento en la concentración de ACh en el grupo Novedad tras la presentación del estímulo novedoso. Esto indica, como en los resultados previamente descritos, que el sistema colinérgico está implicado en la respuesta hacia el estímulo novedoso del mismo modo que en la corteza insular (Miranda et al., 2000), esto va aunado a un menor consumo del estímulo novedoso que en este caso es la solución de azúcar 10%.

Los niveles de ACh no mostraron diferencia en el grupo Familiar, no obstante, el consumo del estímulo gustativo incrementó, lo cual señala que la ACh juega un papel diferente cuando el estímulo es conocido (Miranda et al., 1999).

Por otra parte, el grupo crónico mostró una liberación de ACh elevada desde el promedio de las basales el cual disminuyó después del consumo de la solución de azúcar. La actividad colinérgica puede facilitar la formación de cambios a largo plazo, dependientes de la experiencia, lo que sugiere que el sistema colinérgico, puede facilitar la plasticidad (Huerta, 2011). Los agonistas dopaminérgicos aumentan los niveles de ACh en el estriado, debido a una disminución en la liberación.

Los resultados sugieren que la actividad colinérgica en el NAc Shell cambia de acuerdo con la familiaridad del sabor presentado, mostrando así que el sistema colinérgico desempeña una función relevante en la codificación. El núcleo accumbens es una de las regiones cerebrales considerada como sustrato neural del refuerzo.

## 7. CONCLUSIONES

A lo largo de los 14 días se observó una diferencia considerable en los consumos de líquido del grupo crónico respecto a los grupos familiar y novedad, siendo este más elevado en el grupo crónico. En cambio, el consumo de alimento tuvo una tendencia inversa respecto al consumo de líquido puesto que en el grupo crónico disminuyó a lo largo de los días.

La liberación de acetilcolina aumentó en las ratas que tomaron azúcar por primera vez a diferencia de las ratas que habían tenido una exposición previa, en donde no hubo aumento significativo.

Se pudo observar que en las ratas del grupo crónico la liberación de acetilcolina estuvo por encima de los otros dos grupos debido a una modificación en su sistema liberación relacionado a los cambios conductuales tras la ingesta prolongada de azúcar.

## 8. REFERENCIAS

**Álvarez P**, Squire LR. Memory consolidation and the medial temporal lobe: A simple network model. Proceedings of National Academic of Sciences. **1994**; 91: 7041-7045

**Anderson LW**, Krathwohl DR, Airasian PW, Cruikshank KA, Mayer R, Pintrich PR, Raths J, Wittrock MC. A Taxonomy for Learning, Teaching, and Assessing: A Revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives. **2001**

**Bassareo V**, De-Luca MA, Di-Chiara G. Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. J Neurosci. **2002**; 22: 4709-4719

**Bermúdez-Rattoni F**, Prado-Alcalá RA. Memoria Dónde reside y cómo se forma. **2001**

**Bermúdez-Rattoni F**. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. Nat Rev Neurosci. **2004**; 5: 209-217.

**Camos V**, Johnson M, Loaiza V, Portrat S, Souza A, Vergauwe E. What is attentional refreshing in working memory? Ann N Y Acad Sci. **2018**; 1424(1):19-32.

**Caynas-Rojas S**, Rodríguez-García G, Delint-Ramírez I, Miranda MI. Differential function of medial prefrontal cortex catecholaminergic receptors after long-term sugar consumption. Behav Brain Res. **2018**

**Chandrashekar J**, Hoon M, Ryba N. The receptors and cells for mammalian taste. Nature. **2006**; 444: 288-294

**Chen J**, Cheuk IWY, Shin VY, Kwong A. Acetylcholine receptors: Key players in cancer development. Surg Oncol. **2019**:46-53.

**Cousins JN**, Fernández G. The impact of sleep deprivation on declarative memory. Prog Brain Res. **2019**; 246:27-53.

**Cowan N.** What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res.* **2008**; 169:323-38.

**Magalhães MJ, Reis C. et al.** Núcleo accumbens e estimulação cerebral profunda: revisão da literatura. *Braz J Neuroanat.* **2017**;1 (1): 1-7;.

**Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS.** Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.* **1998**; 127-140

**Di Chiara G.** Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res.* **2002** Dec 2;137(1-2):75-114.

**Domjan M, Schorr R, Best M.** Early environmental influences on conditioned and unconditioned ingestional and locomotor behaviors. *Dev Psychobiol.* **1977**; 10: 499-506

**Ferrazzoli D, Carter A, Ustun FS, Palamara G, Ortelli P, Maestri R, Yücel M, Frazzitta G.** Dopamine Replacement Therapy, Learning and Reward Prediction in Parkinson's Disease: Implications for Rehabilitation. *Front Behav Neurosci.* **2016**

**Ferreira G, Gutiérrez R, De-La-Cruz V, Bermúdez-Rattoni F.** Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience.* **2002**; 16: 1139-1145

**Fibiger HC, Lehmann J.** Anatomical Organization of Some Cholinergic Systems in the Mammalian Forebrain. In: Pepeu G., Ladinsky H. (eds) *Cholinergic Mechanisms. Advances in Behavioral Biology.* **1981**; 25

**Flores-Soto ME, Segura-Torres JE.** Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev. Mex. Neuroci.* **2005**; 6: 315-320

**Florez J, Armijo JA, Mediavilla A.** *Farmacología Humana.* 3ª Edición. **1998**; 24

**Glass MJ, Billington CJ, Levine AS.** Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides.* **1999**;33:360–368.

**Gluck** MA, Mercado E, Myers CE. Aprendizaje y memoria. Del cerebro al comportamiento. **2009**; 24

**Gutiérrez** R, De-La-Cruz V, Rodríguez-Ortiz C, Bermúdez-Rattoni F. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learning & Memory*. **2004**; 11: 95-101

**Gutiérrez** R, Rodríguez-Ortiz C, De-La-Cruz V, Núñez-Jaramillo L, Bermúdez-Rattoni F. Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiology of Learning and Memory*. **2003**; 80: 323-331

**Gutierrez** R, Sidney A. Chemosensory processing in the taste-reward pathway. *National Institutes of Health*. **2001**; 26: 231-238

**Gutiérrez** R, Téllez L, Bermúdez-Rattoni F. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*. **2003**; 17: 1556-1562.

**Haam** J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem*. **2017**; 142 Suppl 2(Suppl 2):111-121.

**Hampel** H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. **2018** Jul 1;141(7):1917-1933.

**Hanamori** T, Kunitake T, Kato K, Kannan H. Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J Neurophysiol*. **2004**; 2535-2545.

**Haselgrove** M. Overcoming associative learning. *J Comp Psychol*. **2016**; 130(3):226-40.

**Heimer** L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. **1991**; 41: 89-125.

**Huerta A**, Cruz S. Adicciones y Memoria. Mediagraphic. **2011**. Vol VI Número 2-2011: 69:77.

**Ishii M**, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. Curr Pharm Des. **2006**;12(28):3573-81.

**Kelley**, A. E. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. Neuroscience and biobehavioral reviews, **2004**; 27(8), 765-776.

**Kirsch I**, Lynn SJ, Vigorito M, Miller RR. The role of cognition in classical and operant conditioning. J Clin Psychol. **2004**; 60(4):369-92.

**Klein SB**. Aprendizaje. Principios y aplicaciones. **1994**; 686

**Knowlton BJ**, Squire LR. Artificial grammar learning depends on implicit acquisition of both abstract and exemplar-specific information. Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition. **1996**; 22: 169-181

**Kosslyn SM**, Rosenberg RS. Psychology: The brain, the person, the world. **2004**.

**Kruse AC**, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. Nature. **2012**; 482(7386):552-6.

**Lalonde ER**, Eglitis JA. Number and distribution of taste buds on the epiglottis, pharynx, larynx, soft palate and uvula in a human newborn. Anat Rec. **1961**; 140: 91-95

**Lee RS**, Koob GF, Henriksen SJ. Electrophysiological responses of nucleus accumbens neurons to novelty stimuli and exploratory behavior in the awake, unrestrained rat. Brain Res. **1998**; 799: 317-322.

