

03081
7



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades

Sede: Instituto de Fisiología Celular

Modulación Colinérgica de las Etapas Tempranas del Aprendizaje Aversivo a los Sabores: Señalización del Estímulo Novedoso

Tesis para obtener el Grado de
Doctora en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

María Isabel Miranda Saucedo

Director de tesis: Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Ciudad Universitaria 2000

273390



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**MODULACIÓN COLINÉRGICA DE LAS ETAPAS TEMPRANAS
DEL APRENDIZAJE AVERSIVO A LOS SABORES:
SEÑALIZACIÓN DEL ESTÍMULO NOVEDOSO**



MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO

Tesis para optar por el Grado de Doctora en Investigación Biomédica Básica

México, D.F. febrero de 2000.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
Instituto de Fisiología Celular
Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria

A Shaun, Marcela, Miguel, María Isabel y Hernando.



**Más allá del azar y de la muerte
duran, y cada cual tiene su historia,
pero todo esto ocurre en esa suerte
de cuarta dimensión, que es la memoria.**
Jorge Luis Borges

Agradecimientos



Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por el privilegio que me brindó de realizar la presente tesis doctoral y conocer gente tan valiosa como mi tutor, director de tesis, jefe y maestro el Dr Federico Bermúdez Rattoni, al cual le debo todo mi agradecimiento y admiración.

Muchas gracias también a mis tutores del doctorado el Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoitia y la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia.

Gracias a los miembros del jurado Dra. Herminia Pasantes Morales, Dr. Ranulfo Romo, Dra. Elvira Galarraga Palacios, Dr. Prado Alcalá, Dr. Gabriel Roldán Roldán y el Dr. Juan Fernández Ruíz.

Gracias a Leticia Ramírez Lugo y a todos los compañeros de laboratorio, a Yolanda Díaz de Castro, Oreste Carbajal, Teresa Montiel y a todos aquellos miembros del IFC y amigos que me asesoraron y/o me brindaron su apoyo.

Este trabajo doctoral fue apoyado por PADEP y por los proyectos DGAPA-UNAM y CONACyT, gracias.

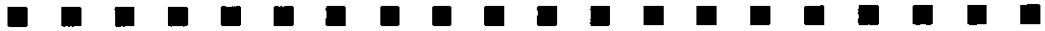
gustativos. También por medio de microdiálisis en libre movimiento se midieron los cambios en la liberación de ACh cuando los animales bebieron un sabor novedoso, semifamiliar y familiar.

Los resultados revelaron que el consumo de diferentes clases y modalidades de estímulos gustativos provoca una liberación diferencial de ACh en la CI. El sabor presentado por primera vez, ocasiona un aumento significativo en la liberación de ACh cortical comparado con la liberación que provocan los sabores familiares. Adicionalmente, encontramos que la liberación de ACh, observada durante el consumo de un sabor novedoso, es bloqueada cuando se administra TTX en el NBM. Esta toxina, a su vez, sólo afecta la adquisición del CAS, dejando intacta la evocación.

En conjunto, los resultados reportados en esta tesis doctoral demuestran que la modulación basalocortical sólo es necesaria en las etapas tempranas de la formación del CAS. Asimismo, el incremento de ACh cortical observado inmediatamente después del consumo de un sabor no familiar, podría estar directamente relacionada con la capacidad de reconocimiento de un estímulo gustativo novedoso. Dicha liberación de ACh cortical observada en animales en libre movimiento, demuestra una importante participación del sistema colinérgico del CAB en la señalización de los estímulos relevantes o novedosos durante las etapas tempranas de la formación de la memoria.

Abstract

Cholinergic modulation of the early stages of taste aversion learning: Signaling the novelty of the stimulus



The cholinergic basal forebrain (CBF) is a heterogeneous region of the mammalian ventral telencephalon containing magnocellular neurons that are the primary source of cholinergic innervation to the limbic system and neocortex. The CBF has been related to the modulation of several neurophysiological states, including encephalographic activity, sleep-wakefulness, attention, learning and memory. In the last decade, exhaustive studies have been made to evaluate the importance of CBF neurons (mainly the neurons in the nucleus basalis magnocellularis, NBM) in the regulation of cognitive functions. The results obtained suggest that the CBF system, both cholinergic and non-cholinergic, is necessary for acquisition and retrieval of different kinds of memories. In this regard, it has been postulated that one of the possible causes of memory loss in Alzheimer's disease is the decrease in the acetylcholine (ACh) neurotransmitter due to the degeneration of cholinergic neurons from the basal forebrain region observed in those patients.

Conditioned taste aversion (CTA) is a robust and easy behavioral model, in which the animals acquire aversion to a given taste when followed by gastric malaise. It has been reported that cholinergic mechanisms are involved in CTA formation and several studies have demonstrated that the insular cortex (IC) is strongly involved in the mnemonic representation of taste, which can be disrupted by NBM lesions or cortical cholinergic antagonists. Recently, it has been shown that intraoral infusions of water or saccharine cause a significant *in vivo* release of ACh in the IC.

However, the role of cortical ACh release, mediated by NBM afferents, during acquisition and retrieval of taste aversion memory, has not been assessed directly. Also, it is necessary to describe the role of cholinergic basal activity during recognition of different kinds of gustatory stimuli.

The first goal in this thesis was to measure the effects of blockage of the NBM on the ACh release in the IC of the rats during acquisition and retrieval of CTA. To determine the *in vivo* effects, we used the free-moving microdialysis technique to measure ACh release in the IC during presentation of a gustatory stimulus. The rats were infused bilaterally with tetrodotoxin (TTX, a reversible sodium channel-dependent-activity blocker), via microdialysis probes directed to the NBM during the acquisition and, days later, during the retrieval of CTA. In a second series of experiments we evaluated ACh release in the IC during presentation of different gustatory stimuli and during incidental learning of a novel taste, also by means of free-moving microdialysis. The changes in ACh release were measured during presentation of a novel, semi-familiar and familiar taste.

The results revealed that consumption of different kinds and modalities of gustatory stimuli induces a different ACh release in the IC. The first taste presentation causes a significant increase in cortical ACh release compared to the release caused by a familiar taste. We also found that the ACh release observed during the consumption of a novel taste is blocked when TTX is administered in the NBM and that TTX inactivation only affects CTA acquisition, leaving intact the aversion retrieval.

Taken together, the results reported here show that cholinergic modulation is only required for acquisition of aversive memories; the cortical cholinergic release could be directly related to recognizing the novelty of the gustatory stimulus; consequently, the release of cortical ACh observed during CTA acquisition in free-moving animals reflects the involvement of the CBF in signaling the modality of the stimulus during the early stages of memory formation.

Antecedentes



1

APRENDIZAJE Y MEMORIA

La memoria constituye la retención de las representaciones internas de los eventos o hechos experimentados. El *conocimiento* almacenado en forma de memorias está conformado por estas experiencias y estará disponible para ser utilizado posteriormente. Dicho conocimiento puede ser definido, como la acción o facultad de percibir, conocer, comprender e imaginar, los eventos que suceden en el mundo. Las formas de memoria son muy variadas y es claro que nuestra conducta emocional, nuestras habilidades y nuestros hábitos también dependen de ella. Gracias a la memoria, existe la personalidad, característica humana distintiva, y gracias a ella podemos mantener los conocimientos adquiridos día con día para tener una imagen o idea de nuestro entorno y de nosotros mismos. Sin memoria nuestra percepción del mundo sería nula, sin color, sin contexto.

El almacenaje de información se logra por una serie de procesos que desencadenan finalmente la memoria; para recordar un determinado evento es necesario adquirirlo, posteriormente consolidarlo y eventualmente evocarlo. Estos tres procesos: aprendizaje, consolidación y evocación, son temas de estudio que pueden tratarse como partes independientes de un gran proceso denominado formación de la memoria. Es claro que para tener memoria es necesario adquirirla a través del aprendizaje, la etapa inicial donde se adquieren y relacionan los diferentes estímulos que conforman la experiencia.

En las últimas décadas, han habido avances significativos que apuntalan varios componentes en la caracterización de los procesos fisiológicos de la memoria. La literatura referente a la neurobiología de la memoria, lograda a través de estudios con humanos y animales señala que, en primer lugar, la memoria tiene diferentes etapas y cambia continuamente; asimismo señala que, al menos la memoria a largo plazo, puede estar representada por cambios físicos o plásticos permanentes en el cerebro; estos

cambios plásticos que codifican la memoria están localizados en varios sistemas cerebrales y diferentes circuitos neuronales dependiendo de las formas de memorias involucradas. Adicionalmente, la farmacología de la memoria ha logrado identificar una multiplicidad de mensajeros químicos dentro de las vías neurales de los sistemas involucrados en la formación de la memoria y, en algunos casos, el papel que juegan en la función sináptica e integración neuronal (Iversen, 1998). En todos los modelos y sistemas estudiados, sean en animales invertebrados o en vertebrados superiores, se ha comprobado la importancia funcional de la comunicación química durante los procesos de aprendizaje, así como la participación de determinados neurotransmisores que contribuye a la plasticidad neuronal esencial para el almacenaje de información.

La búsqueda de los sitios anatómicos donde se localiza la memoria ha existido desde tiempos remotos. En un breve resumen histórico los hallazgos obtenidos a partir del siglo XIX abarcan desde la asignación general de las funciones a partes globales del cerebro, como sería la percepción y la memoria a los lóbulos cerebrales (Pierre Flourens, 1820); hasta la asignación de facultades específicas a áreas del cerebro también específicas, como el *habla* a la tercera circunvolución frontal del hemisferio cerebral izquierdo (Paul Broca, 1869). Años más tarde, Karl Lashley (1890-1958) al tratar de buscar la localización del *engrama* de la memoria por medio de lesiones progresivas de la corteza cerebral de ratas, encontró que lo necesario para un buen desempeño del aprendizaje, es la cantidad de tejido cortical no lesionado mas que su localización. Es decir, las áreas corticales son esencialmente *equipotenciales* para el aprendizaje; asimismo, encontró que la reducción en el aprendizaje es generalmente proporcional a la cantidad de tejido destruido; sin embargo, los animales a pesar de estar completamente decorticados pueden volver aprender ciertas tareas. Sus resultados también indicaron que entre más compleja la tarea estudiada más severos eran los efectos de la remoción de un área particular de la corteza.

A pesar de las conclusiones pesimistas que surgen de los resultados de Lashley, un número considerable de investigaciones posteriores han probado que las lesiones son un instrumento efectivo para delinear las diferentes regiones cerebrales que participan en la formación de la memoria. La importancia de los resultados de Lashley radica

principalmente en los aportes metodológicos y conceptuales para el estudio de la memoria, los cuales ayudaron a establecer que el cerebro y sus funciones no radican en partes exclusivas o únicas (Dudai, 1989).

Actualmente, está claro que las trazas de memoria para muchos tipos de aprendizaje no están localizadas en una estructura particular del cerebro; sin embargo algunas tareas de aprendizaje son profundamente afectadas por lesiones circunscritas del cerebro. Un ejemplo notable son los estudios del cerebelo (McCormick et al., 1984) y lóbulos temporales, así como los de la neocorteza de vertebrados (Olds et al., 1972; Jones et al., 1972; Zola-Morgan et al., 1982; Zola-Morgan et al., 1986; Friedman et al., 1988; Kilgard et al., 1998) donde se ha descrito diferentes procesos plásticos que correlacionan significativamente con la retención de la memoria de algunas funciones cognitivas complejas.

De tal forma, hoy en día el estudio del SNC contempla la idea de que ciertas áreas del cerebro están involucradas específicamente en determinadas etapas del aprendizaje de una conducta particular; y que otras etapas de la formación de la memoria están ubicadas en otras regiones comunes implicadas con muchas tareas diferentes. Por lo tanto, algunas partes de la memoria residen en las regiones del cerebro que tienen que ver con la modalidad y/o tarea de información específica, mientras otras partes de la memoria deben estar en estructuras cerebrales que sirven para varios tipos de memoria y por ende podrían considerarse componentes básicos de sistemas de memoria (Dudai, 1989).

En particular, poco es lo que se sabe sobre los mecanismos por los cuales las experiencias son adquiridas y almacenadas en dichos sistemas de memoria. Recientemente, varios estudios (Bakin et al., 1996; Dykes, 1997; Woolf, 1998; Kilgard et al., 1998) han sugerido al cerebro anterior basal (CAB) como una de las estructuras que podrían estar modulando la inducción de ciertos tipos de aprendizaje y su posible retención en la corteza cerebral.

SISTEMA COLINÉRGICO DEL CEREBRO ANTERIOR BASAL

La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) ha sido un hito en el estudio de la fisiología del aprendizaje, ya que uno de sus principales síntomas es la pérdida de la memoria. Este padecimiento encabeza la lista de las enfermedades citadas en la literatura psicofarmacológica y ha otorgado suficiente información para postular la *hipótesis colinérgica de la disfunción geriátrica de la memoria* (Bartus et al., 1982).

Se ha sugerido que una de las posibles causas de la pérdida de la memoria observada en la enfermedad de Alzheimer, es la disminución del neurotransmisor acetilcolina (ACh) debida a la degeneración de neuronas colinérgicas de la región CAB observada en estos pacientes (Bartus et al., 1982). Además de las evidencias clínicas de la EA, la idea de que el sistema colinérgico juega un papel relevante en la adquisición o evocación de la memoria, ha sido corroborada por una cantidad substancial de estudios neurofisiológicos, farmacológicos y de lesiones (Everitt et al., 1987; Mandel et al., 1989a; Mandel et al., 1989b; Lamberty et al., 1991; Dunnett et al., 1993).

Por supuesto, no cabe duda que el deterioro global de la memoria en el humano también es producido por daños al hipocampo o estructuras adyacentes al lóbulo medial temporal; sin embargo, la amnesia *lobular* es relativamente rara en comparación con el número progresivo de enfermedades degenerativas que provocan un declive cognitivo o demencia, como es el caso de la EA¹. Por tal motivo, el número de estudios para explicar

¹ La palabra demencia denota un declive progresivo en las funciones mentales, en la memoria y en la posibilidad de adquirir tareas intelectuales. Las causas de la demencia son variadas, por lo tanto no suele diagnosticarse como una enfermedad específica. La demencia no es una consecuencia inevitable del envejecimiento pero se correlaciona fuertemente con la edad. Cerca del 70% de las demencias son del tipo Alzheimer, sólo el 15% se deben a embolias (o pequeños infartos cerebrales); el restante 15% de demencias se debe a otro tipo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington y Parkinson, o con condiciones que pueden ser corregidas con tratamiento; es decir pacientes con infecciones en el cerebro o las meninges,

la contribución del cerebro anterior en el procesamiento y almacenamiento de información ha aumentado considerablemente. Algunas de estas investigaciones están encaminadas a determinar los cambios electrofisiológicos, químicos y anatómicos involucrados en la probable regulación efectuada por el CAB durante la formación de la memoria y cómo, dichos cambios, se ven afectados en los diferentes estados de la enfermedad. Al respecto, la mayoría de los estudios se han enfocado en el severo deterioro de la memoria a largo plazo observada en las etapas tempranas de la EA.

En general la clasificación más amplia de memoria puede resumirse en memoria de trabajo o corto plazo, y memoria de referencia o largo plazo. En la memoria de trabajo una representación interna de determinada información debe almacenarse por un periodo corto de tiempo para un determinado ensayo o tarea, donde la información *mantenida* es necesaria de momento a momento para completar la tarea satisfactoriamente. Por otra parte, la memoria a largo plazo es la información *mantenida* más allá del breve lapso de la memoria inmediata e incluye diferentes formas o clases; la memoria de referencia es usualmente de larga duración y puede ser recuperada a través de una señal adecuada, por ejemplo, dónde están guardados los objetos personales en la casa o qué sucedió temprano por la mañana.

Ambos tipos de memoria, de corto y largo plazo, se encuentran afectadas en enfermos de Alzheimer y se cree requieren de los lóbulos temporal y frontal. No existe un modelo animal equiparable a la EA de los humanos; sin embargo, existen diferentes modelos conductuales en animales que poseen características similares a las observadas en las memorias afectadas en enfermos de Alzheimer. Obviamente, la interpretación de los resultados requiere cautela, por las diferencias cognitivas fundamentales entre animales y humanos (Dawson et al., 1992). Tomando lo anterior en consideración, varios de estos modelos de memoria son equivalentes y válidos ya que han dado información valiosa sobre la fisiología del cerebro de rata y mono a través de los efectos cognitivos observados después de manipulaciones farmacológicas. Entre estos modelos conductuales, cabe señalar la prevención pasiva y la supresión condicionada de consumo

deficiencias vitamínicas, enfermedades endócrinas o metabólicas, lesiones de la masa intracranial (como tumores), incremento crónico de la presión intracranial e hidrocefalia (Kandel et al., 1991; O'dell et al., 1991).

como medidas de memoria de referencia, y las tareas en el apareamiento espacial de la muestra, el laberinto radial o el laberinto de agua de Morris, para estudiar la memoria de trabajo (ver resumen en Dekker et al., 1991). El desempeño de todas estas tareas se ve deteriorado después de la manipulación farmacológica o quirúrgica de los circuitos del CAB, al igual que el detrimento observado durante los procesos de envejecimiento normal (Iversen, 1998).

Anatomía del cerebro anterior basal

La región conocida como cerebro anterior basal es una zona heterogénea de la región ventral del telencéfalo (en el cerebro de mamíferos) que contiene el mayor número de células productoras de ACh. La gran mayoría de estas neuronas proyectan monosinápticamente a la región límbica del telencéfalo y a la neocorteza. El sistema colinérgico del CAB parece regular importantes funciones del sistema límbico y de la corteza, como la regulación de los diferentes estados fisiológicos, incluyendo los sistemas de regulación de sueño-vigilia; así como ciertos procesos sensoriales y de atención en la neocorteza, además de su participación en procesos cognitivos mencionados anteriormente (Stewart et al., 1984; ; Buzsaki et al., 1989; Szymusiak et al., 1990; Semba, 1991; Jones, 1993).

El CAB contiene además de las neuronas colinérgicas, un número considerable de neuronas que contienen ácido- γ -aminobutírico (GABA) que proyectan ampliamente a las cortezas de asociación de los lóbulos frontal, parietal y temporal, así como a la formación hipocampal. Al parecer, estas proyecciones modulan las funciones corticales a través de la activación o inhibición de la liberación de ACh (Dykes, 1997).

Anatómicamente el CAB comprende una serie de estructuras de la región ventral del cerebro, adyacentes a los núcleos preóptico, supraóptico y rostral infundibular del hipotálamo. Desde que se descubrió el sistema de neuronas magnocelulares productoras de ACh, las cuales son la fuente principal de inervación colinérgica al sistema límbico y la corteza, el término cerebro anterior basal se ha convertido en un sinónimo del sistema colinérgico magnocelular, que incluye la región septal, la banda diagonal, el núcleo

preóptico, la *substantia innominata* y el núcleo basal magnocelular. Es necesario indicar que esta simplificación en la terminología deberá tomarse sólo como un punto de referencia y no como una característica funcional exclusiva de la región delimitada.