**Liu JF**, Li JX. Drug addiction: a curable mental disorder? Acta Pharmacol Sin. **2018**; 39(12):1823-1829.

**Maeda S**, Qu Q, Robertson MJ, Skiniotis G, Kobilka BK. Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science*. **2019**; 364(6440):552-557.

**Maldonado-Irizarry CS**, Swanson C, Kelley AE. Maldonado-Irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci*. **1995**; 15: 6779-6788

**Malenka RC**, Nestler EJ, Hyman SE. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. **2009**; 117-130

**Mehendale S**, Xie JT, Aung HH, Guan XF, Yuan CS. Nucleus accumbens receives gastric vagal inputs. *Acta Pharmacol Sin*. **2004**; 25: 271-275

**Miranda MI**. Taste and odor recognition memory: the emotional flavor of life. *Rev Neurosci*. **2012**; 23(5-6):481-99.

**Miranda MI**, Bermúdez-Rattoni F. Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. *Neurobiol Learn Mem*. **2006**; 87: 343-351

**Miranda MI**, Bermúdez-Rattoni F. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci*. **1999**; 96: 6478-6482

**Miranda MI**, Ferreira G, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Role of cholinergic system on the construction of memories: Taste memory encoding. *Neurobiology of Learning and Memory*. **2003**; 80: 211-222

**Miranda MI**, Ferreira G, Ramírez L, Bermúdez-Rattoni F. Glutamatergic activity in the amygdale signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2002**; 96: 6478-6482

**Miranda MI**, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*. **2000**; 882: 230-235

**Mitchell R.** A novel GABA receptor modulates stimulus-induced glutamate release from cortico-striatal terminals. *European Journal of Pharmacology*. **1980**; 67: 119-122

**Molero A,** Aprendizaje aversivo gustativo: Características, paradigma y mecanismos cerebrales. *Anales de Psicología*, vol. 23, núm. **2007**, pp. 57-64

**Mongenson GJ,** Jones DL, Yim CY. From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*. **1980**; 14: 69-97

**Naor C,** Dudai. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*. **1996**; 79: 61-67

**Núñez-Jaramillo L,** Jimenez B, Ramírez-Munguía N, Delint-Ramírez I, Luna-Illades C, Tapia R, Bermúdez-Rattoni F. Taste novelty induces intracellular redistribution of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor in the insular cortex. *Brain Research*. **2008**; 1215: 116-122

**Núñez-Jaramillo L,** Ramírez-Lugo L, Herrera-Morales W, Miranda MI. Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav Brain Res*. **2010**; 207: 232-248

**Oakley IA,** Mistretta CM. Quantitative anatomical study of taste buds in fungiform papillae of young and old Fischer rats. *J Gerontol*. **1986**; 41: 315-318

**Ohla K,** Yoshida R, Roper SD, DiLorenzo PM, Victor JD, Boughter JD, Fletcher M, Katz DB, Chaudhari N. Recognizing taste: coding patterns along the neural axis in mammals. *Chemical Senses*. **2019**; 44: 237-247

**Ojeda JL,** Icardo JM. *Neuroanatomía humana. Aspectos funcionales y clínicos*. Masson S A. **2004**; 48-

**Paxinos G,** Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. **1998**

**Pedroza-Llinás R,** Ramírez-Lugo L, Guzmán-Ramos K, Zavala-Vega S, Bermúdez-Rattoni F. Safe taste memory consolidation disrupted by a protein

synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiology of Learning and Memory*. **2009**; 92: 45-52.