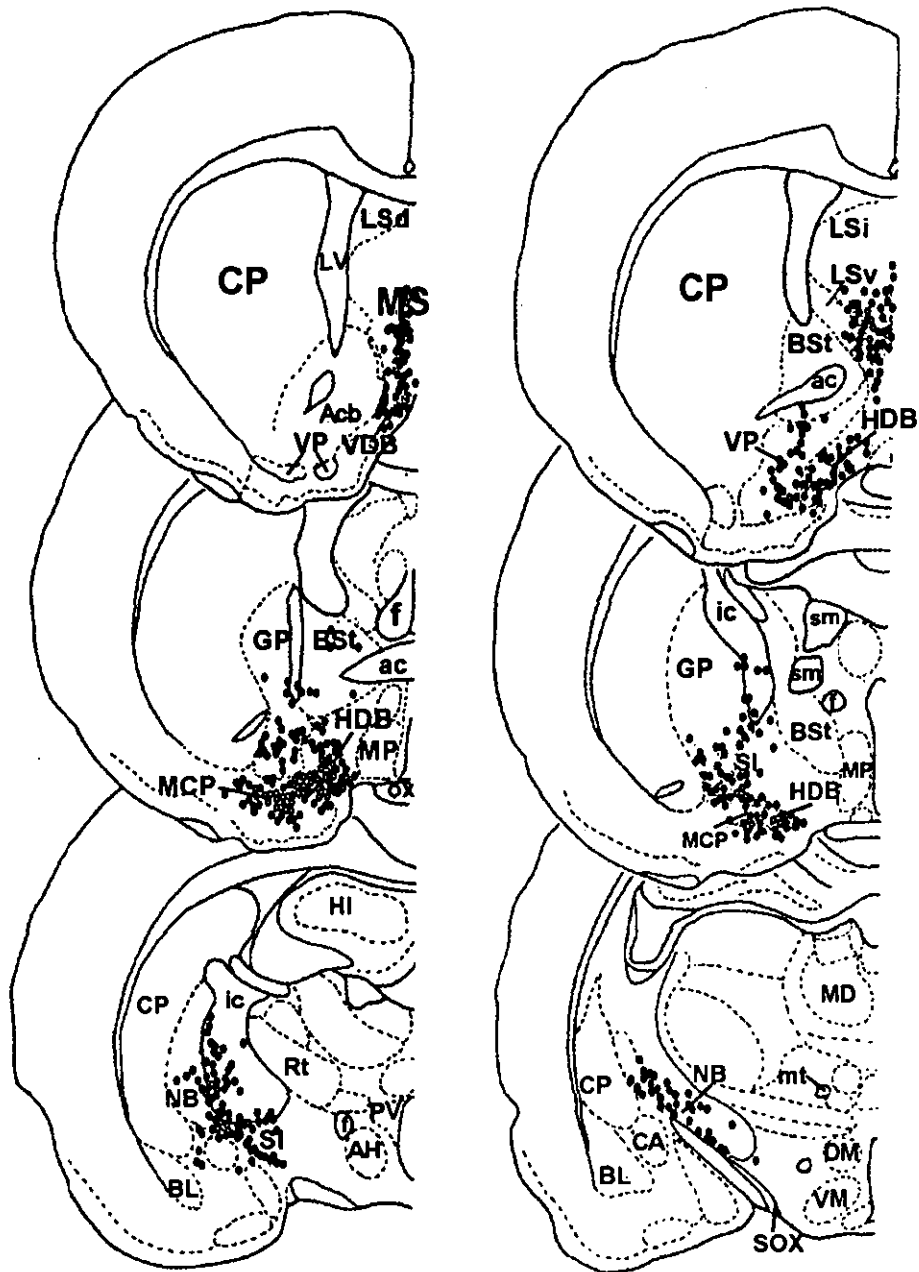


FIGURA 1. Esquema que muestra la distribución de las neuronas inmunoreactivas ChAT (puntos negros) a lo largo del CAB. Ac, comisura anterior; Acb, núcleo acumbens; AH, hipotálamo anterior; BL, núcleo basolateral de la amígdala; BSt, base del núcleo de la estria terminalis; CA, núcleo central de la amígdala; CP, caudado putamen; DM, núcleo dorsomedial hipotalámico; f, fórnix; GP, globo pálido; HDB, brazo horizontal de la banda diagonal; HI, hipocampo; ic, cápsula interna; LSi, LSv y LSV, núcleo lateral intermedio y ventrodorsal septal; LV, ventrículo lateral; MCP, núcleo preóptico magnocelular; MD, núcleo mediodorsal talámico; MP, núcleo preóptico medial; MS, núcleo septal medial; mt, tracto mamilotalámico; NB, núcleo basal magnocelular; ox, quiasma óptico; PV, núcleo paraventricular del hipotálamo; Rt, núcleo reticular talámico; SI, substantia innominata; sm, estria medular; SOX, decusación supraóptica; VDB, brazo ventral del núcleo de la banda diagonal; VM, núcleo ventromedial hipotalámico; VP, pálido ventral (Szymusiak, 1995).

Neuronas colinérgicas

La Figura 1 muestra la distribución de las neuronas colinérgicas dentro del CAB de la rata que son positivas a la inmunohistoquímica de la enzima de síntesis de la ACh, la colina acetiltransferasa (ChAT) (Alheid et al., 1988; Butcher et al., 1989; Woolf, 1991; Cullinan et al., 1991; Heimer et al., 1991). Las neuronas ChAT positivas son grupos de células grandes y multipolares contenidas a lo largo de las diferentes estructuras que comprenden el CAB. Las encontramos en el septum medial (SM), en los brazos verticales y horizontales de la banda diagonal de Broca (VBD y HBD), en el área preóptica magnocelular (APM), en la substantia innominata subpalidal (SI) y en el núcleo basal magnocelular (NBM). Varios sistemas de fibras atraviesan estas regiones, incluyendo el haz medial, la comisura anterior, el ansa lenticularis y peduncularis, así como el pedúnculo talámico inferior.

Las diferentes poblaciones de neuronas colinérgicas del CAB tienen diferentes blancos de proyección; así las neuronas del SM y VBD proyectan al hipocampo, las de la HBD y APM tienen como principal blanco el bulbo olfatorio, las cortezas entorhinal y piriforme; y las de la SI y NBM proyectan a la neocorteza principalmente (Woolf et al., 1983; Woolf et al., 1984; Rye et al., 1984; Saper, 1984; Wainer et al., 1985; Zaboroski et al., 1986; Zaboroski et al., 1986; Fisher et al., 1988). Estas últimas proyecciones presentan una organización topográfica con una progresión rostrocaudal de conexiones hacia los sitios corticales (Figura 2), las cuales no deben considerarse difusas, ya que sólo una baja proporción (<5%) proyecta a múltiples sitios corticales (Woolf et al., 1983; Rye et al., 1984; Baskerville et al., 1993). Las características básicas de las proyecciones colinérgicas basalocorticales son consistentes en diferentes especies, a pesar de que existen algunas diferencias específicas dignas de atención. En primates, el NBM forma un núcleo claramente compacto de neuronas colinérgicas asociadas con el globo pálido (Mesulam et al., 1983).

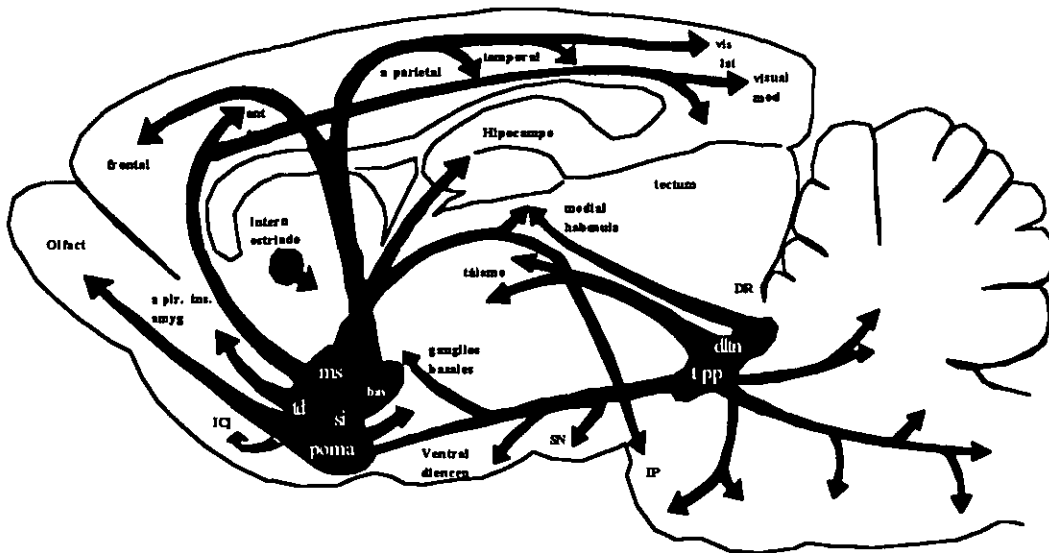


FIGURA 2. Representación esquemática del plano horizontal de los principales sistemas colinérgicos en el cerebro de mamíferos. Como se observa en la figura, las neuronas colinérgicas centrales muestran dos esquemas de organización fundamentales: A. Circuito de células locales, ejemplificadas por las interneuronas del estriado, nucleus acumbens, tubérculo olfatorio y el complejo de islotes de Calleja, Icj; y B. Neuronas de proyección (i.e. aquellas que conectan a dos o más regiones diferentes). De las proyecciones de neuronas colinérgicas que se interconectan con estructuras centrales, se han descrito dos complejos principales: 1. el complejo colinérgico del cerebro anterior compuesto por neuronas positivas a ChAT en el núcleo septal medial, *ms*; el núcleo de la banda diagonal, *td*; substantia innominata, *si*; campo preóptico magnocelular, *poma*; el núcleo basalis, *bas*; así como proyecciones a todo el telencéfalo no estriado; y 2. el complejo colinérgico pontomesencefalotegmental compuesto por células inmunoreactivas a ChAT en el núcleo tegmental pendunculo pontino, *tpp*; y laterodorsal, *dltn*; proyectando ascendentemente al tálamo y a otros sitios diencefálicos y descendentemente a la formación reticular pontina y medular y núcleo profundo cerebelar y vestibular. No se muestran en este esquema las neuronas simpáticas, parasimpáticas y otras eferentes colinérgicas de los nervios craneales 3-12 y las neuronas a y g-motoras autónomas de la médula espinal. Otras abreviaturas: amígdala, *amyg*; corteza anterior cingulada, *ant cg*; diencefalo, *diencep*; núcleo raphe dorsal, *DR*; corteza entorinal, *ento*; corteza frontal, *frontal*; corteza insular, *ins*; bulbo olfatorio, *olfact*; corteza piriforme, *pir*; corteza parietal, *par*; substantia nigra, *SN*; corteza temporal, *temporal*; corteza visual lateral, *vis lat*; corteza visual media, *visual med*; (modificado de Woolf, 1991).

En gatos y ratas, las neuronas colinérgicas del NBM están más difusamente organizadas, encontrándose dentro y adyacentemente del globo pálido, cápsula interna y núcleos del ansa lenticularis. Los bordes de las neuronas colinérgicas de la SI y del NBM no son tan precisos como los observados en primates. También se ha encontrado un número significativo de proyecciones no colinérgicas en el cerebro de gato (Adams et al., 1986;

Fisher et al., 1988) y en el de rata, 80-90% de las neuronas de proyección son colinérgicas, pero menos del 50% de las neuronas de proyección de la SI son inmunoreactivas para ChAT (Woolf et al., 1986; Jones, 1993).

Otro blanco importante del NBM en el sistema límbico, es el núcleo basolateral de la amígdala. La proyección colinérgica a este núcleo en el cerebro de monos proviene principalmente del NBM (Aggleton et al., 1987). La proyección es más difusa en ratas, donde la mayoría de las aferencias provienen de la SI y del NBM (Nagai et al., 1982; Carlsen et al., 1985). En la rata las proyecciones de neuronas amígdalofugales no colinérgicas comprenden un 25% y se encuentran entremezcladas con las neuronas colinérgicas. A pesar de que las neuronas colinérgicas que proyectan a la amígdala están localizadas en regiones del NBM que contienen neuronas de proyección colinérgica corticales, muy pocas neuronas proyectan a ambos sitios (Carlsen et al., 1985).

A pesar de que se ha demostrado la existencia de proyecciones del CAB a la parte caudal del cerebro medial, al puente y la médula, la gran mayoría de éstas no son colinérgicas (Semba et al., 1989).

Neuronas no colinérgicas

Además de las neuronas positivas para ChAT descritas en el área magnocelular del CAB, se han encontrado células que contienen marcadores para hormona estimulante de alfa-melanocitos, galanina, somatostatina, neurotensina y otros péptidos (Kohler et al., 1984; Melander et al., 1985; Vincent et al., 1985; Zahm et al., 1988). El papel funcional de estos transmisores putativos en el contexto de la modulación conductual aún no se conoce.

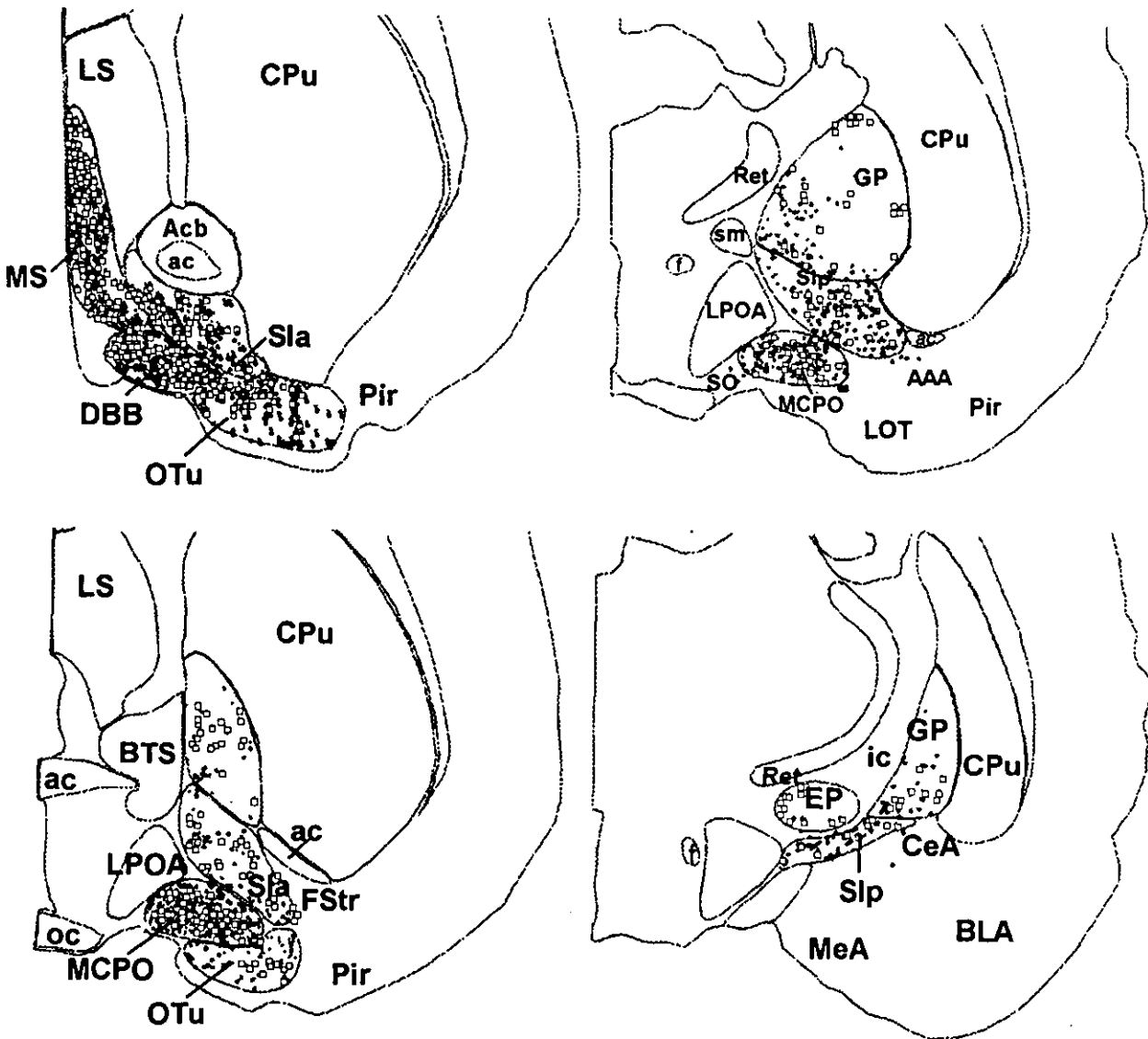


FIGURA 3. Esquema que muestra la codistribución de neuronas inmunoreactivas a ChAT (puntos negros) y neuronas inmunoreactivas a la enzima de síntesis del GABA la glutamato descarboxilasa (cuadros abiertos), en el área magnocelular del CAB. Las abreviaturas utilizadas son las mismas que en la figura 1, además de: AAA, área anterior amigdalina; BLA núcleo basolateral de la amígdala; BTS, base de la estria terminal; CeA, núcleo central de la amígdala; CPu, caudado putamen; DBB, base de la banda diagonal; EP, núcleo entopeduncular; FStr, fondo del estriado; LS, Septum lateral; LPOA, área preóptica lateral; LOT, núcleo lateral del tracto olfatorio; MCPO, núcleo preóptico magnocelular; MeA, núcleo medial amigdalino; oc, tracto óptico; OTu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme; Ret, núcleo reticular talámico; Sla y Slp, substantia innominata, parte anterior y parte posterior (Szymusiak, 1995).

Como mencioné, además de las neuronas colinérgicas, en el CAB se encuentran distribuidas las neuronas que utilizan GABA como neurotransmisor, las cuales han sido recientemente implicadas en los procesos plásticos que median el aprendizaje (Dykes, 1997) y el control del estado sueño-vigilia (Szymusiak, 1995) (Figura 3). En la rata, las neuronas GABAérgicas son generalmente pequeñas interneuronas, que presentan una relación 2:1 con respecto a las neuronas colinérgicas (Gritti et al., 1994). Se encontraron muy pocas neuronas medianas o grandes multipolares similares a las colinérgicas, cuya morfología puede estar relacionada con neuronas de proyección. Al parecer las neuronas GABAérgicas en el CAB de monos presentan una distribución de tamaños similar (Szymusiak, 1995). En la rata, el solapamiento de las grandes neuronas GABAérgicas con neuronas colinérgicas es más extensiva en el VBD, HBD, APM y en la SI rostral, y menos extensiva en la SI caudal y en el NBM (Gritti et al., 1994).

También ha sido identificado el componente GABAérgico en las proyecciones al hipocampo (Wainer et al., 1985), bulbo olfatorio (Zaborozski et al., 1986), tálamo (Asanuma et al., 1990) y neocorteza (Fisher et al., 1988; Freund et al., 1991; Freund et al., 1992); así como proyecciones GABAérgicas descendentes hacia el cerebro medio, puente y médula (Swanson et al., 1984; Semba et al., 1989; Dinopoulos et al., 1989) y, recientemente, al área hipotalámica lateral del cerebro de rata (Gritti et al., 1994). Dichos axones de las neuronas GABAérgicas que proyectan a la corteza tienen acceso preferente a las interneuronas corticales GABAérgicas (Dykes, 1997).

Aferentes al cerebro anterior basal

Las proyecciones colinérgicas y monoaminérgicas ascendentes del tallo cerebral juegan un papel crítico en la excitación del cerebro anterior (Szymusiak, 1995). Un buen número de proyecciones hacia las principales subdivisiones del CAB provienen del locus ceruleus (Semba et al., 1988; Jones et al., 1989); estas fibras noradrenérgicas parecen hacer contacto con las neuronas colinérgicas en todas las áreas del CAB, con excepción del NBM (Szymusiak, 1995). Las aferentes serotoninérgicas que se originan en los núcleos del raphe están ampliamente distribuidas a lo largo de la región magnocelular del CAB (Vertes, 1988; Jones et al., 1989). Las fibras serotoninérgicas que llegan al septum

medial y a la banda diagonal ventral originan principalmente del núcleo del raphe medial y las que inervan al cerebro basal restante provienen del núcleo del raphe dorsal. Dichas fibras positivas a serotonina del núcleo dorsal aparecen en cercana aposición a somas ChAT-positivos dentro del CAB (Szymusiak, 1995). Asimismo, las neuronas con núcleos colinérgicos del tegmentum pontomesencefálico proyectan marcadamente a las porciones magnocelulares del CAB, pero parecen hacer contacto principalmente con células no colinérgicas (Woolf et al., 1986; Semba et al., 1988; Vertes, 1988).

Al parecer, el componente glutamatérgico de las proyecciones provenientes del tallo cerebral, es el que ejerce los efectos excitatorios en las neuronas colinérgicas del CAB que a su vez inervan la corteza. La administración directa en el CAB de antagonistas del receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), así como de tetrodotoxina o procaina, es capaz de bloquear el incremento de liberación de ACh cortical producido por la estimulación del tallo cerebral. En contraste, la administración de antagonistas colinérgicos en el CAB, no causa ninguna disminución en la liberación cortical de ACh provocada por la estimulación de la región pedunculopontina (Rasmusson et al., 1994).

Adicionalmente, las células del hipotálamo lateral también proyectan a la región magnocelular del CAB. Los sitios más laterales hipotalámicos inervan las regiones más dorsales peri- y sub- palidales, y las regiones más mediales proyectan al caudado putamen medial y a la HBD (Cullinan et al., 1991). Las fibras de esta proyección se encuentran íntimamente asociadas tanto con neuronas colinérgicas como no colinérgicas del CAB.

Interesantemente, las regiones colinérgicas del CAB también reciben aferentes de la neocorteza. Esto es de sumo interés en términos de la modulación de la actividad observada en los estados sueño-vigilia que se cree, ejerce el CAB. Estas aferencias no provienen de todos los sitios corticales, por ejemplo, existen muy pocas proyecciones de las áreas primaria sensorial y de la motora; la mayoría provienen de regiones allocorticales, incluyendo el área cortical orbital, la corteza insular y la corteza piriforme (Zaborozski et al., 1991). Las proyecciones corticales directas al NBM y a la SI son escasas, y al parecer la gran mayoría están conformadas por vías multisinápticas que involucran al estriado y al nucleus accumbens (Zaborozski et al., 1991).

NEUROMODULACIÓN COLINÉRGICA DE LA CORTEZA CEREBRAL

Como mencioné anteriormente, la región del CAB ha sido relacionada con la regulación o modulación de varios estados neurofisiológicos, incluyendo actividad encefalográfica, sueño-vigilia, atención, aprendizaje y memoria. A pesar de la aparente importancia de las neuronas CAB en la regulación de la actividad cerebral durante la vigilia, esta área cerebral no funciona como un sistema simple de excitación tónica. Se sabe que las neuronas colinérgicas del CAB muestran patrones fásicos de descarga, no tónicos durante la vigilia y la fase paradójica de sueño (Buzsaki et al., 1988; Szymusiak et al., 1989). En el estado de vigilia el sistema colinérgico basal parece modular tanto a la neocorteza y el sistema límbico, durante la ejecución de procesos sensoriales (Sato et al., 1987; McKenna et al., 1988; Rasmusson et al., 1988; McCormick, 1989; Tremblay et al., 1990; Webster et al., 1991; Metherate et al., 1993; Hars et al., 1993), de atención (Day et al., 1991; Muir et al., 1994; Voytko et al., 1994) y de aprendizaje (Bartus et al., 1982; Dekker et al., 1991; Woolf, 1998).

De tal forma, la noción de que las neuronas colinérgicas del CAB son una fuente de activación cortical general e indiscriminada, puede ser reconciliado con la idea de que estas neuronas también ejercen una modulación más específica en la excitabilidad cortical en respuesta a clases particulares de estímulos o contingencias. Los efectos de las lesiones del NBM sobre el electroencefalograma (EEG), demostraron que una liberación mínima de ACh en la corteza puede ser suficiente para mantener la actividad de los patrones EEG asociados con la vigilia (Szymusiak, 1995). Adicionalmente, las neuronas del CAB también pueden responder a determinados estímulos que ocurren dentro de un contexto específico por medio de un incremento en la liberación de ACh en regiones corticales restringidas (Metherate et al., 1990; Shimura et al., 1995; Orsetti et al., 1996; Butt et al., 1997).

Por lo tanto, las funciones de las neuronas del CAB pueden ser mejor definidas a través de un claro estudio de la relación entre: 1) los procesos conductuales particulares

(p.e. aprendizaje espacial o contextual, memoria a corto plazo, atención visual, etc.) y 2) el sustrato cortical y/o límbico de estos procesos que será modulado por las aferentes colinérgicas.

Neuromodulación del aprendizaje y la memoria

En general, se está de acuerdo con que las lesiones del NBM producen serios deterioros en la formación de diferentes memorias (Fibiger, 1991; Dunnett et al., 1991; Dunnett et al., 1993). Debido a que las neuronas colinérgicas se encuentran entremezcladas con neuronas no colinérgicas a lo largo de todo el CAB, los resultados obtenidos después del uso de diferentes excitotoxinas poco selectivas no han esclarecido del todo la función colinérgica precisa en la adquisición o evocación de diferentes memorias. Por ejemplo, se ha reportado que las lesiones del NBM con ácido iboténico ocasionan la muerte tanto de neuronas colinérgicas como de otros tipos, al contrario del ácido quisquálico, que es más selectivo para las neuronas colinérgicas y reduce más claramente los niveles de ACh en la corteza (Dunnett et al., 1987; Dunnett et al., 1993). Sin embargo, los efectos sobre el aprendizaje son más severos después de la lesión con ácido iboténico a pesar de su poca selectividad colinérgica (Dunnett et al., 1991). Adicionalmente, El poco o nulo efecto de toxinas colinérgicas más específicas sobre el desempeño de diferentes tareas, se corroboró con otra neurotoxina denominada ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propiónico (AMPA), la cual provoca una potente reducción de la inervación colinérgica a la corteza cuando se suministra en el NBM, sin ocasionar pérdidas significativas en varios modelos conductuales (Dunnett et al., 1991). En algunas revisiones ampliamente documentadas (Boegman et al., 1992; Everitt et al., 1997), se pone en evidencia la falta de correlación entre los deterioros conductuales observados producidos por las lesiones del NBM y la actividad colinérgica resultante dependiendo el tipo de excitotoxina utilizada (p.e. NMDA, ácido iboténico, ácido quisquálico y AMPA). Estos trabajos concluyen que el daño general observado disminuye conforme aumenta la selectividad colinérgica de la neurotoxina, encontrándose

efectos delimitados sólo sobre algunas etapas de la adquisición o evocación de las memorias estudiadas (ver tabla 1).

Tabla 1. Efectos de las lesiones y la manipulación farmacológica del NBM sobre el aprendizaje y la memoria de diferentes tareas.

Excitotoxinas en el NBM	Selectividad colinérgica	Tareas afectadas	Tareas no afectadas
Acido iboténico Dunnnett et al., 1987. Everitt et al., 1987. Fibiger, 1991. Dunnnett et al., 1991. Dekker et al., 1991.	<i>muy baja</i>	- Apareamiento de posición demorada - Alternancia de la muestra demorada - Discriminación visual condicionada - Laberinto de agua de Morris - Prevención pasiva - Atención visual - Laberinto de 16 brazos - Condicionamiento aversivo a los sabores	
IgG-Saporina Torres et al., 1994. Baxter et al., 1995. Everitt et al., 1997.	<i>muy alta</i>	- Discriminación visual condicionada	- Laberinto de agua de Morris - Atención visual - Condicionamiento aversivo a los sabores
AMPA Fibiger, 1991. Boegman et al., 1992. Muir et al., 1994. Page et al., 1991.	<i>mediana</i>	- Prevención pasiva - Atención visual (revertida por fisostigmina)	- Laberinto de agua de Morris
Acido quisquálico López-García et al., 1993. Dunnnett et al., 1987. Etherington et al., 1987.	<i>baja</i>	- Atención visual - Condicionamiento aversivo a los sabores	- Apareamiento de posición demorada - Alternancia demorada de la muestra - Discriminación visual condicionada - Laberinto de agua de Morris
NMDA Roberts et al., 1992.	<i>baja</i>	- Laberinto de agua de Morris - Prevención pasiva - Aprendizaje del condicionamiento aversivo a los sabores	- Evocación del laberinto de agua de Morris - Evocación del condicionamiento aversivo a los sabores
Muscimol Pang et al., 1993	<i>Nula</i> <i>AGONISTA</i> <i>GABAérgico</i>	- Discriminación visual condicionada - Atención visual (revertida por fisostigmina)	

Una de las metodologías recientemente implementadas para resolver la falta de especificidad de las lesiones excitotóxicas, es la que utiliza un conjugado de saporina, una potente toxina vegetal, con un anticuerpo monoclonal (IgGMab 192), dirigido al receptor de baja afinidad (p75) del factor de crecimiento neuronal (NGF, por sus siglas en inglés). Esta inmunotoxina denominada 192IgG-saporina, puede ser infundida

directamente a los ventrículos laterales o a otra región parenquimal apropiada, donde se produce su internalización y su transporte retrógrado, así como su posterior acumulación en las neuronas colinérgicas del CAB que al parecer son las únicas que expresan el receptor p75 para NGF; el efecto final es la destrucción exclusiva de estas células colinérgicas (Wiley et al., 1991).

Los tratamientos realizados con esta inmunotoxina provocan una extensa deaferentación colinérgica del hipocampo y la corteza; asimismo producen una pérdida total y específica de células inmunoreactivas a la expresión del receptor p75 presentes exclusivamente en la región basal del cerebro anterior (Singh et al., 1995). La 192IgG-saporina no produce efectos sobre las neuronas colinérgicas y no colinérgicas negativas a la expresión de receptor NGF de cualquier otra región del cerebro (Waite et al., 1996), así como no produce efecto sobre las proyecciones aferentes dopaminérgicas y noradrenérgicas del CAB.

A pesar de la masiva deaferentación colinérgica cortical e hipocampal producida por la 192IgG-saporina, pocos son los trabajos que han reportado efectos significativos en las pruebas de aprendizaje, principalmente de tareas espaciales, mismas que si fueron afectadas cuando las lesiones el NBM se efectuaron con excitotoxinas inespecíficas (Torres et al., 1994; Baxter et al., 1995; Everitt et al., 1997). La interpretación de estos resultados debe de retomar la información que se tiene sobre la heterogeneidad de la población neuronal del CAB (no todas las neuronas son colinérgicas, ni poseen el receptor p75 y por lo tanto, no todas son receptoras a NGF), así como su conectividad con otras regiones además de la corteza, como por ejemplo su interacción con el sistema límbico, en particular la amígdala una región que no es afectada por el tratamiento con esta inmunotoxina.

Además de los diferentes efectos sobre la conducta que provocan las neurotoxinas colinérgicas relativamente específicas, los resultados hasta ahora obtenidos con estas nuevas toxinas, también sugieren una importante participación de otros sistemas de neurotransmisión dentro de la modulación ejercida por el CAB. En este sentido, se ha comprobado que el GABA en el NBM, como en otras áreas cerebrales, reduce la actividad electrofisiológica de las neuronas basales (Lamour et al., 1984; Dutar et al.,

1989). Las neuronas GABAérgicas al parecer también tienen un papel relevante durante la formación de la memoria o procesos de atención, ya que se ha reportado que las inyecciones en el NBM de muscimol, un agonista GABAérgico, ocasionan pérdidas en pruebas de discriminación visual de 2 y 5 selecciones, parecidas a las observadas con lesiones de ácido iboténico (Pang et al., 1993). Adicionalmente, se ha demostrado que el agonista del receptor a benzodiazepina, β -carbolina; es capaz de desinhibir la actividad de las neuronas colinérgicas del CAB por oposición a los efectos inhibitorios del GABA en los receptores de estas neuronas, con el consecuente incremento en la liberación de ACh en la neocorteza (Sarter et al., 1988).

Recientemente, se ha postulado que la interacción entre las neuronas colinérgicas y las GABAérgicas puede tener un papel significativo en la producción de un *estado cortical* que permite que ocurra la plasticidad neuronal. Esta hipótesis plantea mecanismos que involucran una reducción simultánea de la inhibición y un incremento en la liberación de ACh que permite la entrada de señales sensoriales para inducir cambios a largo plazo de los campos receptivos en la corteza somatosensorial primaria (Dykes, 1997).

Con los datos anteriores, polémicos y en muchos casos contradictorios, no es de sorprender que la función del sistema colinérgico basalocortical en el aprendizaje y la memoria actualmente esté sometida a un considerable número de investigaciones. Por ejemplo, existe una variedad de trabajos que han evaluado los efectos de los agonistas y antagonistas de los receptores colinérgicos en las áreas involucradas en el aprendizaje y la evocación de la memoria, como son la corteza y el hipocampo (Iversen, 1998). Una serie muy extensa de experimentos, ha utilizado el antagonista muscarínico general escopolamina, que afecta el desempeño, tanto en animales como en el hombre, de una amplia gama de tareas que involucran la formación de la memoria a largo plazo (ver revisión en Everitt & Robbins, 1997).

Otros trabajos se han enfocados específicamente en el estudio de la actividad colinérgica durante el aprendizaje mediada por los diferentes subtipos de receptores para ACh. Al parecer los receptores muscarínicos M_1 están particularmente asociados con el deterioro de la memoria (Bymaster et al., 1993; Ohno et al., 1994) y los receptores muscarínicos M_2 con el mejoramiento de la misma, incluyendo la atenuación de los

efectos amnésicos provocados por antagonistas de los receptores M₁, quizás por el incremento de la liberación de ACh (Baratti et al., 1993; Bymaster et al., 1993).

Por otra parte, el papel de los receptores nicotínicos durante la formación de la memoria no es del todo claro. Se sabe por estudios de unión de ligandos en tejido de cerebro humano y de rata, que el mayor nivel de unión a los receptores nicotínicos se encuentra en el núcleo basalis de Meynert (la estructura en el cerebro humano equivalente al NBM) (Shimohama et al., 1985) y en el tálamo (Adem et al., 1987). Estos receptores nicotínicos intervienen en algunas funciones cognitivas, como la tarea de prevención pasiva y aprendizajes de tipo espacial, las cuales fueron afectadas cuando se administró en la corteza mecamilamina, un bloqueador del canal nicotínico (Oliverio, 1966; Levin et al., 1987). Asimismo, se sabe que la administración de nicotina, mejora el desempeño cognitivo al aumentar la atención en humanos, así como en pacientes tempranos de la EA (Sahakian et al., 1994). La nicotina también incrementa el desempeño de tareas de memoria a corto plazo en monos, como la tarea de apareamiento demorado de la muestra, el cual es revertido por escopolamina (Levin et al., 1990; Terry et al., 1993).

Por último, la información sobre la función del CAB obtenida través de técnicas más precisas para medir la actividad neuronal y/o colinérgica, como el registro de la actividad eléctrica neuronal y el análisis de la liberación extracelular a través de microdiálisis, ha otorgado resultados muy importantes. Por ejemplo, el registro de las neuronas del NBM en primates, ha mostrado que éstas se activan durante el desempeño de conductas motivadas por objetivos específicos, así como cuando la recompensa es inminente. Las neuronas del CAB también se activan transitoriamente en presencia de estímulos sensoriales y más aún si éstos son novedosos (Richardson et al., 1986; Wilson et al., 1990). Rigdon, Pirch y sus colaboradores (Rigdon et al., 1986; Pirch et al., 1992), al registrar las neuronas de la corteza frontal de ratas, encontraron que las modificaciones condicionadas de las respuestas de estas neuronas durante el aprendizaje son impedidas por lesiones del NBM, y que dichas respuestas aumentan en presencia de ACh cortical. También se ha demostrado que el aumento en la liberación de ACh es exclusiva para una determinada región cortical dependiendo del área estimulada en el CAB (Jiménez-Capdeville et al., 1997). Otros resultados han encontrado una relación significativa entre

conductas motivadas y la liberación de ACh en la corteza sensorial (Rasmusson et al., 1992); así como fluctuaciones en la liberación de ACh cortical dependiendo de la estimulación sensorial (Inglis et al., 1995), la actividad motora (Day et al., 1991; Jiménez-Capdeville et al., 1993) y durante conductas de exploración y consumo (Inglis et al., 1994; Jiménez-Capdeville et al., 1996). Adicionalmente se han reportado cambios en la liberación de ACh ante la novedad, la habituación y el miedo (Acquas et al., 1996).

Algunas de las evidencias que relacionan puntualmente la modulación colinérgica durante la formación de la memoria, provienen de las observaciones de liberación de ACh en la corteza somatosensorial durante estados de expectación y consumo de recompensas, y del hecho que dicha liberación incrementa aún más ante condiciones que requieren aprendizajes de discriminación somatosensorial para obtener la recompensa (Inglis., 1994; Butt et al., 1997).

En resumen, diferentes revisiones han tratado de dar orden a la diversidad de efectos encontrados después de modificar la actividad colinérgica y algunas otras, han arrojado algunas hipótesis sobre la probable función del CAB (en particular el NBM) en los procesos de aprendizaje y memoria (Hasselmo et al., 1992; Szymusiak, 1995; Dykes, 1997; Everitt et al., 1997; Woolf, 1998; Weinberger et al., 1998). Debido a la distribución generalizada de las vías colinérgicas, no debería sorprender que todos los aspectos de la función cortical puedan ser modulados por la neurotransmisión colinérgica. Por ejemplo, en la corteza visual primaria, la estimulación colinérgica incrementa la probabilidad de que una neurona dispare en respuesta a su estímulo *preferido* (Sato et al., 1997). También se han descrito mecanismos similares de modulación en las corteza somatosensorial y auditiva (Ma et al., 1989; Metherate et al., 1990; Mesulam, 1995). Las neuronas del NBM son sensibles a modalidades sensoriales relevantes (DeLong, 1971; Wilson et al., 1990a), lo que sugiere que la inervación colinérgica cortical podría estar modulando el impacto de los estímulos sensoriales sobre la circuitería cortical de tal manera que refleje su relevancia sobre otros estímulos u otras modalidades del mismo estímulo.

De acuerdo con esta última afirmación, la novedad relacionada con los potenciales P300 en la corteza cerebral en los humanos es abolida por la administración de

bloqueadores colinérgicos (Hammond et al., 1987); las lesiones del NBM suprimen la actividad EEG rápida de bajo voltaje, reducen la utilización de la glucosa cortical e interfieren con tareas de atención (Kivosawa et al., 1989; Voytko et al., 1994). Estas observaciones proveen un sólido soporte para atribuir a las proyecciones basalocorticales un papel relevante en la modulación de los estados de excitación cortical y sugieren que el CAB se encarga de regular los procesos iniciales de la formación de la memoria, incluyendo procesos de atención.

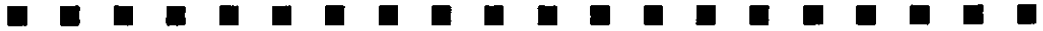
A pesar de que todavía no se comprende adecuadamente la diversidad y magnitud del deterioro observada durante la adquisición y evocación de la memoria de diferentes tareas, provocado por la administración de bloqueadores muscarínicos, lesiones excitotóxicas e inmunotóxicas (IgG-saporina), se han podido establecer ciertas generalizaciones sobre la modulación que ejerce el CAB. Se sabe que las regiones límbicas y paralímbicas de la corteza cerebral juegan un papel primordial en el aprendizaje y la memoria. La inervación preferencial colinérgica en estas partes de la corteza puede explicar el por qué los agonistas y antagonistas de los receptores a ACh tiene efectos principalmente en la formación de la memoria y otras funciones límbicas como humor, motivación y agresión (Yoshimura et al., 1977; Yeomans et al., 1984); los efectos sobre la ejecución de la memoria producidos por de estas drogas reflejan una disfunción de la interacción sensorial-límbica que es crucial para una formación adecuada de la memoria.

En trabajos recientes, realizados en la corteza piriforme de la rata se reportó que la ACh puede selectivamente, suprimir la transmisión sináptica intrínseca a través de mecanismos presinápticos, mientras no afecta y/o permite la entrada de aferentes extrínsecas. Esta supresión selectiva podría prevenir la interferencia de patrones previamente almacenados durante el aprendizaje de nuevos patrones; pudiendo ser un nuevo mecanismo a través del cual el sistema colinérgico participa en el aprendizaje (Hasselmo et al., 1992).