**Prado** MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int*. **2002** Nov;41(5):291-9.

**Purves** D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. *Neuroscience*. Editorial Médica Panamericana. **2004**

**Rada** P, Tucci S, Murzi E, Hernandez L. Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain Res*. **1997**; 768: 338-340

**Ramírez-Lugo** L, Miranda MI, Escobar A, Espinosa E, Bermúdez-Rattoni F. The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*. **2003**; 79: 184-193

**Ramírez-Lugo** L, Núñez-Jaramillo L, Bermúdez-Rattoni F. Taste memory formation: role of the nucleus accumbens. *Chemical Senses*. **2007**; 32: 93-97

**Ramírez-Lugo** L, Zavala-Vega S, Bermúdez-Rattoni F. NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learning and Memory*. **2006**; 13: 45-51

**Redolar** D. Sistemas de refuerzo en el cerebro. *Neurociencia cognitiva*. **2014**; 547-573

**Rueti** E, Bentosela M, Justel N. Perspectivas clásicas y contemporáneas acerca de la memoria. *Suma Psicológica*. **2009**; 16: 65-83

**Salmon** DP, Butters N. The etiology and neuropathology of alcoholic Korsakoff's syndrome. Some evidence for the role of the basal forebrain. *Recent Dev Alcohol*. **1987**; 5: 27-58.

**Sauerhöfer** E, Pamplona FA, Bedenk B, Moll GH, Dawirs RR, von Hörsten S, Wotjak CT, Golub Y. Generalization of contextual fear depends on associative rather than non-associative memory components. *Behav Brain Res*. **2012**; 233(2):483-93.

**Saul'skaya** NB, Mikhailova MO. The effects of motivational and emotional factors in glutamate release in the nucleus accumbens of the rat brain during food consumption. *Neurosci Behav Physiol.* **2003**; 33: 151-156.

**Schacter** DL. Searching for memory: The brain, the mind, and the past. **1996**

**Shinohara** K, Yasoshima Y. Inactivation of the basolateral amygdala suppresses the expression of taste neophobia but not the retrieval process in attenuation of neophobia. *Behav Brain Res.* **2019**; 372:112010.

**Shute** CD, Lewis PR. Cholinergic pathways, *Pharmacology & Therapeutics*. Part B. General and Systematic Pharmacology. **1975**; 1: 79-87

**Smith** DV, Frank ME. Mechanisms of Taste Transduction. **1993**; 295-338

**Squire** LR, Davis HP. The Pharmacology of Memory: A Neurobiological Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* **1981**; 21: 323-356

**Squire** LR y Kandel ER. *Memory: From mind to molecules*. New York, Scientific American Library. 2000.

**Stickgold** R. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature.* **2005**; 437(7063):1272-8.

**Stratford** TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci.* **1997**; 17: 4434-4440

**Swanson** CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* **1997**; 54: 933-945

**Taha** SA, Fields HL. Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* **2005** Feb 2;25(5):1193-202.

**Taira** CA, Carranza A, Bertera F, Höcht C. Hipertensión arterial: Epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica Catecolaminas síntesis metabolismo: receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. **2013**; 94-

**Téllez A, Téllez H, Mendoza M, Butcher E, Pacheco C, Tirado H.** Atención, aprendizaje y memoria. Aspectos psicobiológicos. **2002**

**Tocris.** Bioscience. An Overview of Dopamine Receptor Pharmacology. News-Medical Retrieved on March 08, 2021 from <https://www.news-medical.net/whitepaper/20200407/An-Overview-of-Dopamine-Receptors.aspx>. **2021**

**Tolman EC, Honzik CH.** Introduction and removal of reward, and maze performance in rats. University of California Publications in Psychology. **1930**; 4: 257-275

**Unsworth N, Fukuda K, Awh E, Vogel EK.** Working memory and fluid intelligence: capacity, attention control, and secondary memory retrieval. Cogn Psychol. **2014**; 71:1-26.

**Vera-Rivera G, Rangel-Hernández JA, Badillo-Juárez D, Fregoso-Urrutia DJ, Caynas-Rojas S, Miranda MI.** Effects of caloric or non-caloric sweetener longterm consumption on taste preferences and new aversive learning. Nutritional Neuroscience. **2018**; 4: 1-11

**Weiss F, Markou A, Lorang MT, Koob GF.** Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. Brain Res. **1992**; 314: 314-318.