En los experimentos que utilizaron tareas donde pueden separarse claramente los procesos de aprendizaje y los de evocación de la memoria, y que han utilizado bloqueos temporales y/o mediciones de la actividad colinérgica *in vivo*, se ha podido corroborar la

intervención de la ACh principalmente durante las etapas tempranas del aprendizaje, sin encontrarse efecto en la evocación de esas mismas tareas (Yamamuro et al., 1995; Orsetti et al., 1996; Gutiérrez et al., 1997). Estos resultados sugieren una vez más, una participación crucial del sistema colinérgico basalocortical sólo en las etapas tempranas de la formación de la memoria.

Problemas aún no resueltos



- El CAB ha sido relacionado de manera importante en la regulación de procesos sensoriales, de atención y de formación de la memoria. Sin embargo, la reciente suposición de que la modulación colinérgica mediada por el cerebro anterior, podría estar participando sólo durante el almacenaje de nueva información es parcial y obliga a definir la contribución precisa de estas neuronas en el procesamiento de información. Es necesario tomar en cuenta que los modelos experimentales, que utilizaron drogas colinérgicas o lesiones generalizadas para evaluar el papel del sistema del CAB en la formación de la memoria, no han establecido claramente qué etapas del aprendizaje y qué procesos neuronales en la neocorteza son modificados gracias a la innervación colinérgica basal. Asimismo, a través de estudios electrofisiológicos se sabe que las neuronas del CAB alteran sus respuestas ante estímulos condicionados pero aún no se ha establecido como estos cambios electrofisiológicos son transformados en cambios plásticos que den origen a memorias permanentes.

- La información actual sugiere que algunas partes de la memoria podrían encontrarse en las regiones del cerebro que tienen que ver con la modalidad de información contenida en los estímulos y/o tarea específica, mientras otras partes de ésta podrían estar en estructuras cerebrales que sirven para varios tipos de memoria y por ende podrían considerarse como componentes básicos de sistemas de memoria (Dudai, 1989). Sin embargo, poco es lo que se sabe sobre los mecanismos por los cuales las experiencias son adquiridas y almacenadas en dichos sistemas de memoria. Falta por conocer cómo son regulados entre sí y de qué manera se integra la información a nivel celular. Recientes experimentos han aportado información al respecto, señalando la importancia del sistema colinérgico del CAB, en la regulación de la plasticidad inducida por el aprendizaje en la corteza auditiva y somatosensorial (Bakin et al., 1996; Dykes, 1997; Kilgard et al., 1998).

- La interpretación de los efectos de lesiones generalizadas del NBM en numerosas pruebas conductuales, debería de contemplar la deafferentación cortical masiva y permanente que provocan dichas lesiones, así como el efecto que estas tienen sobre otras regiones límbicas, como la amígdala. De la misma forma, dicha interpretación debería establecer claramente las diferentes etapas involucradas en la formación de la memoria, apoyándose en modelos donde puedan separarse los procesos de adquisición, consolidación y evocación de ésta. Desafortunadamente, un volumen substancial de reportes carecen de estos parámetros, ya sea por la imposibilidad de separar las diferentes etapas del aprendizaje o por la inexistencia de técnicas más precisas que den mayor especificidad a las manipulaciones del CAB. Por lo tanto, es necesario utilizar metodologías que aborden puntualmente la región basal y cortical que interviene en el modelo conductual estudiado y delimitar, dentro de lo posible la especificidad de la lesión, dosis, tiempo de efecto, etc.

Los trabajos realizados en esta tesis se basaron de forma general en los antecedentes recién expuestos y en la importancia manifiesta por conocer los procesos que son regulados por el sistema del CAB durante la formación de la memoria. Adicionalmente, pretenden contribuir a solucionar, al menos en parte, los problemas de interpretación encontrados en los estudios de los efectos de lesiones inespecíficas del NBM sobre la modulación colinérgica del aprendizaje y la evocación de la memoria. A continuación describo los antecedentes particulares y el modelo utilizado.

2. Las lesiones del NBM afectan principalmente la adquisición del CAS;
3. Los antagonistas muscarínicos en la CI, sólo afectan al condicionamiento cuando son aplicados minutos antes del reconocimiento del sabor, sin provocar efecto alguno cuando se inyectan en periodos cercanos a la presentación de estímulo irritante o de la evocación de la conducta;
4. las inyecciones en la CI de agonistas GABAérgicos no tienen efecto sobre el CAS;
5. la presentación intraoral de agua, sacarina o quinina provocan en la CI, una liberación significativa de ACh medida *in vivo*.

El Modelo



LA CORTEZA INSULAR Y EL PARADIGMA DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) es una forma de aprendizaje sólido y fácil de implementar en el laboratorio, por medio del cual los animales adquieren aversión a un sabor determinado cuando éste es seguido por malestar gástrico. Es un ejemplo notable del aprendizaje que determina la supervivencia de las especies permitiendo la asociación entre los estímulos relacionados con los alimentos y la retroalimentación visceral que sigue a su ingestión, la cual determinará, en gran parte, la futura conducta de consumo. Este proceso permite a los animales asociar sabores arbitrarios con los efectos nutritivos o tóxicos después de que éstos han sido ingeridos, de modo que en el futuro puedan distinguirlos¹.

Actualmente, el CAS es ampliamente utilizado para estudiar los procesos de formación de la memoria, ya que presenta varias ventajas sobre otros modelos; entre ellas están:

- El amplio conocimiento de las estructuras cerebrales involucradas para que se lleve a cabo (figura 4);
- La posibilidad de aislar apropiadamente las diferentes etapas de la formación de

¹A pesar de la lógica de las anteriores afirmaciones, fue hasta 1955 cuando John García y colaboradores (García et al., 1955), demostraron que los sabores pueden ser utilizados como estímulos condicionados, los cuales son efectivamente asociados, generalmente, con la irritación gástrica usada como estímulo incondicionado. La mayoría de la investigación sobre conductas alimenticias se ha realizado en ratas, pero esta clase de condicionamiento se encuentra en todos los niveles filogenéticos, desde especies invertebradas hasta vertebradas, que divergen más de 500 millones de años entre sí. Es claro que el estímulo condicionado no siempre es el sabor, tal es el caso de la apariencia visual (usada por pájaros insectívoros al no comer ciertos tipos de mariposas). También, cabe mencionar que, el estímulo incondicionado no necesariamente es la irritación gástrica causada por la ingestión de una toxina, sino el notorio mal sabor del veneno. En este caso, el aprendizaje resultante se asemeja a la *tarea de supresión de picoteo* estudiada extensivamente en pollos recién nacidos que aprenden a evitar una distintiva semilla que fue asociada con un sabor amargo (Rose, 1995; Bures et al., 1998).

la memoria aversiva: adquisición, consolidación y evocación;

- Este condicionamiento puede tolerar un retraso de varias horas entre el sabor y el malestar gástrico, la separación entre los dos estímulos permite conocer los mecanismos de adquisición de la información del sabor y de los de asociación de tal información con el reforzador negativo (Bures et al., 1998);
- presenta una rápida adquisición (un sólo ensayo/presentación) que permite la correlación entre los eventos moleculares y celulares del aprendizaje.

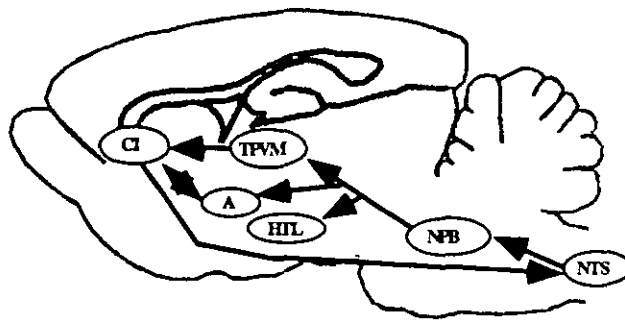


FIGURA 4. Esquema del corte sagital de un cerebro de rata en la que se muestran algunas de las principales conexiones de la corteza insular con otros núcleos del cerebro en su relación con el CAS: (NTS) núcleo del tracto solitario, (NPB) Núcleo parabraquial del puente, (TPVM) núcleo talámico postero-ventromedial, (HIL) Hipotálamo lateral, (A) amígdala, (CI) corteza insular.

En la década de los 70 se estableció el papel de la corteza insular (CI) en la formación del CAS, a partir de entonces numerosos experimentos han demostrado que lesiones de la CI realizadas antes o después de la adquisición del CAS impiden su aprendizaje y/o evocación. Es importante señalar que las lesiones de esta corteza, sólo obstruyen la representación de la memoria del gusto y sus consecuencias gastrointestinales, pero no producen deterioros en la sensibilidad gustativa o alteraciones en la información proveniente del tracto intestinal, lo que permite establecer que la CI es la región donde se lleva a cabo la integración de los estímulos involucrados en el CAS (Yamamoto, 1993; Norgen, 1984; Braun et al., 1982).

Recientemente se demostró que la inhibición de la síntesis de proteínas en la CI (pero no en cortezas adyacentes), exclusivamente durante la ventana de tiempo de exposición al nuevo sabor para lograr un CAS, bloquea la memoria del condicionamiento aversivo (Rosenblum et al., 1993).

La CI, de la rata se encuentra en el lóbulo temporal y está definida por un área que abarca desde la corteza frontal lateral y la corteza peririnal en la dirección rostro caudal, y en la porción más ventral de la corteza somatosensorial a la corteza piriforme en la dirección dorso ventral. La CI (área de Krieg 13,14) ha sido referida como la corteza visceral dado que recibe información tanto gustativa como visceral proveniente del tálamo y está involucrada en reacciones autonómicas y de respuesta al estrés; asimismo, se ha reportado que la CI recibe información convergente del sistema límbico y estimulación primaria sensorial que no ha sido vista en ninguna otra área de la corteza cerebral (para una revisión más exhaustiva ver Bures, et al., 1998).

Las principales conexiones a la CI que provienen del sistema límbico, y que son de importancia para la integración de los procesos asociativos, son las aferencias de la amígdala, el núcleo dorso medial del tálamo y la corteza pre-frontal. En este sentido, Pascoe y Kapp (Pascoe et al., 1987) demostraron que la CI y la amígdala son funcionalmente recíprocas y están interconectadas, además, las proyecciones corticales a la amígdala llevan información cognitiva que es integrada con procesos emocionales y motivacionales. Recientemente se ha involucrado a la CI en procesos asociativos en humanos, fortaleciendo la idea de que dicha corteza es un área de asociación cognitiva (Ghaem et al., 1997).

Experimentos recientes, de lesiones permanentes en la CI con excitotoxinas, o lesiones reversibles/temporales con tetrodotoxina¹ (TTX), mostraron un efecto negativo tanto en

¹ La tetrodotoxina es la toxina mejor conocida que bloquea los canales de Na⁺, dependientes de voltaje. Es un alcaloide que contiene una porción guanidino. La carga positiva es probablemente la que dirige a la molécula dentro de la boca del canal de Na⁺ por el campo eléctrico y posteriormente toda la molécula bloquea el poro del canal. Esta toxina se encuentra en el pez globo japonés (*fugu*) así como en una variedad de animales, como los moluscos, cangrejos, pulpos, salamandra acuática y ranas de Centro América. Aparentemente, la toxina es el producto de microorganismos que colonizan al huésped; es altamente tóxica (LD50 en ratones es de 10 ng/g) y es en especial peligrosa porque es bien absorbida después de su ingestión oral. En gatos anestesiados, la tetrodotoxina (1.4-3 µg/kg) causa una marcada caída en la presión sanguínea, con un pequeño cambio en el ritmo cardíaco, y una parálisis neuromuscular. El bloqueo de los canales de Na⁺ provoca que los potenciales de acción dejen de propagarse a lo largo de los axones. Las primeras neuronas en afectarse son las sensoriales,

la adquisición como en la retención, del laberinto de agua y la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni et al., 1991; Dunn et al., 1988; Gutiérrez et al., 1999b). Estos resultados amplían el espectro de tareas aversivas mediadas por la CI, demostrando efectos amnésicos anterógrados y retrógrados similares a los observados en el CAS que permite extrapolar los resultados de forma más general para explicar los procesos mnémicos regulados por esta corteza.

La corteza insular así como el CAS, han otorgado variados e interesantes resultados que añaden información sobre la regulación colinérgica durante la formación de la memoria. En una serie de estudios para tratar de discernir la participación de los trasplantes de tejido nervioso fetal en el restablecimiento funcional del SNC, se encontró que la pérdida del aprendizaje del CAS ocasionada por lesiones en la CI, puede ser revertida cuando los animales lesionados reciben trasplantes fetales de la misma región cortical (Bermúdez-Rattoni et al., 1987). La recuperación conductual observada se correlacionó con la recuperación de los niveles de ACh medida *in vitro* y las enzimas de síntesis y degradación de estos trasplantes (Escobar et al., 1993; Fernández-Ruiz et al., 1991; López-García et al., 1990; López-García et al., 1993; López-García et al., 1993). Posteriormente, este hallazgo se replicó con mediciones *in vivo* que también mostraron una correlación significativa entre la recuperación y los niveles de ACh dentro de los trasplantes que promovieron la recuperación del CAS (Miranda et al., 1997).

Por otra parte, también se ha reportado que las lesiones del NBM con ácido quisquálico, provocan una reducción significativa de la actividad de ChAT en la CI, además de la capacidad de adquirir y evocar el CAS (López-García et al., 1993). Recientemente, comprobamos que cuando dichas lesiones se efectúan con NMDA, sólo provocan la pérdida para adquirir el CAS y el laberinto espacial de Morris, sin tener efecto alguno sobre el proceso de evocación de ambas tareas (González et al., 1999). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y por otros, que han mostrado que la administración bilateral de escopolamina (antagonista

pero a dosis altas, las neuronas motoras también son bloqueadas. Estrictamente, la tetrodotoxina no es una toxina presináptica porque primariamente afecta la conducción neuronal; sin embargo, bajas concentraciones pueden tener un efecto aparentemente presináptico, como una falta de potenciales de acción que invaden las terminales nerviosas resultando un decremento en la liberación de transmisores (Harvey, 1993).

muscarínico general). AF DX-116 (antagonista M2) y pirenzepina (antagonista M1), sólo afecta la adquisición del CAS, ya que al ser administrados después de la presentación del sabor novedoso o antes de la evocación del condicionamiento no ocasionan ningún efecto sobre la memoria del CAS (Naor et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999b). Adicionalmente, se ha demostrado que la inyección de carbacol (agonista muscarínico) en concentraciones elevadas, produce efectos similares a los observados con estos antagonistas. Además, interesantemente, las inyecciones de muscimol (agonista GABAérgico) no ocasionan ningún efecto sobre el CAS (Naor et al., 1996).

Otros datos que han apoyado la idea de que la modulación colinérgica basalocortical es necesaria únicamente durante las etapas tempranas de la formación del CAS, son los resultados que obtuvimos al infundir bilateralmente en la CI anticuerpos contra el NGF. La deaferentación producida por estos anticuerpos ocasiona en la CI, una pérdida significativa de marcadores de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa y una marcada reducción en la liberación de ACh medida *in vivo*. Los efectos del anticuerpo sobre la conducta del CAS sólo se observaron cuando se colocó antes de la adquisición. Los datos anteriores señalan que la actividad colinérgica, junto con los efectos intrínsecos del NGF en la corteza, perdidos por las infusiones del anticuerpo, tienen un papel relevante sólo en el aprendizaje del condicionamiento aversivo (Gutiérrez et al., 1997).

Con la reciente accesibilidad a la toxina específica para las neuronas colinérgicas, la IgG-Saporina, decidimos probar sus efectos sobre el modelo del CAS. La aplicación bilateral de la inmunotoxina en el NBM, no provocó efecto alguno sobre la adquisición o evocación del CAS, a pesar de ocasionar una reducción significativa en la liberación *in vivo* de la ACh. Al estudiar con detenimiento las estructuras afectadas por la inmunolesión en la región basal, se manifestó el hecho reconocido de que los efectos provocados son exclusivos sobre la comunicación basalocortical, quedando intacta la comunicación hacia la amígdala basolateral, una estructura que por sí sola no afecta el CAS¹. En este sentido, nos vimos obligados a replantear, de una forma no tradicional, la

¹ Recientemente, el papel de la amígdala en las diferentes etapas de la formación del CAS se ha sometido a debate, debido a que los resultados obtenidos, al parecer son contradictorios, dependiendo de la región manipulada y de la lesión utilizada. El

intervención de la CI y la amígdala. De tal forma, decidimos realizar experimentos de doble lesión, utilizando para ello la inmunotoxina en el NBM y lesionando con NMDA la amígdala. Los resultados sugieren que la transmisión colinérgica mediada por NBM actúa tanto en la corteza insular como en la amígdala; en caso de que se destruya la vía NBM-corteza la vía NBM-amígdala-corteza la reemplaza y envía la información necesaria para que se lleven a cabo los procesos necesarios para la asociación aversiva. Es posible también, que la pérdida del aprendizaje del CAS ocasionada por lesiones inespecíficas en el NBM se deba a la destrucción simultánea de las proyecciones hacia la corteza y la amígdala. Estos resultados brindan una nueva perspectiva para el estudio de la regulación plástica y promueven una formulación no tradicional de la actividad colinérgica (Gutiérrez et al., 1999a; Gutiérrez et al., 1999b).

De tal forma, la reciente aparición de toxinas colinérgicas más específicas, así como el uso de técnicas más directas para la medición de la actividad colinérgica, ha permitido obtener datos importantes sobre el comportamiento de neurotransmisión en las diferentes regiones cerebrales involucradas en el CAS. Por ejemplo, Shimura y colaboradores, reportaron los primeros datos sobre la liberación cortical de ACh extracelular *in vivo* durante la estimulación gustativa, observando que la aplicación intraoral de agua o sacarina incrementan significativamente la liberación de ACh, y que esta liberación aumenta aún más cuando el estímulo es aversivo (Shimura et al., 1995).

Resumiendo las observaciones mencionadas, podría sugerirse que la formación de la memoria del CAS, en particular su adquisición, podría estar a cargo, al menos en parte, del sistema colinérgico. Ya que se ha comprobado que:

1. La recuperación del CAS mediada por transplantes fetales en la CI está altamente correlacionada con la recuperación de la actividad colinérgica en esa estructura;

núcleo central de la amígdala parece tener un rol importante en la adquisición y retención del CAS, así como de la prevención pasiva y activa. Sin embargo, los reportes sobre la región basolateral no son tan claros; algunos autores han demostrado que la lesión de esta área produce la interrupción de la prevención pasiva pero no del CAS. Al parecer la contradicción radica en que lesiones extensas, como las electrolíticas, destruyen las fibras de paso de esta región de la amígdala, lo que no ocurre con lesiones reversibles (p.e. novocaína) que sólo interrumpen la adquisición de la aversión potenciada por olor, dejando intacto el CAS (ver capítulo 3 en Bures, et al., 1998).

2. Las lesiones del NBM afectan principalmente la adquisición del CAS;
3. Los antagonistas muscarínicos en la CI, sólo afectan al condicionamiento cuando son aplicados minutos antes del reconocimiento del sabor, sin provocar efecto alguno cuando se inyectan en periodos cercanos a la presentación de estímulo irritante o de la evocación de la conducta;
4. las inyecciones en la CI de agonistas GABAérgicos no tienen efecto sobre el CAS;
5. la presentación intraoral de agua, sacarina o quinina provocan en la CI, una liberación significativa de ACh medida *in vivo*.

Planteamiento del Problema



¿La modulación colinérgica participa diferencialmente durante la formación de la memoria del CAS?

A pesar de la diversidad de observaciones que sugieren que lesiones del NBM afectan principalmente la adquisición del CAS, las metodologías utilizadas hasta ahora no permiten formular una clara participación colinérgica, durante una o varias etapas de este modelo de aprendizaje, ya que la destrucción provocada por las excitoxinas utilizadas no puede ser atribuida a un sólo tipo de deafferentación, ni a una sola región cortical. De la misma forma, las lesiones excitotóxicas del NBM provocan daños permanentes que podrían estar ocasionando cambios plásticos que modifiquen la forma de respuesta del sistema involucrado en el condicionamiento. Por lo tanto, es necesario establecer si el bloqueo temporal del NBM, que no lesiona permanente y drásticamente esta estructura, afecta particularmente alguna de las etapas necesarias para la formación del CAS, así como establecer los efectos de este bloqueo sobre la liberación colinérgica en el momento que se lleva a cabo el condicionamiento.