**Wichmann R, Fornari RV, Roozendaal B.** Glucocorticoids interact with the noradrenergic arousal system in the nucleus accumbens shell to enhance memory consolidation of both appetitive and aversive taste learning. Neurobiol Learn Mem. **2012**; 98(2):197-205.

**Witt W.** Chapter 10 - Anatomy and development of the human taste system. **2019**; 164: 147-171

**Yamamoto T, Matsuo R, Kawamura.** Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. Journal of Neurophysiology. **1980**; 44: 440-455

**Yamamoto** T, Shimura T, Sako N, Yasoshima N, Sakai N. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. Behavioural Brain Research. **1994**; 65: 123-137

**Yamamoto** T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. Arch HistolCytol. **2006**; 69: 243-255

**Yang** CR, Seamans JK. Dopamine D1 receptor actions in layers V-VI rat prefrontal cortex neurons in vitro: Modulation of dendritic-somatic signal integration. Journal of Neuroscience. **1996**; 16: 1022-1935.

**Yarmolinsky**, D.A., Zuker, C.S., Ryba, N.J.P. (2009). Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. Cell. **2009**; 139(2), 234-244.

**Yiannakas** A, Rosenblum K. The Insula and Taste Learning. Front Mol Neurosci. **2017**; 10:335.

**Zahm** DS. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. Neurosci Biobehav Rev. **2000**; 24: 85-105

## ANEXOS

### ANEXO 1. Tinción de Nissl

El método de Nissl se refiere a la tinción del cuerpo de la célula y en particular al retículo endoplasmático. Esto se hace utilizando diversos colorantes básicos (anilina, thionina o violeta de cresilo) para teñir el ARN, cargado negativamente, de azul y se utiliza para resaltar las características estructurales importantes de las neuronas. La sustancia de Nissl (retículo endoplasmático rugoso) aparece azul oscuro debido a la tinción de ARN ribosómico, dando al citoplasma un aspecto moteado. Los gránulos individuales de ARN extranucleares se denominan gránulos de Nissl (ribosomas). El DNA, presente en el núcleo, se tiñe de un color similar.

Reactivos:

- Agua desionizada
- Etanol absoluto
- Etanol al 96 %
- Etanol al 80 % en agua desionizada
- Etanol al 70 % en agua desionizada
- Etanol al 80 % en agua desionizada, acidificado con 10 gotas de ácido acético glacial
- Xilol
- Resina sintética

Procedimiento:

1. Hidratar en agua destilada, 1 minuto.
2. Sumergir en etanol al 80 % acidificado, 1 minuto.

3. Lavar con agua destilada, sumergiendo durante un segundo en tres ocasiones.
4. Teñir en el violeta de cresilo, 20 minutos. (Si el colorante se ha dejado en reposo durante varios días, es probable que el tiempo de tinción tenga que ser más corto. Vigilar para evitar que el tejido quede sobreteñido)
5. Deshidratar en alcoholes graduales; etanol al 70 %, 10 segundos.
6. Etanol al 80 %, 10 segundos.
7. Etanol al 96 %, 10 segundos. Esperar más tiempo si es necesario, hasta que el tejido presente una tonalidad azul o hasta que las fibras se noten claras y las células presenten una tonalidad púrpura.
8. Nuevamente etanol al 96 %, 5 segundos.
9. Etanol 100 %, 5 segundos.
10. Xilol, 10 segundos.
11. Nuevamente xilol, mantenerlo ahí hasta que se vaya a montar la resina. (Procurar que sea el menor tiempo posible).
12. Sin dejar secar por completo el xilol, agregar unas gotas de resina sobre el portaobjetos, lo suficiente como para que quede una capa delgada y homogénea al colocar encima un cubreobjetos. Evitar la formación de burbujas de aire.
13. Dejar secar.
14. Limpiar y observar al microscopio

#### Resultados

- Núcleos: rosa-violeta.
- Retículo endoplasmático rugoso: púrpura.