¿La liberación cortical de acetilcolina participa en la señalización de la modalidad del estímulo gustativo?

Tomando en cuenta los resultados sobre la liberación en la CI de ACh durante la presentación del estímulo gustativo y la participación colinérgica basal sólo durante las etapas tempranas del aprendizaje, podría sugerirse que el sistema colinérgico juega un papel relevante en la entrada y representación del estímulo gustativo. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la intervención de este sistema en aprendizajes incidentales, como sería el caso del reconocimiento de un sabor novedoso sin consecuencias posteriores evidentes. Por lo tanto, es necesario describir la participación de la inervación colinérgica en la corteza insular durante la presentación de diferentes modalidades de un mismo

estímulo gustativo.

En los documentos que a continuación se transcriben abordamos experimentalmente algunas de las preguntas de los dos incisos presentados en el planteamiento del problema. El primer artículo tuvo como objetivo principal evaluar los efectos de la inactivación reversible del NBM por medio de TTX durante la adquisición y/o la evocación del CAS, y medir simultáneamente, la liberación de ACh en la CI durante dicha inactivación por medio de la técnica de microdiálisis en libre movimiento. El segundo artículo se enfocó a la evaluación de la liberación de ACh en la CI durante la presentación de diferentes estímulos gustativos y sus diferentes modalidades: novedoso, semifamiliar y familiar. Se midieron también, por medio de microdiálisis en libre movimiento, los cambios en la liberación cortical de ACh cuando los animales bebieron un sabor familiar, un sabor novedoso y durante las subsecuentes presentaciones de éste.

Artículo 1:

Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories.



Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories

(conditioning taste aversion/free-moving microdialysis/gustatory cortex/cholinergic basal forebrain)

MARÍA ISABEL MIRANDA AND FEDERICO BERMÚDEZ-RATTONI*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico

Communicated by James L. McGaugh, University of California, Irvine, CA, March 25, 1999 (received for review November 5, 1998)

ABSTRACT The basal forebrain complex, which includes the nucleus basalis magnocellularis (NBM), provides widespread cholinergic and γ -aminobutyric acid-containing projections throughout the brain, including the insular and pyriform cortices. A number of studies have implicated the cholinergic neurons in the mediation of learning and memory processes. However, the role of basal forebrain activity in information retrieval mechanisms is less known. The aim of the present study is to evaluate the effects of reversible inactivation of the NBM by tetrodotoxin (TTX, a voltage-sensitive sodium channel blocker) during the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion (CTA) and to measure acetylcholine (ACh) release during TTX inactivation in the insular cortex, by means of the microdialysis technique in free-moving rats. Bilateral infusion of TTX in the NBM was performed 30 min before the presentation of gustative stimuli, in either the CTA acquisition trial or retrieval trial. At the same time, levels of extracellular ACh release were measured in the insular cortex. The behavioral results showed significant impairment in CTA acquisition when the TTX was infused in the NBM, whereas retrieval was not affected when the treatment was given during the test trial. Biochemical results showed that TTX infusion into the NBM produced a marked decrease in cortical ACh release as compared with the controls during consumption of saccharin in the acquisition trial. Depleted ACh levels were found during the test trial in all groups except in the group that received TTX during acquisition. These results suggest a cholinergic-dependent process during acquisition, but not during memory retrieval, and that NBM-mediated cholinergic cortical release may play an important role in early stages of learning, but not during recall of aversive memories.

The cerebral cortex has been considered as the ubiquitous place for the storage of long-term memory. In this regard, a great deal of investigation into brain health has focused on a particular central nervous system disorder, Alzheimer's disease. This disease results, at least in part, from a deficit in acetylcholine (ACh) neurotransmission caused by a degeneration of large basal forebrain (BF) cholinergic neurons and a deficit in choline acetyltransferase, the enzyme that synthesizes ACh (1).

Accumulative evidence supports the role of cholinergic neurons in the BF in processes such as arousal, attention, learning, and memory. Behavioral deficits associated with lesions produced by injections of excitatory amino acid agonists into the nucleus basalis magnocellularis (NBM) have been demonstrated in a variety of tasks (2, 3). However, the behavioral deficits of these lesions might be caused not only by

the resulting cholinergic deafferentation, because 30–35% of the population of BF projections neurons to the cortex are γ -aminobutyric acid-containing neurons (4–6).

In this regard, there are several experiments trying to study more directly the modulatory role of ACh in the activity of cortical neurons, which have brought their observations from electrophysiological and biochemical studies. It has been reported that ACh is released in the rat neocortex in response to a variety of behavioral and environmental conditions, including wakefulness (7), motor activity (8), restraint, or handling-induced stress (9) and by exposure to auditory, visual, and gustatory stimulation (10–12). In addition to these findings, which demonstrate differences in ACh release related to different states of arousal, other evidence suggests that associative conditioning (13–16) also may modify ACh release in the neocortex. Thus, it has been demonstrated that a significant enhancement of ACh release is associated with appetitive conditioning procedures. Training for tactile discrimination causes a specific enhancement in ACh release in the somatosensory cortex that is related to acquisition of discrimination performance (17). Additionally, Shimura and coworkers (12), using *in vivo* microdialysis, have shown that ACh release in the insular cortex (IC) is influenced by behavioral expression of aversive taste stimuli.

Conditioned taste aversion (CTA) has been widely used for studying the neurobiology of learning processes; the animal acquires aversion to a taste cue when it is followed by digestive malaise. The CTA model contains clearly defined anatomical substrates (18, 19), and several studies have demonstrated that the insular gustatory neocortex is strongly involved in the mnemonic representation of taste and can be disrupted by NBM lesions (20) or cortical cholinergic antagonists (21). Recently, experiments of NBM lesions have brought a differential role of cholinergic activity during learning and memory. For example, bilateral cortical administration of antibodies for nerve growth factor produced a nearly total loss of cortical ACh levels, and a significant decrement of cells in the NBM, as well as impaired acquisition, but not retrieval, of conditioned taste aversion and inhibitory avoidance (22). However, the role of the cortical ACh release, mediated by NBM afferents, during acquisition and retrieval of taste aversion memory, has not been assessed directly.

The purpose of the present experiment was to measure the effects of the bilateral blockage of the NBM on the ACh release in the IC of rats during acquisition and retrieval of CTA. To determine the *in vivo* effects, we used a microdialysis technique for freely moving animals to measure ACh release

Abbreviations: NBM, nucleus basalis magnocellularis; TTX, tetrodotoxin; CTA, conditioned taste aversion; ACh, acetylcholine; IC, insular cortex; BF, basal forebrain.

*To whom reprint requests should be addressed at: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70–253, 04510, Mexico D.F. e-mail: fbermude@ifisiol.unam.mx.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

PNAS is available online at www.pnas.org.

in the IC during a baseline period and during presentation of a gustatory stimulus. The rats were infused bilaterally via microdialysis probes in the NBM with tetrodotoxin (TTX; a reversible sodium channel-dependent-activity blocker) or buffer, 30 min before the presentation of a novel taste paired with gastric malaise (CTA acquisition) and, days later, during a second presentation of the taste (CTA retrieval).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Twenty male Wistar rats, weighing 275–325 g at the time of surgery, were used. They were housed under a 12-h light-dark cycle, with food and water ad libitum, except during behavioral tests.

Guide Cannula Implantation. All the animals were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and were implanted with three microdialysis guide cannulae (CMA/12) by using standard stereotaxic procedures; two of them were bilaterally implanted into the NBM [anteroposterior (AP) = -0.5 mm, lateral (L) = ± 2.5 mm; ventral (V) = -4.0 mm from Bregma] and the third cannula into the right IC (AP = $+1.2$ mm; L = $+5.5$ mm from Bregma; V = -5.5 mm from dura). The guide cannulae were kept in place with three skull screws and dental acrylic cement.

Behavioral Procedures. Two or three days after surgery, the animals were deprived of water for 24 h and then habituated to the microdialysis chamber, once a day during 45-min trials, and to drink water from a graded bottle during 15 min for 5 days, or until a stable water consumption baseline was reached. During the next day, the first microdialysis assay and the acquisition of CTA was performed. For the CTA acquisition, water in the graded tube was substituted with 0.1% saccharin solution, and 30 min later, when the microdialysis procedure was finished (see below), the animals were injected i.p. with a LiCl (0.4 M, 7.5 ml/kg) solution to induce digestive malaise (22). For the next 3 days, water baselines were recorded inside the microdialysis chamber, and, on the 10th day, microdialysis was carried out during retrieval (test) of CTA, the water was substituted for 0.1% of saccharin solution to test taste aversion. The saccharin consumption volume was taken as the taste aversion score (see ref. 23). ANOVA with repeated measures for taste aversion was done for acquisition and test aversion days and post-hoc paired *t* test analysis to compare groups.

Microdialysis Procedure. Dialysis was started by connecting the probe inlet (dialysis probes CMA/12 from CMA/Microdialysis (Acton, MA), with a 3 mm total length of membrane) to the micro-infusion pump system (CMA/Microdialysis), which circulated the probe continuously at a rate of 2 μ l/min with Ringer's solution (118 mM NaCl/4.7 mM KCl/2.5 mM CaCl₂). To achieve detectable amounts of ACh in the dialysate, we added 10 μ M neostigmine bromide (Sigma) to the Ringer's solution. Once the three probes were connected to the guide cannulae, the first 30-min sampling was discarded, and nine samples were collected every 15 min (30 μ l/sample) and immediately frozen at -80°C or analyzed by HPLC (Beckman). The general microdialysis procedure in the bilateral NBM probes was as follows: during the first 1 h, 15 min the infusion medium contained only the Ringer's solution; then TTX (1.0 μ M previously diluted in buffer citrate 0.05 M) or Ringer's solution plus buffer citrate (79.9 μ M) was added to the infusion medium for the next 30 min. After this, the perfusion was changed again with Ringer's solution alone and was perfused for an additional hour (see Fig. 1). The unilateral IC probe was perfused all the time (2 h, 45 min) with the Ringer's solution alone. The graded tube with the gustatory stimuli (saccharin 0.1%) was placed in the microdialysis chamber 2 h after the placement of the probe and was retained 15 min during acquisition and test trials.

During the first day of microdialysis, in the acquisition trial, the rats were separated in two groups (see Table 1). One group

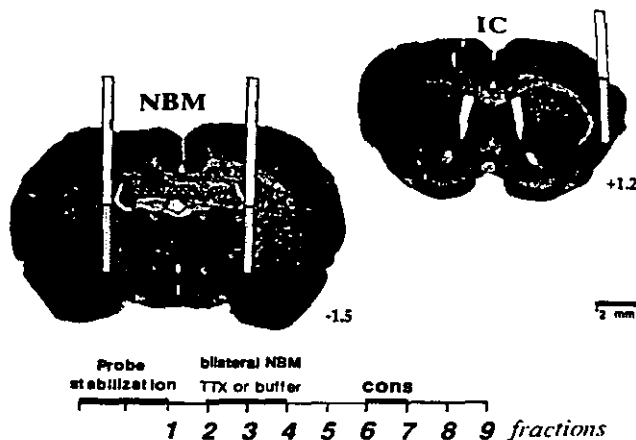


FIG. 1. Microdialysis procedure showing the number of fractions, 15 min each (Lower), and photomicrographs of cresyl violet staining of brain coronal sections, showing an schematic diagram of the probes localization in the IC and bilateral NBM (Upper).

of animals was perfused in the bilateral NBM with buffer (as control group, BA $n = 10$), and the other group was perfused with TTX (TA, $n = 10$) during the third and fourth microdialysis fractions (see Fig. 1). Three days later, in the test trial, the two groups were divided again. The BA group was divided into two groups, one infused with buffer (as control group, BA-B $n = 4$), and the other infused with TTX (BA-T, $n = 6$). The TA group was divided into one infused with buffer (as control group, TA-B, $n = 5$), and the other infused with TTX (TA-T, $n = 5$).

Measurement of ACh. The collected samples were assayed for ACh content by using HPLC (Beckman) with electrochemical detection (BAS, West Lafayette, IN). The samples were injected into a polymeric reversed-phase column (BAS). ACh and choline then were converted into hydrogen peroxide and betaine in a post column enzyme reactor containing immobilized acetylcholinesterase and choline oxidase (BAS). The hydrogen peroxide was detected electrochemically by a platinum electrode set at 500 mV (vs. Ag/AgCl). The mobile phase consisted of a 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.5) and Kathon reagent (BAS). The detection limit was approximately 0.1 pmol.

Histology. One day after microdialysis, the rats were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with a 4% solution of paraformaldehyde in phosphate buffer (0.15 M, pH 7.4). The brains were placed overnight in paraformaldehyde and then transferred to a 20% buffered sucrose solution and stored at 4°C until they were cut. Coronal sections (50 μ M thick) were taken through the areas of the probe. The slide sections were stained for cresyl violet.

RESULTS

Verification of Probe Placement. In all groups, the localization of the guide cannulae and probes was within the IC and in both NBMs. Fig. 1 shows a schematic diagram of the location of the probes from the NBM and IC used for the *in vivo*

Table 1. NBM bilateral infusions procedure during third and fourth fractions of microdialysis in either acquisition or test trial of CTA

Acquisition	Test
Buffer (BA)	Buffer (BA-B)
	TTX (BA-T)
TTX (TA)	Buffer (TA-B)
	TTX (TA-T)

The groups are shown in parentheses.

microdialysis analysis. One animal from the group TA-T was discarded from further analysis because of a misplaced cannula.

Behavioral Results. The results of the TTX effects on CTA are shown in Fig. 2. ANOVA with repeated measures was carried out for the groups that received buffer during acquisition (Fig. 2A). The analysis showed no significant differences among groups [$F(1,8) = 2.135, P > 0.1$] and significant differences between days of consumption [$F(1,8) = 44.15, P < 0.001$] and no interaction [$F(1,8) = 0.722, P = > 0.420$]. The saccharin consumption for groups BA-B and BA-T during the test was significantly lower when compared with their saccharin consumption on the acquisition day (paired t test $P < 0.01$). The TTX treatment during the test had no effect on conditioning, whereas the BA-T group presented a significant decrement in saccharin consumption, indicating that both groups showed strong taste aversions.

For the groups treated with TTX during acquisition (Fig. 2B), the ANOVA with repeated measures revealed that there were no significant differences between groups [$F(1,7) = 1.14, P = 0.321$], nor between days of consumption [$F(1,7) = 0.187, P = 0.678$] and no interaction [$F(1,7) = 0.310, P = 0.595$]. The groups that received TTX treatment during acquisition (TA) did not show any significant decrement of saccharin consumption in the taste trial (TA-B and TA-T), indicating that application of TTX into the IC during acquisition caused a significant disruption of CTA independently of the treatment applied during the test trial.

Release of ACh During CTA Acquisition. Fig. 3A shows the release of cortical ACh during saccharin consumption in the acquisition trial, from the NBM-treated groups with buffer or TTX (BA and TA groups). ANOVA with repeated measures was done with the mean of the two first samples, and then compared with the ACh release obtained during TTX and consumption fractions (3–9 fractions, Fig. 1A). The analysis revealed a borderline difference between groups [$F(1,13) = 2.946, P = 0.1098$], significant differences between fractions [$F(1,13) = 5.3946, P < .0001$], and a significant group \times fraction interaction [$F(1,13) = 3.125, P < 0.01$]. To analyze the source of interaction, we performed a simple ANOVA during each of the fractions. Simple ANOVA of ACh levels revealed significant differences [$F(1,17) = 6.079, P < 0.05$] among groups in the seventh fraction taken after presentation of the gustatory stimuli (135 min after probe implantation). Fisher post-hoc analysis showed that there was a significant difference between control (BA) and the TTX-perfused group (TA) during ac-

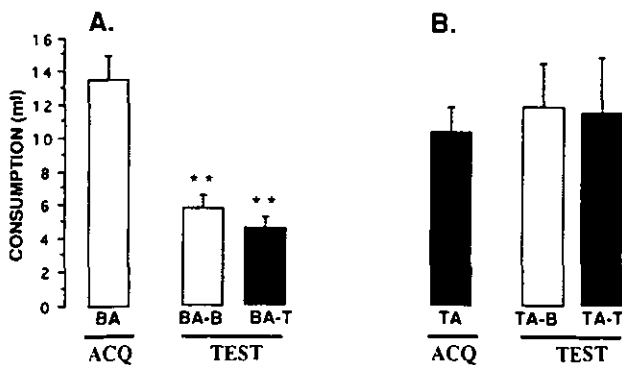


FIG. 2. Mean volume of saccharin consumption (\pm SEM) during acquisition and test of CTA. (A) The control group (BA) that received buffer in the NBM during acquisition in the test trial showed a significant saccharin aversion regardless of the treatment received during the test trial. That is, both the control group (BA-B) and the group that received TTX (BA-T) during the CTA test, showed taste aversion. (B) When TTX was perfused during the acquisition trial (TA), the buffer (TA-B) or TTX (TA-T) groups were not able to show taste aversion. **, paired t test; $P < 0.01$.

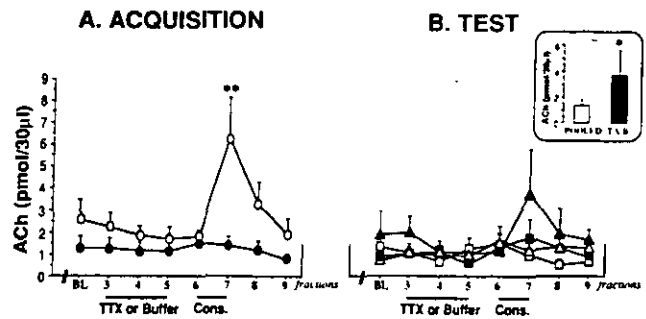


FIG. 3. Mean extracellular levels of ACh in the IC during TTX or buffer perfusion in the acquisition trial (A) and during TTX or buffer perfusion in the retrieval trial (B). (Inset) The ACh release observed in the seventh fraction, after the consumption of the aversive stimuli. The group TA-B was compared with the pooled BA-B, BA-T, and TA-T groups. (BL = mean of the two first samples). \circ , BA group; \bullet , TA group; Δ , BA-B group; \blacktriangle , TA-B group; \square , BA-T group; \blacksquare , TA-T group. Values are means \pm SEM. **, $P < 0.01$, *, $P < 0.05$.

quisition trial ($P < 0.05$), indicating that saccharin consumption produced a significant increase in cortical ACh release in the control group (BA), whereas the TTX treatment produced a reliable blocking in ACh release.

Release of ACh During CTA Retrieval. Fig. 3B shows the release of cortical ACh during the test trial, from the groups treated with buffer or TTX (BA-B, BA-T, TA-B, and TA-T groups) in the NBM, during saccharin consumption in the retrieval trial. ANOVA with repeated measures showed no significant differences between groups [$F(3,12) = 1.609, P = 0.239$], and there were no significant differences between fractions [$F(3,12) = 1.621, P = 0.1405$], and no group \times fraction interaction [$F(3,12) = 1.527, P > 0.09$]. However, we found significant differences between groups when we compared the group TA-B with pooled groups BA-B-BA-T and TA-T [$F(1,17) = 4.619, P < 0.05$], because the last three groups did not show any differences among them (see Fig. 3B).

DISCUSSION

The present study demonstrates that consumption of a novel taste increases release of ACh within the IC of awake, freely moving rats at control conditions. Our results show a significant ACh increase after the control animals drank a saccharin solution, and a clear inhibition of that release when the animals were infused bilaterally with TTX into the NBM. Additionally, we demonstrate that TTX blockade of the NBM results in significant impairment in acquisition, but not retrieval, of CTA. The differential effects found indicate that blocking the NBM during the acquisition phase has effects on the performance of CTA, regardless of the status of the NBM during the evocation period of the behavior. Thus, the control group, which received buffer in the NBM during acquisition, showed a significant saccharin aversion in the test trial regardless of the treatment received during the test trial. In this way, both the control group and the group that received TTX during the CTA test showed taste aversion.

Conversely, the group that received TTX during acquisition showed disrupted taste aversion because its saccharin consumption during retrieval was similar to that in the acquisition trial, regardless of the treatment received during the test trial. Neither of the groups that received buffer or TTX during the test showed a significant decrement in saccharin consumption. Moreover, the group that received TTX during the acquisition and buffer during the retrieval test had an increase of ACh release similar to that observed in the control group during the acquisition trial. This result suggests that blocking the ACh release during acquisition interrupts the information about the novelty of the stimulus and provokes a cortical ACh release

during the second presentation of that stimulus (test trial). Our results show that the release of cortical ACh, immediately after saccharin consumption during the acquisition trial, could be directly related to the possibility of recognition of the novel gustatory stimulus.

The TTX dose used in the present experiment was based on previous work (9, 24) and preliminary experiments of ACh release in the cortex after TTX blockage and simultaneous KCl stimulation of NBM, where the results showed a significantly TTX-blocked cortical ACh release. TTX did not affect other behavioral parameters that have been related to cholinergic afferents, for example, attention or motivation, given that both the control and TTX-treated groups show similar saccharin consumption during the acquisition trial. In the same way, TTX and the number of guide cannulae used did not affect the sensorial and discriminatory properties of the animals to the gustatory stimulus, because the groups treated with TTX or buffer during the test showed a significant taste aversion. The TTX produced a general blockage of neurotransmission for about 4 h (25), and the behavioral effects reported here may not only depend on the cholinergic afferents. It is well known that the principal afferents of the NBM are cholinergic and GABAergic (4–6). In this regard, it recently has been postulated that both cholinergic and GABAergic projections from the BF to the cortex play an important role in the induction of long-term changes in the somatotopic organization of primary somatosensory cortex, which involve a simultaneous γ -aminobutyric acid disinhibition and increased ACh release (26).

We have demonstrated that bilateral excitotoxic lesions of the NBM prevent the acquisition of CTA and produced a significant reduction of acetylcholinesterase and acetyltransferase activities of K^+ -stimulated [3H]acetylcholine release after the lesion. These lesions did not have any effect on the glutamate decarboxylase activity or γ -amino[^{14}C]butyric acid release from IC slices (20). In addition, we recently demonstrated that repeated injections of anti-nerve growth factor into the IC produce a dramatic decrease of cortical ACh and a significant decrement of NBM-cortical afferents, which impaired acquisition, but not retrieval, of conditioned taste aversion and inhibitory avoidance. However, the learning deficits observed in these experiments might not only be the result of the resulting cholinergic deafferentation, because nerve growth factor-mediated signaling in the cortex is also necessary for sustaining neuronal metabolic and functional integrity, apart from the supporting the ascending cholinergic fibers (22). Given these results, it seems that the BF pathway is involved only in the acquisition of aversively motivated conditioning, and not in retrieval of aversive memories.

The results of this research demonstrate that the temporary blockage of the NBM disrupted the acquisition, but not the retrieval, of aversive memories and seems to be related with the *in vivo* ACh release. It should be pointed out that ACh is required during acquisition because the ACh increase observed during learning does not occur during test retrieval, and the retrieval of the learned information is still observed. These results suggest that cholinergic NBM projections to the cortex are related to the novelty of the stimulus. Preliminary results in our laboratory show that the cortical ACh release produced by a novel stimulus decreased after several presentations of the same stimulus, reaching the same ACh levels as those induced by water, indicating the role of ACh in the recognition or encoding of the novelty of the stimulus. In this regard, a recent work by Naor and Dudai (21) has suggested that cholinergic neuromodulation participates in memory formation to aversive stimulus in the IC, either by encoding novelty at the cellular level, or by instructing the neural circuits to store the novel taste representation (27). They showed that after CTA training there is a rapid and marked increase in tyrosine phosphorylation of a set of proteins in the IC but not in other

brain areas. The enhancement of protein tyrosine phosphorylation produced by unfamiliar taste during acquisition of CTA could be mimicked by micro injections of carbachol and blocked by muscarinic antagonist. Moreover, ACh increments during consumption of novel gustatory stimuli, like saccharin or quinine, have been reported by Shimura and coworkers (12).

The involvement of the *in vivo* release of ACh in the associative phase of learning also has been demonstrated in the acquisition of operant behaviors. Thus, significant increments of ACh release occurred only when a steady rise in the number of lever pressings, indicating that the rats began to associate lever operation with reward (28). Conversely, when the animals were already well trained in lever pressing, the authors did not find any increase in ACh release in the cortex or in the hippocampus during performance. This finding indicates that the ACh release plays a role in the early stages of learning but not during the retrieval phase of the operant behavior.

Additionally, the role of the BF in learning-induced plasticity has been underlined by recent reports by Kilgard and Merzenich (29) and Weinberger and coworkers (30, 31). Weinberger *et al.* demonstrated that the convergence in the auditory cortex of acoustic frequency information and the application of cortical ACh or electrical stimulation of the nucleus basalis induced receptive field plasticity similar to that produced by behavioral learning, and this plasticity was blocked by muscarinic antagonists. Others have shown that cholinergic activation can facilitate the formation of long-lasting, experience-dependent changes in the response properties of neocortical sensory neurons in a variety of contexts (32–34). The above results suggest that the cholinergic system, as a neuromodulator, may facilitate cortical plasticity by signaling the stimulus relevance during memory formation and are in accord with the hypothesis that ACh modulates the general efficacy of the sensory cortical processing or association of information (35).

In conclusion, our results suggest that the increase in ACh release seen in the IC during acquisition of CTA in free-moving animals reflects the involvement of the cortical cholinergic system in encoding new items during the early stages of memory formation.

We acknowledge the assistance of Oreste Carbajal and Federico Jandete and give thanks to Shaun Harris for his text review, and to Yolanda Diaz de Castro for preparing the manuscript. This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Grant 3260-P-N9608.

- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R., Clarke, A. W., Coyle, J. T. & DeLong, M. R. (1982) *Science* **215**, 1237–1239.
- Bartus, R. T., Flicker, C., Dean, R. L., Pontecorvo, M., Figueiredo, J. C. & Fisher, S. K. (1985) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **23**, 125–135.
- Flicker, C., Dean, R., Watkins, D. L., Fisher, S. K. & Bartus, R. T. (1983) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 973–981.
- Fisher, R. S., Buchwald, N. A., Hull, C. D. & Levine, M. S. (1988) *J. Comp. Neurol.* **272**, 489–502.
- Freund, T. F. & Meskenaite, V. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 738–742.
- Jones, B. F., Mainville, L., Mancina, M. & Gritti, I. (1995) *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**, 1617.
- Jiménez-Capdeville, M. E. & Dykes, R. W. (1993) *Brain Res.* **625**, 152–158.
- Day, J., Damsma, G. & Fibiger, H. C. (1991) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**, 723–729.
- Rosenblad, C. & Nilsson, O. G. (1993) *Neuroscience* **55**, 353–362.
- Inglis, F. M. & Fibiger, H. C. (1995) *Neuroscience* **66**, 81–86.
- Kurosawa, M., Sato, A. & Sato, Y. (1992) *Neurochem. Intl.* **21**, 423–427.
- Shimura, T., Suzuki, M. & Yamamoto, T. (1995) *Brain Res.* **679**, 221–226.

13. Acqas, E., Wilson, C. & Fibiger, H. C. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 3089–3096.
14. Inglis, F. M., Day, J. C. & Fibiger, H. C. (1994) *Neuroscience* **62**, 1049–1056.
15. Rasmusson, D. & Szerb, J. C. (1976) *Brain Res.* **104**, 243–259.
16. Sarter, M. F. & Bruno, J. P. (1994) *Trends Neurosci.* **17**, 217–221.
17. Butt, A. E., Testylier, G. & Dykes, R. (1997) *Psychobiology* **25**, 18–33.
18. Kiefer, S. W. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **443**, 100–109.
19. Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. & Yamamoto, T. (1998) *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind* (Oxford Univ. Press, New York).
20. López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Escobar, M. L., Bermúdez-Rattoni, F. & Tapia, R. (1993) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **45**, 147–152.
21. Naor, C. & Dudai, Y. (1996) *Behav. Brain Res.* **79**, 61–67.
22. Gutiérrez, H., Miranda, M. I. & Bermúdez-Rattoni, F. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 3796–3803.
23. Miranda, M. I., López-Colomé, A. M. & Bermúdez-Rattoni, F. (1997) *Brain Res.* **759**, 141–148.
24. Bermúdez-Rattoni, F., Introvini-Collinson, I. B. & McGaugh, J. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5379–5382.
25. Zhuravin, I. A. & Bures, J. (1991) *Exp. Brain Res.* **83**, 687–690.
26. Dykes, R. W. (1997) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 535–545.
27. Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S. & Dudai, Y. (1996) *NeuroReport* **7**, 1401–1404.
28. Orsetti, M., Casamenti, F. & Pepeu, G. (1996) *Brain Res.* **724**, 89–96.
29. Kilgard, M. P. & Merzenich, M. M. (1998) *Science* **279**, 1714–1718.
30. Metherate R. & Weinberger, N. M. (1990) *Synapse* **6**, 133–145.
31. Bakin J. S. & Weinberger, N. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11219–11224.
32. Butt, A. E., Testylier, G. & Dykes, R. (1997) *Psychobiology* **25**, 18–33.
33. Baskerville, K. A., Heaston, N. R., Schweitzer, J. B. & Herron, P. (1995) *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**, 123.
34. Bear, M. F. & Singer, W. (1986) *Nature (London)* **320**, 172–176.
35. Sarter, M. & Bruno, J. P. (1997) *Brain Res. Rev.* **23**, 28–46.

Artículo 2:

Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus.



CORTICAL CHOLINERGIC ACTIVITY IS RELATED TO THE NOVELTY OF THE STIMULUS

MARÍA ISABEL MIRANDA, LETICIA RAMÍREZ-LUGO AND FEDERICO BERMÚDEZ-RATTONI¹

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F.

Key words: Acetylcholine, rat free-moving microdialysis, gustatory cortex, cholinergic basal forebrain.

¹Federico Bermúdez Rattoni, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-253, 04510, México D.F. Tel. (525) 6225626, FAX (525) 6225607.

e-mail: fbermude@ifisiol.unam.mx

20 pages

3 figures

Abstract

A number of studies have related cholinergic activity to the mediation of learning and memory. However, the acetylcholine (ACh) participation has been recently implicated in the early stages of learning but not during memory retrieval. The aim of the present study is to evaluate ACh release in the insular cortex (IC) during presentation of different taste stimuli and during their re-exposition by means of the free-moving microdialysis technique. We evaluated the changes in ACh release when a novel taste, saccharin or quinine was presented to the rat and after several presentations of saccharin. Unilateral microdialysis was performed in the IC one hour before and one hour after the presentation of: 1) a familiar stimulus (water), 2) a novel taste (quinine), 3) another novel taste (saccharine), 4) a second presentation, 5) a third presentation, and 6) a fourth presentation of saccharine. The volume consumed by the animals was registered as a behavioral parameter. The ACh levels from the microdialysis fractions were analysed by an HPLC-ED system. Biochemical results showed a significant increment in the cortical ACh release induced by a novel stimulus compared with the release observed during the presentation of a familiar stimulus. The ACh release observed after several presentations of the stimuli decreased to the same levels as those produced by the familiar taste, indicating an inverse relationship between familiarity and cortical ACh release. These results suggest that the cholinergic system plays an important role in the identification and characterization of different kinds of stimuli.

Introduction

The acetylcholine (ACh) is released in the rat neocortex in response to a variety of behavioural and environmental conditions, including wakefulness, motor activity (Day et al., 1991), restraint- or handling-induced stress (Rosenblad and Nilsson, 1993) and by exposure to auditory, visual and gustatory stimulation (Inglis and Fibiger, 1995; Shimura and Yamamoto, 1995). In this regard, a modulatory role for ACh in the activity of cortical neurones has been suggested by observations from electrophysiological and biochemical studies (Day et al., 1991; Bakin and Weinberger, 1996). In addition to these findings, which demonstrate differences in ACh release related to different states of arousal, other evidence suggests that associative conditioning may also modify ACh release in the neocortex (Acquas et al., 1996; Inglis et al., 1994; Rasmusson and Szerb, 1976; Sarter and Bruno, 1994). Thus, it has been demonstrated that a significant enhancement of cortical ACh release is associated with appetitive conditioning procedures (Inglis et al., 1994). Moreover, training for acquisition of tactile discrimination performance causes a specific enhancement in ACh release in the somatosensory cortex (Butt et al., 1997).

The insular gustatory cortex (IC) has been involved in the mnemonic gustatory representation (Bures et al., 1998). This cortex is an important region for the acquisition, consolidation and retrieval of conditioned taste aversion (CTA) task, a robust and important behavioral model widely used for studying the neurobiology of learning processes (Garcia et al., 1985). It has been reported that cholinergic mechanisms are involved in CTA formation (López-García et al., 1990; Naor and Dudai, 1996). For instance, it has been shown that ACh release in the IC is induced by the simple

presentation to taste stimuli and this release is influenced by behavioural expression to aversive taste stimuli (Shimura and Yamamoto, 1995). Moreover, when muscarinic antagonists were microinjected bilaterally into IC shortly before the exposure of the rat to a novel taste, the treatment blocked the CTA (Naor and Dudai, 1996; Bermúdez-Rattoni et al., 1995). Additionally, it has been demonstrated that cortical microinjections of muscarinic antagonists before the first exposure of saccharin enhanced the novelty of the taste when is presented for second time, in an incidental learning situation (Naor and Dudai, 1996). During incidental learning the organism acquires information which does not seem to be associated with notable events but it has the potencial effect to attenuate the CTA. (Dudai, 1989)

Recently, we found that consumption of a novel taste increases release of ACh within the IC of awake, free-moving rats under control conditions. Our results showed a significant ACh increase after the control animals drank a saccharin solution for the first time. Additionally, we demonstrated that tetrodotoxin (TTX) -blockage of the nucleus basalis magnocellularis (NBM), the most important cholinergic afferent to the cortex, impairs acquisition but not retrieval of CTA (Miranda and Bermúdez-Rattoni, 1999). Taken together, these data suggest that in the IC, the cholinergic system plays a role in encoding the representation of gustatory stimuli. However, little is known of the role of cortical ACh in non-associative learning or incidental learning of a gustatory stimuli.

Since lesions or pharmacological blockade of cortical cholinergic activity disrupt only acquisition of CTA, the release of ACh seems to be related to the early stages of memory taste formation. Therefore, the principal goal of the present experiment was to measure extracellular ACh release in the insular cortex of free-moving rats, using the

microdialysis technique, during presentation of novel, semi-familiar and familiar gustatory stimulus.

A preliminary report of this study has been presented in abstract form (Miranda et al., 1998).

Materials and methods

Experimental animals

Twenty-five male Wistar rats weighing 275-325 g at the time of surgery were used. The animals were housed under a 12 h light-dark cycle, with food and water ad libitum, except during behavioral tests.

Guide cannula implantation

All the animals were anaesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and were implanted in the right IC (AP= +1.2 mm, ; L=+ 5.5 mm from Bregma; V= -5.5 mm from dura), with one microdialysis guide cannula (CMA/12) using standard stereotaxic procedures. The guide cannula was kept in place with three skull screws and dental acrylic cement.

Behavioral procedures

Two or three days after surgery, all the animals were deprived of water for 24 h and then habituated to the microdialysis chamber once a day during 45 min trials, and to drink water from a graded bottle during 15 min for 5 days, or until a stable water consumption baseline was reached. The rats were then separated into 6 groups, and each one received one microdialysis session during the presentation of a determined taste (see Figure 1).

-----Insert Figure 1 about here-----

During day nine, the novel (saccharin (SAC-1, n=6), quinine (QUIN, n=3)) and familiar (water (WATER, n=4), second (SAC-2, n=5), third (SAC-3, n=4) and fourth (SAC-4, n=3) presentations of saccharin) taste groups were subjected to microdialysis during consumption of a given taste (see figure 1-A and C). The familiar groups were given a saccharin solution inside the microdialysis chamber, one, two or three days before the day of microdialysis session. Liquid consumption was recorded during all presentations of water, saccharin or quinine. Simple ANOVA and post-hoc paired Fisher analysis to compare pair wise groups, were performed for all groups on the consumption and ACh levels obtained during microdialysis day.

Microdialysis procedure

Dialysis was started by connecting the probe inlet (dialysis probes CMA/12 from CMA/Microdialysis, with a 3 mm total length of membrane) to the micro-infusion pump system (CMA/Microdialysis), which circulated the probe continuously at a rate of 2 μ l/min with Ringer solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, and 2.5 mM CaCl₂) during the entire microdialysis procedure. To achieve detectable amounts of acetylcholine in the dialysate, we added 10 mM neostigmine bromide (Sigma) to the Ringer solution. Once the probe was connected to the guide cannula, the first 45 min sampling was discarded, and 7 samples were collected every 15 min (30 μ l/sample) and immediately frozen at -80°C or analysed by high performance liquid chromatography and

electrochemical detection (HPLC-EC).

The general microdialysis procedure in all groups was as follows (see figure 1-C): During the first 1 h 15 min, the rats were left in the microdialysis chamber without any stimulus. The graded bottle with the gustatory stimuli (water, saccharin or quinine according to the group, see figure 1-A) was placed in the microdialysis chamber during the next 15 min; after this, the microdialysis continued for 1 h more.

Measurement of ACh

The collected samples were assayed for ACh content by HPLC (Beckman) with electrochemical detection (BAS). The samples were injected into a polymeric reversed phase column (BAS); ACh and choline were then converted into hydrogen peroxide and betaine in a post-column enzyme reactor containing immobilised acetylcholinesterase and choline oxidase (BAS). The hydrogen peroxide was detected electrochemically by a platinum electrode set at 500 mV (vs Ag/AgCl). The mobile phase consisted of a 50 mM sodium phosphate-buffer (pH 8.5) and Kathon reagent (BAS). The detection limit was approximately 0.1 pmol.

Histology

One day after microdialysis, the rats were deeply anaesthetised with pentobarbital and perfused transcardially with a 4% solution of paraformaldehyde in phosphate buffer (0.15M, pH 7.4). The brains were placed overnight in paraformaldehyde and then transferred to a 20% buffered sucrose solution and stored at 4°C until they were cut. Coronal sections (50 µm thick) were taken through the areas of the probe. The slide sections were stained by the cresyl violet procedure.

Results

Verification of probe placement

Histological examinations revealed that the localization of the guide cannulae and probes was within the IC in all groups (Figure 1-B). Although the probes invaded a small part of the parietal cortex, we assumed that the major ACh release measured comes from the gustatory insular cortex (see (Miranda and Bermúdez-Rattoni, 1997; Miranda and Bermúdez-Rattoni, 1999)).

Behavioral results

The drinking scores are shown in Figure 2. The basal volume consumption (water) for all groups was approximately 10 ml. The water consumption score during the microdialysis assay was similar to that observed during the previous basal water consumption and the consumption observed in previous experiments. In the same way, the first consumption of the different tastes (saccharin and quinine) observed during the microdialysis assay was similar to the water consumption (see figure 2). Simple ANOVA was carried out for the all groups. On the day of the taste test (day 9; figure 1-A), the analysis showed significant differences among groups ($F(5,19)=3.434$ $p<.022$). Post hoc analysis revealed that the groups which received saccharin three or four times (SAC-3 and SAC-4) showed significant increment consumption when compared with the water consumption group ($p's<0.05$). As expected, the rats presented a saccharin preference, because there were significant increments in saccharin consumption during

the third (SAC-3), as compared to the first (SAC-1) presentation of taste ($p < 0.05$). Moreover, we found significant increased consumption during the fourth presentation (SAC-4) as compared with the first presentation of saccharin (SAC-1) or quinine (QUIN) ($p < 0.01$), and with the second presentation of saccharin (SAC-2) ($p < 0.05$) (figure 2).

-----Insert Figure 2 about here-----

Release of ACh during consumption

Figure 3 shows the release of cortical ACh during taste test consumption. ANOVA was done with the mean of the fourth microdialysis sample (which was the only one that showed significant differences between groups), obtained immediately after consumption fraction (see Figure 1-C). Simple ANOVA was carried out for all groups. The analysis showed significant differences among groups ($F(5,19)=4.043$ $p < 0.011$) during the release of ACh. Post hoc analysis showed significant increments in cortical ACh release between the group that received the first presentation of saccharin (SAC-1) and quinine (QUIN) compared with the water consumption group ($p < 0.01$). Additionally, we found a significant increment in ACh release during consumption of the first saccharin presentation (SAC-1) compared with the release during the second (SAC-2), third (SAC-3) and fourth (SAC-4) presentations of saccharin ($p < 0.05$). In the same way, we observed significant differences between ACh release during quinine (QUIN) consumption, and during the third (SAC-3) and fourth (SAC-4) saccharin

presentation ($p's < 0.05$).

-----Insert Figure 3, about here-----

Discussion

The results reported here demonstrate that ACh is released in the IC when the rats have free access to liquid consumption. A few minutes after consumption of a familiar taste (water), a significant increase (245%) of ACh release is observed, as compared with the baseline release before the taste presentation. However, when the stimulus is a novel taste (saccharin or quinine), the ACh release observed increases significantly (243%) when it is compared to the release induced by a familiar stimulus (water), and significantly greater (661%) when it is compared from its baseline release. Accordingly, when the novel taste (saccharin) is presented several times during habituation, the ACh release decreases to the levels observed with the familiar stimulus. The important finding of this experiment is that the consumption of a novel stimulus induces a significant increment in the cortical ACh release, and after several presentation of this novel stimulus, cortical ACh release decreases to the same levels as those produced by a familiar stimulus. In other words, cortical ACh release is in inverse proportion to the familiarity of the taste.

The incidental learning observed in this experiment, is an elementary paradigm of learning that reflects a preference response to a learned inconsequential stimulus due to familiarity, and involves several behavioral processes, such as responses to novelty, which required learning-related processes and recognition or recall. In this regard, open

field exploration and its habituation is another behavioral model that is closely related to cholinergic activity of the hippocampus. Recent results (Thiel et al., 1998), have shown that exposure of rats to a novel environment lead to an increased extracellular levels of hippocampal ACh which were positively correlated to exploratory behavior. When re-exposing the same animals once more to the same environment, the exploratory behavior decreased, but cholinergic activation remained high. The apparent contradictory result with ours, may depend on the paradigm used and in the differences of cholinergic activation involved in the stages of attention and learning, and the different cerebral region related to that particular behavior (Blokland, 1996; Fibiger, 1991; Lydon, 1995; Sarter et al., 1996).

A number of studies have shown that the insular gustatory neocortex is strongly involved in mnemonic gustatory representation during the taste aversion paradigm, where the animal acquires aversion to a taste cue when it is followed by digestive malaise (Bures et al., 1998; Kiefer, 1985). Furthermore, cholinergic activity in the IC was found to be related to taste processing by in vitro studies that showed [³H]acetylcholine release after K⁺-stimulation (López-García et al., 1990), and more recently by in vivo studies with intraoral infusions of various taste stimuli that revealed an induction of ACh release in the IC, but not in the parietal cortex (Shimura and Yamamoto, 1995). The ACh plays an important role only in the early stages of the CTA; for example, it has been shown that shortly before the exposure of the rat to a novel taste (or conditioned stimulus), the muscarinic antagonist scopolamine blocks conditioned taste aversion, and this antagonist has no effect when microinjected shortly after exposure or during recall (Naor and Dudai, 1996).

Recently we demonstrated that temporary TTX-blockage of the NBM disrupted acquisition but not recall of taste aversive memory. The behavioral results of these experiments showed significant impairment in CTA acquisition when the TTX was infused in the NBM, whereas retrieval was not affected when the treatment was given during the test trial. Biochemical results showed that TTX-infusion into the NBM produced a marked decrease in cortical ACh release as compared to the controls during consumption of saccharin in the acquisition trial. Depleted ACh levels were found during the test trial in all groups except in the group that received TTX during acquisition. These results suggest a cholinergic-dependent process during acquisition, but not during memory retrieval, and that NBM-mediated cholinergic cortical release may play an important role in early stages of learning, but not during recall of aversive memories (Miranda and Bermúdez-Rattoni, 1999). Additionally, the cortical ACh decrements during the taste familiarity observed in this report, indicate an important correlation between cortical cholinergic activity and the novelty codification of the taste.

This data agree with previous reports that suggest an important cholinergic role during processing of the novel stimulus representation (Naor and Dudai, 1996; Orsetti et al., 1996). It is well known that pre-exposure of the animal to the new taste stimulus several times before acquisition of CTA, attenuates acquisition of the conditioned aversion; this process is called latent inhibition. Dudai and co-workers demonstrated that cortical micro-injections of scopolamine 20 min before pre-exposure to the novel taste disrupted latent inhibition, proving that blockade of cholinergic activity in the IC during the first presentation of a non-familiar taste interfered with the representation of a novel taste (Naor and Dudai, 1996). In this regard, it has been proposed that ACh, as a

neuromodulator, may facilitate cortical plasticity by signalling the stimulus relevance during memory formation. Additionally, a rapid and marked enhancement of protein tyrosine phosphorylation of a set of neuronal and synaptic proteins, including the *n*-methyl-*d*-aspartate receptor subunit 2B (NR2B) has been shown in the IC, but not in other brain areas, after presentation of a non-familiar taste during conditioned taste aversion training (Rosenblum et al., 1995). The protein tyrosine phosphorylation enhancement produced by an unfamiliar taste can be mimicked by microinjections of the cholinergic agonist carbachol (Rosenblum et al., 1996).

Cortical ACh is hypothesised to modulate the general efficacy of the cortical processing of sensory or associational information. Specifically, cortical cholinergic inputs mediate the abilities of the subjects to detect and select stimuli (Sarter and Bruno, 1997). Moreover, the role of cholinergic activity in learning-induced plasticity has been underlined by recent reports (Bakin and Weinberger, 1996; Baskerville et al., 1995; Butt et al., 1997), which demonstrated that the convergence, in the auditory cortex, of acoustic frequency information and application of cortical ACh, induced receptive field facilitation similar to that produced by behavioral learning, and these changes could be blocked by muscarinic antagonists (Bakin and Weinberger, 1996). Taking in conjunction, all these data suggest that ACh selectively influences those cortical cells involved in early stages of learning, leading to the morphological changes that incorporate the context and the meaning of the stimulus; i.e., familiar vs non-familiar (Woolf and Butcher, 1996).

In conclusion, the results of this research show that the cortical ACh release produced by a novel stimulus decreased after several presentations of the same stimulus,

reaching the same ACh levels as those induced by a familiar taste i.e., water. This suggests that ACh has a role in the recognition or encoding of the novelty of the stimulus.

Acknowledgements

This research was supported by CONACyT 31842-N. We acknowledge the assistance of Oreste Carbajal and Federico Jandete and give thanks to Shaun Harris for his text review, and to Yolanda Díaz de Castro for preparing the manuscript.

Abbreviations

acetylcholine (ACh), insular cortex (IC), conditioned taste aversion (CTA), tetrodotoxin (TTX), nucleus basalis magnocellularis (NBM), high performance liquid chromatography and electrochemical detection (HPLC-EC),

References

- Acquas, E., C. Wilson, and H.C. Fibiger (1996) Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J. Neuroscience* 16:3089-3096.
- Bakiri, J.S. and N.M. Weinberger (1996) Induction of a physiological memory in the cerebral cortex by stimulation of the nucleus basalis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:11219-11224.
- Baskerville, K.A., N.R. Heaston, J.B. Schweitzer, and P. Herron (1995) Role of acetylcholine in experience dependent plasticity in the somatosensory cortex of the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:123
- Bermúdez-Rattoni, F., C. Ormsby, M.L. Escobar , and E. Hernández-Echeagaray (1995) The role of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. In J.L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, and R.A. Prado-Alcalá (eds): *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*. Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Associates, pp. 67-82.
- Blokland, A. (1996) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res. Rev.* 21:285-300.
- Bures, J., F. Bermúdez-Rattoni , and T. Yamamoto (1998) *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind*. New York: Oxford University Press.
- Butt, E.A., G. Testtlyer, and R.W. Dykes (1997) Acetylcholine release in rat frontal and somatosensory cortex is enhanced during tactile discrimination learning.

Psychobiology 25:18-33.

Day, J., G. Damsma, and H.C. Fibiger (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 38:723-729.

Dudai, Y. (1989) *The neurobiology of memory: Concepts, findings, trends*, Oxford University Press, N.Y. p.19.

Fibiger, H.C. (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14:220-223.

García, J., P.S. Lasiter, F. Bermúdez-Rattoni, and D.A. Deems (1985) A general Theory of aversion learning. In M.S. Braveman and P. Bronstein (eds): *Experimental assessments and clinical applications of conditioned food aversions*. Ann. N.Y. Acad. Sci., pp. 8-21.

Inglis, F.M., J. Day, and H.C. Fibiger (1994) Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal. *Neuroscience* 62:1049-1056.

Inglis, F.M. and H.C. Fibiger (1995) Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 66:81-86.

Kiefer, S.W. (1985) Neural mediation of conditioning food aversions. *Ann. NY Acad. Sci.* 443:100-109.

- López-García, J.C., J. Fernández-Ruiz, F. Bermúdez-Rattoni, and R. Tapia (1990) Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Res.* 523:105-110.
- Lydon, R.G. (1995) Cholinergic neurons and memory: an historical perspective and overview of current research. In T.W. Stone (ed.): *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Acetylcholine*. Boca Raton: CRC, pp. 197-232.
- Miranda, M.I. and F. Bermúdez-Rattoni (1997) Recovery of taste aversion learning induced by fetal neocortex grafts: correlation with in vivo extracellular acetylcholine. *Brain Res.* 759:141-148.
- Miranda, M.I. and F. Bermúdez-Rattoni (1999) Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:6478-6482.
- Miranda, M.I. Ramírez-Lugo, L. and F. Bermúdez-Rattoni (1998) Microdialysis in free moving rats reveals differential release of acetylcholine during consumption of a familiar, novel, or aversive taste stimuli. *Soc. Neurosci. Abstr.* 76:12.
- Naor, C. and Y. Dudai (1996) Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.* 79:-61
- Orsetti, M., F. Casamenti, and G. Pepeu (1996) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res.*

- Rasmusson, D.D. and J.C. Szerb (1976) Acetylcholine release from visual and sensorimotor cortices of conditioned rabbits: The effects of sensory cueing and patterns of responding. *Brain Res.* 104:243-259.
- Rosenblad, C. and O.G. Nilsson (1993) Basal forebrain grafts in the neocortex restore in vivo acetylcholine release and respond to behavioural activation. *Neuroscience* 55:353-362.
- Rosenblum, K., D.E. Berman, S. Hasvi, and Y. Dudai (1996) Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *NeuroReport* 7:1401-1404.
- Rosenblum, K., R. Schul, N. Meiri, Y.R. Hadari, Y. Zick, and Y. Dudai (1995) Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:1157-1161.
- Sarter, M. and J.P. Bruno (1994) Cognitive functions of cortical Acetylcholine: lessons from studies on trans-synaptic modulation of activated efflux. *TINS.* 17:217-221.
- Sarter, M., J.P. Bruno, B. Givens, H. Moore, J. McGaughy, and K. McMahon (1996) Neuronal mechanisms mediating drug-induced cognition enhancement: cognitive activity as a necessary intervening variable. *Cogn.Brain Res.* 3:329-343.
- Sarter, M. and J.P. Bruno (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res.Rev.* 23:28-46.
- Shimura, T. and T. Yamamoto (1995) Aversive taste stimuli facilitate extracellular

acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study.
Brain Res. 679:221-226.

Thiel, C.M., J.P. Huston, and R.K.W. Schwarting (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85:1253-1262.

Woolf, N.J. and L.L. Butcher (1996) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res.Bull.* 16:603-637.

Figure 1. Microdialysis procedure showing: (A) table for consumption groups and presentation of saccharin and its habituation, (B) schematic diagram of the probes localization in the IC and, (C) the number of fractions (15 min each) during microdialysis session.

Figure 2. Mean volume of saccharin consumption (+/- S.E.M.) during presentation of various taste stimuli. * $p < 0.05$ vs WATER and SAC-1. ^Δ $p < 0.05$ vs SAC-2 .

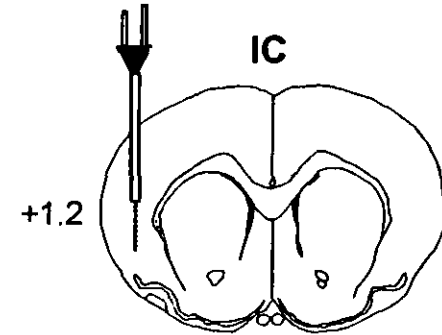
Figure 3. Mean extracellular levels of ACh in the IC during the fourth fraction of microdialysis, just after the drinking of different tastes. Values are means +/- S.E.M. ** $p < 0.01$ vs WATER. ^Δ $p < 0.05$ vs SAC-2, SAC-3 and SAC-4. [°] $p < 0.05$ vs SAC-3 and SAC-4.

Microdialysis Procedure

A.

TEST / DAYS	Microdialysis day				
	1 - 5	6	7	8	9
Familiar <i>(WATER)</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	Water MD
Novel taste: <i>Quinine (QUIN)</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	Quinine MD
Novel Taste <i>Saccharin (SAC-1)</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	Saccharin MD
Saccharin-2 <i>(SAC-2)</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	saccharin	Saccharin MD
Saccharin-3 <i>(SAC-3)</i>	<i>water</i>	<i>water</i>	saccharin	saccharin	Saccharin MD
Saccharin-4 <i>(SAC-4)</i>	<i>water</i>	saccharin	saccharin	saccharin	Saccharin MD

B.



C.

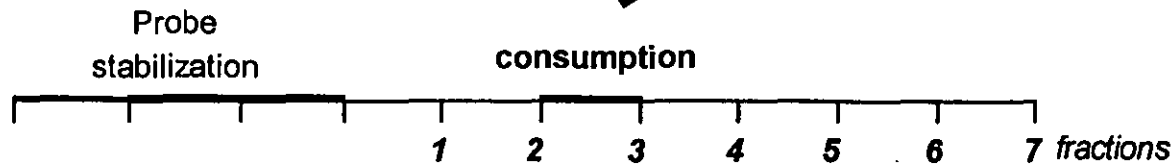


Figure 3.

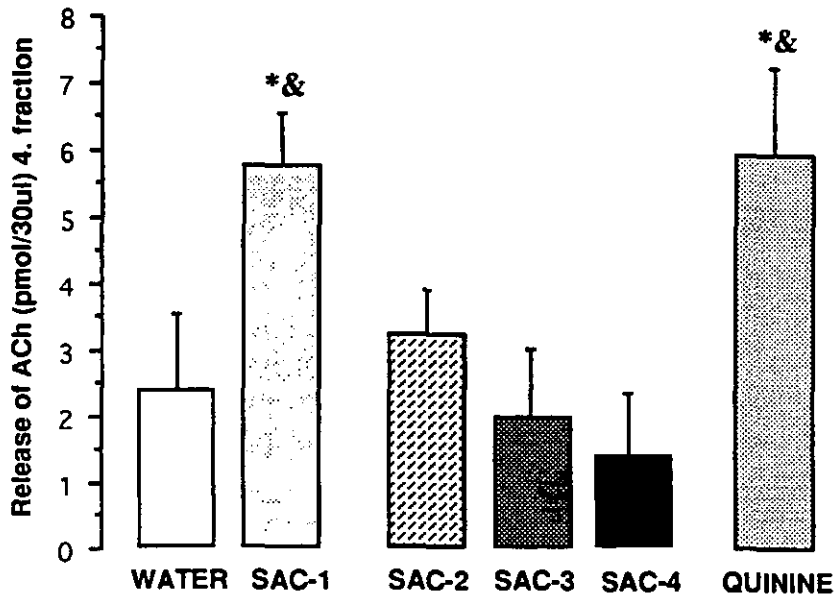
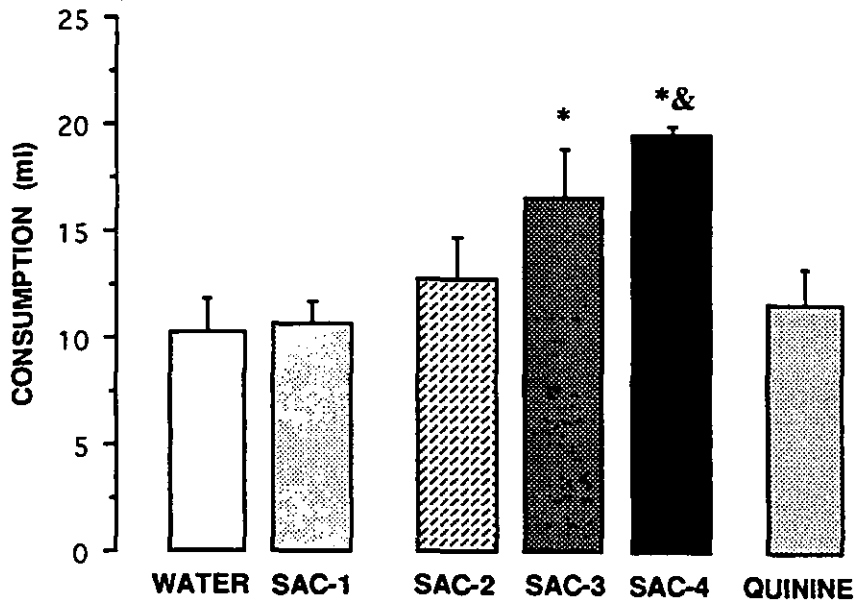


Figure 2.



Resultados y conclusiones generales



El consumo de diferentes clases de estímulos gustativos provoca una liberación diferencial de acetilcolina en la corteza insular.

Los estudios incluidos en los dos artículos adjuntos demuestran la liberación de ACh en la CI de la rata durante el libre consumo de líquido; la presentación de un estímulo familiar como el agua incrementa significativamente la liberación de ACh extracelular. Cuando el estímulo gustativo es un sabor novedoso, como la sacarina o quinina, la liberación de ACh aumenta significativamente sobre la liberación provocada por el estímulo familiar. La habituación de este sabor novedoso, es decir la presentación repetida posterior, ocasiona que los niveles significativamente elevados regresen a los valores de liberación observados durante el consumo de agua, un sabor altamente habituado.

Adicionalmente, se observó que la presentación de un estímulo aversivo (sacarina apareada previamente con LiCl o quinina a concentraciones elevadas), no provoca ningún cambio sobre la liberación basal de ACh en la CI, lo que indica que la evocación del CAS, no está correlacionada con la liberación colinérgica cortical.

La liberación de ACh observada durante el consumo es bloqueada por TTX en el NBM.

El aumento significativo en la CI de la liberación de ACh durante el consumo del sabor novedoso (solución de sacarina) es claramente inhibido cuando los animales son infundidos bilateralmente en el NBM con TTX. Como el sabor aversivo no se correlaciona con algún cambio en la liberación basal de ACh, tampoco es sorprendente que el bloqueo del NBM no haya provocado ningún cambio en la liberación cortical

durante la prueba del sabor aversivo.

Sin embargo, un dato interesante es el aumento en la liberación de ACh observado el día de la segunda presentación de sacarina pareada previamente con LiCl, en los animales bloqueados con TTX durante la primera presentación. Este resultado sugiere que el bloqueo de la liberación de ACh durante la presentación del sabor no-familiar interrumpe la información sobre la novedad del estímulo, lo que provoca, además de la pérdida de la adquisición la asociación aversiva, una liberación cortical de ACh durante la segunda presentación de este estímulo, parecida a la que produce el estímulo presentado por primera vez (recuadro Figura 3, Artículo 1).

La inactivación con TTX del NBM sólo afecta la adquisición del CAS

Con los experimentos descritos en el primer artículo, pudimos demostrar que el bloqueo con TTX del NBM provoca un severo deterioro en la posibilidad de adquirir, pero no en la de evocar, el CAS. Es decir, el efecto diferencial provocado por la inactivación del NBM en el aprendizaje y la memoria del CAS, indica que el bloqueo de la liberación de ACh observado en la CI, sólo tiene efecto sobre el CAS durante la fase de adquisición, independientemente del estado del NBM durante la fase de evocación de la conducta; como se pudo comprobar con el grupo control (que recibió buffer en el NBM durante la adquisición) que mantuvo una clara aversión a la sacarina independientemente del tratamiento (Buffer o TTX) durante la evocación. Sin embargo, el grupo que recibió TTX durante la adquisición del CAS, mostró incapacidad para adquirir aversión al sabor, ya que su consumo durante la evocación fue similar al del día de la adquisición, independientemente del tratamiento recibido durante el día de la prueba.

En conjunto, todos estos datos muestran que la liberación colinérgica cortical, observada inmediatamente después del consumo de sacarina durante la adquisición, podría estar directamente relacionada con la capacidad de reconocimiento de un estímulo gustativo novedoso.

El uso de TTX no bloquea sólo la transmisión colinérgica basalocortical

El uso de TTX no afectó otros parámetros conductuales que han sido relacionados con las aferencias colinérgicas, como atención o motivación, ya que los grupos tratados con la toxina mostraron un consumo similar de sacarina durante la adquisición. De la misma manera, la TTX y el número de guías cánula utilizadas no afectó las propiedades sensoriales o discriminativas de los animales ante los estímulos gustativos, debido a que los grupos tratados con TTX durante la prueba mostraron una clara aversión al sabor. La TTX produce un bloqueo general de neurotransmisión por un período aproximado de 4 horas (Zhhuravin et al., 1991) por lo que, los efectos conductuales observados en este experimento pueden no sólo depender de las aferencias colinérgicas del NBM hacia la corteza. Está bien establecido que las principales aferencias del NBM son colinérgicas y GABAérgicas (Fisher et al., 1988; Freund et al., 1992; Jones et al., 1995). Recientemente, se ha postulado que tanto las aferencias basalocorticales colinérgicas como las GABAérgicas juegan un importante papel en la inducción de los cambios a largo plazo en la organización de la corteza somatosensorial primaria, que involucra, simultáneamente, una desinhibición de GABA y un incremento en la liberación de ACh (Dykes, 1997). Según estas investigaciones, la representación en la corteza somatosensorial parece mantener un equilibrio dinámico marcado por cambios relativamente rápidos de un estado de equilibrio a uno nuevo, estos cambios podrían requerir de un estado permisivo que prolonga la excitación a través de la desinhibición y liberación de ACh.

Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha demostrado que las lesiones bilaterales del NBM con excitotoxinas que evitan la adquisición del CAS y producen una reducción significativa de la actividad de ChAT y colinesterasa, no causaron ningún efecto sobre la actividad de la glutamato descarboxilasa o sobre la liberación de GABA en rebanadas de CI (López-García et al., 1993). Esto en concordancia con los datos que indican que agonistas GABAérgicos, como el muscimol, no afectan ninguna de las etapas del CAS (Naor et al., 1996).

A pesar de esto, es evidente que la vía basalocortical contiene una población no despreciable de aferencias GABAérgicas, reportes recientes indican que las proyecciones colinérgicas del CAB a la corteza componen el 30% de la población neuronal, siendo el

restante 30-35% neuronas corticotrópicas GABAérgicas, siendo desconocido el componente transmisor de los axones restantes que proyectan a la corteza (Jones et al., 1995). Con estos datos es evidente que la activación del CAB no sólo libera ACh, por lo que es necesario establecer experimentos que expliquen su función y su posible intervención en los efectos observados después de lesiones generalizadas del NBM.

La liberación cortical de ACh probablemente señala la novedad o relevancia del estímulo

Debido que la liberación de ACh observada en la corteza cuando el animal ingiere sabores familiares se incrementa significativamente cuando el sabor es novedoso, podríamos sugerir que las proyecciones colinérgicas del NBM a la CI participan en la codificación de la novedad del estímulo. Los datos obtenidos en los experimentos de habituación muestran que la liberación de ACh observada durante la presentación de un estímulo novedoso, disminuye después de varias presentaciones de este mismo estímulo, alcanzando los mismos niveles de liberación de ACh a los que produce un estímulo familiar como es el agua, indicando el papel de la ACh en el reconocimiento y codificación de la novedad en los estímulos. Paralelamente, la presentación repetida de un sabor ocasiona que este sea cada vez más difícil de condicionar aversivamente, dándose una atenuación del CAS, este fenómeno conocido como inhibición latente pudo ser revertido por la inyección de escopolamina en la CI (Naor et al., 1996).

La implicación del sistema colinérgico en la codificación de la novedad de estímulo gustativo, también ha sido reforzada por trabajos que han mostrado cambios a nivel celular por la presentación del sabor novedoso (Naor et al., 1996; Rosenblum et al., 1995). Estos trabajos reportaron, que después del entrenamiento del CAS, se observa en la CI, pero no en otras áreas corticales, un rápido y marcado incremento en la fosforilación de tirosinas de una serie de proteínas, incluyendo la subunidad NR2B del receptor NMDA, una proteína recientemente involucrada en la capacidad que mostraron ratones transgénicos para aprender mejor diferentes tareas (Tang et al., 1999). El aumento de la fosforilación de estas proteínas, producido por el sabor novedoso durante la adquisición del CAS y bloqueado por antagonistas muscarínicos, pudo ser remedado

por la micro-inyección de carbacol un agonista muscarínico (Rosenblum et al., 1996). Los autores sugieren que esta activación transitoria de la fosforilación de tirosinas específicamente regula mecanismos de plasticidad neuronal, desencadenando una cascada de eventos a través de los receptores NMDA. Por ejemplo, la potenciación a largo plazo (LTP), da lugar a una sostenida fosforilación tirosina de la subunidad NR2B en el giro dentado del hipocampo, y la inhibición de las tirosina cinasas así como los *knock-out* del gene impiden la inducción del LTP (O'dell et al., 1991; Grant et al., 1992).

La participación glutamatérgica podría entonces relacionarse con las etapas posteriores del reconocimiento del estímulo gustativo, así como intervenir en la etapa de consolidación, como lo demuestran los resultados obtenidos al bloquear el CAS con inyecciones de AP5 en la CI inmediatamente después de la presentación del sabor (Gutiérrez et al., 1999b).

La liberación de ACh cortical, por experimentos *in vivo*, en las fases tempranas del aprendizaje, también ha sido demostrada en la adquisición de tareas operantes. En estos experimentos se observó incrementos significativos de la liberación de ACh en la corteza parietal, sólo ocurrió cuando un aumento regular del total de palanqueos indicó que la rata empezó a asociar el palanqueo con la recompensa (Orsetti et al., 1996). Contrariamente, cuando los animales estaban bien entrenados en la tarea de palanqueo, no se observó ningún incremento en la liberación de ACh dentro de la corteza o el hipocampo, durante el desempeño operante. Esto indica, como en los resultados previamente descritos, que la liberación de ACh juega un papel durante las etapas tempranas del aprendizaje, así como en la señalización de estímulos relevantes, en este caso la palanca y el reforzador, pero no durante la fase de evocación de la conducta operante.

Regulación colinérgica de la plasticidad neuronal

El papel de CAB en la plasticidad inducida por aprendizaje ha sido descrito en recientes reportes por Kilgard y Merzenich (Kilgard et al., 1998), y Weinberger y su grupo (Metherate et al., 1990; Bakin et al., 1996). Estos últimos demostraron que la convergencia en la corteza auditiva de una información de frecuencia acústica y la

aplicación de ACh cortical o de estimulación eléctrica en el núcleo basalis, induce una plasticidad en los campos receptivos similar a la producida por conductas de aprendizaje; esta inducción plástica fue bloqueada por antagonistas muscarínicos. Adicionalmente, otros trabajos también han mostrado que la actividad colinérgica puede facilitar la formación de cambios a largo plazo, dependientes de experiencia, en las propiedades de respuesta de las neuronas sensoriales neocorticales, en una variedad de contextos (Butt et al., 1997; Bear et al., 1986; Baskerville et al., 1995). Estos resultados sugieren que el sistema colinérgico, como neuromodulador, puede facilitar la plasticidad cortical por medio de la señalización de la relevancia de un estímulo durante la formación de la memoria, y están de acuerdo con la hipótesis de que la ACh modula la eficacia general del procesamiento sensorial cortical o el procesamiento de información (Sarter et al., 1997).

En conclusión los resultados reportados en esta tesis sugieren que el incremento en la liberación de ACh cortical observado durante la adquisición del CAS en animales en libre movimiento, refleja la participación del CAB en la señalización o incremento de la codificación los estímulos relevantes o novedosos, durante etapas tempranas de la formación de la memoria.

Perspectivas



La participación del cerebro anterior basal en la modulación cortical de procesos involucrados en la formación de la memoria ha sido ampliamente descrita y ha llevado a establecer la hipótesis de que la actividad colinérgica cortical modula la eficiencia general del procesamiento cortical de la información sensorial o asociativa. Específicamente, las entradas colinérgicas corticales al parecer controlan las habilidades del sujeto para detectar o seleccionar el estímulo y las asociaciones, aún no queda claro cómo se realiza este control y su participación en funciones de atención y/o durante los procesos cognitivos de alto orden. A pesar de los resultados sugerentes obtenidos hasta la fecha, son necesarias futuras investigaciones que desarrollen y validen nuevos paradigmas que determinen la función colinérgica durante las tareas cognitivas que dependen del control y procesamiento atencional y/o asociativo.

Adicionalmente, poco se conoce acerca de los mecanismos que permiten a la corteza mejorar su selectividad en las representaciones neuronales de estímulos importantes, así como disminuir o ignorar los estímulos irrelevantes. Los sistemas de neuromodulación difusos podrían facilitar la plasticidad cortical actuando como señaladores que marquen un estímulo importante. Kilgard y colaboradores, (Kilgard et al., 1998) lograron abordar elegantemente esta interrogante y demostraron que la estimulación eléctrica episódica del NBM, parida con un estímulo auditivo, da como resultado una masiva reorganización de la corteza primaria auditiva de ratas adultas. El tamaño de los campos receptivos puede disminuir, aumentar o permanecer inalterado dependiendo de los parámetros acústicos pareados con la activación del núcleo basalis; esta plasticidad diferencial es similar a la remodelación de los campos receptivos resultante de diferentes tipo de entrenamiento conductual. Con estos resultados, los autores sugieren que el CAB juega un activo papel instructivo en la plasticidad representacional.

La hipótesis de la modulación colinérgica durante las etapas tempranas de la formación de la memoria, podría establecer que la capacidad de evocar una memoria permanentemente almacenada es mediada, simultáneamente, con nuevas memorias de forma diferencial. La activación colinérgica cortical e hipocampal podría mediar, activar o señalar las memorias en formación o las previamente almacenadas (Woolf, 1998; Hasselmo et al., 1992).

En una extensa revisión, Nancy Woolf presenta un modelo de reorganización dendrítica en células colinoceptivas del telencéfalo como base del almacenaje de memorias a largo plazo. Propone una secuencia molecular precisa para que se lleve a cabo la plasticidad dendrítica para la formación de memorias. En el modelo se plantea que los cambios se inician por la actividad neuronal y la consecuente la liberación de neurotrofinas, seguida por el incremento en la liberación de ACh, la respuesta muscarínica, el flujo de calcio, la degradación de proteínas asociadas a microtúbulos-2 (MAP2) y finalmente una nueva estructura dendrítica. Este modelo, sugiere hipotéticamente, que cada representación asociable consiste en segmentos dendríticos alterados de células colinoceptivas contenidas dentro de uno o varios módulos; la co-activación facilitada de estos módulos de dendritas por la ACh podría mediar la entrada y regulación de las memorias (Woolf, 1998).

Por último, una pregunta obvia pero aún no resuelta, es cómo las neuronas colinérgicas del CAB, y en particular las del NBM, están controladas por otras regiones cerebrales. Se ha sugerido que una de las entradas proviene de las neuronas colinérgicas del tallo cerebral, situadas en el núcleo tegmental y laterodorsal pedunculopontinos. La inervación del NBM por estas neuronas puede ser la responsable del incremento en la liberación de ACh durante la actividad cortical observada en gatos anestesiados (Kanai et al., 1965). Sin embargo, no sólo la ACh podría regular estas entradas; se han identificado otros neurotransmisores en las terminales sinápticas del NBM, como la serotonina, la noradrenalina y una gran variedad de neuropéptidos (Carlsen et al., 1985), así como el

glutamato, cuyos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en este núcleo y cuya administración basal aumenta la liberación cortical de ACh (Kurosawa et al., 1989). A pesar de los dispersos datos en la literatura sobre este aspecto, es necesario establecer nuevas investigaciones que aborden puntualmente los diferentes procesos y estructuras que permiten que el CAB, modular la actividad cortical y en consecuencia los procesos involucrados en la formación de nuevas memorias.

- cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **88**, 5379-5382.
- Boegman, R.J., Cockhill, J., Jhamandas, K., & Beninger, R.J. (1992). Excitotoxic of the rat basal forebrain: Differential effects on choline acetyltransferase in the cortex an amygdala. Neuroscience, **51**, 129-135.
- Braun, J.J., Lasiter, P.S., & Kiefer, S.W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. Physiological Psychology, **10**, 13-45.
- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). Conditioned taste aversion: Memory of a special kind. New York: Oxford University Press.
- Butcher, L.L., & Semba, K. (1989). Reassessing the cholinergic basal forebrain: nomenclature schemata and concepts. Trends Neurosci., **12**, 483-485.
- Butt, E.A., Testtyler, G., & Dykes, R.W. (1997). Acetylcholine release in rat frontal and somatosensory cortex is enhanced during tactile discrimination learning. Psychobiology, **25**, 18-33.
- Buzsaki, G., Bickford, R.G., Ponomareff, G., Thal, L.J., Mandel, R.J., & Gage, F.H. (1988). Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. J.Neuroscience, **8**, 4007-4026.
- Buzsaki, G., & Gage, F.H. (1989). The cholinergic nucleus basalis: a key structure in neocortical arousal. In M. Frotscher & U. Misgeld (Eds.), Central cholinergic synaptic transmission. (pp. 159-171). Boston: Birkhauser Verlag.
- Bymaster, F.P., Heath, I., Hendrix, J.C., & Shannon, H.E. (1993). Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rat. J.Pharmacol.Exp.Ther., **267**, 16-24.
- Carlsen, J., Zaborosky, L., & Heimer, L. (1985). Cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral amygdaloid complex: a combined retrograde fluorescent and immunohistochemical study. J.Comp.Neurol., **234**, 155-167.
- Cullinan, W.E., & Zaboroski, L. (1991). Organization of ascending hypothalamic projections to the rostral forebrain with special reference to the innervation of cholinergic projections neurons. J.Comp.Neurol., **306**, 631-667.
- Dawson, G.R., Heyes, C.M., & Iversen, S.D. (1992). Pharmacological mechanisms and animal models of cognition. Behav.Pharmacol., **3**, 285-297.
- Day, J., Damsma, G., & Fibiger, H.C. (1991). Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. Pharmacol.Biochem.Behav., **38**, 723-729.
- Dekker, A.J.A.M., Connor, D.J., & Thal, L.J. (1991). The role of cholinergic projections from the nucleus basalis in memory. Neurosci.Biobehav.Rev., **15**, 299-317.
- DeLong, M.R. (1971). Activity of pallidal neurons during movement. J.Neurophysiol., **34**, 414-427.
- Dinopoulos, A., Papadopoulos, G.C., Paravelas, J.G., Antonopoulos, J., & Karmanlidis, A.N. (1989). Basal forebrain projections to the lower brainstem in the rat. Exp.Neurol., **105**, 316-319.
- Dudai, Y. (1989). The neurobiology of memory. Oxford University Press.
- Dunn, L.T., & Everitt, B.J. (1988). Double dissociation of the effect of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in rat using the excitotoxin ibotenic acid. Behav. Neurosci., **102**, 3-23.

- Dunnett, S.B., Everitt, B.J., & Robbins, T.W. (1991). The basal forebrain cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. Trends Neurosci., 14, 494-501.
- Dunnett, S.B., & Fibiger, H.C. (1993). Role of forebrain cholinergic system in learning and memory; relevance to cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia. Progr. Brain Res., 98, 413-420.
- Dunnett, S.B., Whishaw, I.Q., Jones, G.H., & Bunch, S.T. (1987). Behavioral, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acid injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. Neuroscience, 20, 653-669.
- Dutar, P., Rascol, O., & Lamour, Y. (1989). Rhythmical bursting activity and GABAergic mechanisms in the medial septum of normal and pertussis toxin-pretreated rats. Experimental Brain Research, 77, 374-380.
- Dykes, R.W. (1997). Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex. Can. J. Physiol. Pharmacol., 75, 535-545.
- Escobar, M.L., Jiménez, N., López-García, J.C., Tapia, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1993). Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity. J. Neural. Transp. Plasty., 4, 167-172.
- Etherington, R.E., Nitterman, G.M., & Robbins, T.W. (1987). Comparative effects of nucleus basalis lesions and fimbria fornix lesions in delay matching and alteration in the rat. Neurosci. Res. Commun., 1, 134-143.
- Everitt, B.J., & Robbins, T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. Annu. Rev. Psychol., 48, 649-684.
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., Evenden, J.L., Marston, H.M., Jones, G.H., & Sirkia, T.E. (1987). The effects of excitotoxic lesions of the substantia innominata, ventral and dorsal globus pallidus on the acquisition and retention of a conditional visual discrimination; implication for cholinergic hypothesis of learning and memory. Neuroscience, 22, 47-52.
- Fernández-Ruiz, J., Escobar, M.L., Piña, A.L., Díaz-Cintra, S., Cintra-McGlone F.L., & Bermúdez-Rattoni, F. (1991). Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats. Behav. Neurol. Biol., 55, 179-193.
- Fibiger, H.C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. Trends Neurosci., 14, 220-223.
- Fisher, R.S., Buchwald, N.A., Hull, C.D., & Levine, M.S. (1988). GABAergic basal forebrain neurons project to neocortex: the localization of glutamic acid decarboxylase and choline acetyltransferase in feline corticopetal neurons. J. Comp. Neurol., 272, 489-502.
- Freund, T.F., & Gulyas, A.I. (1991). GABAergic interneurons containing calbindin D28k or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain cholinergic afferents in the rat neocortex. J. Comp. Neurol., 314, 187-199.
- Freund, T.F., & Meskenaite, V. (1992). Gamma-aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 738-742.
- Friedman, D.P., & Goldman-Rakic, P.S. (1988). Activation of the hippocampus and dentate gyrus by working memory: a 2-deoxyglucose study of behaving rhesus monkeys. J. Neuroscience, 8(4693), 4706
- García, J., Kimmeldorf, D.J., & Koelling, R.A. (1955). Conditioned taste aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. Science, 5, 121-122.

- Ghaem, O., Mellet, E., Crivello, F., Tzourio, N., Mazoyer, B., Berthoz, A., & Denis, M. (1997) Mental navigation along memorized routes activates the hippocampus, precuneus, and insula. Cogn. Neurosci. Neuropsychol. 8, 739-744.
- González, C.L.R., Miranda, M.I., Ormsby, C., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Differential participation of the NBM in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion and Morris water maze. Submitted.
- Grant, S.G., O'dell, T.J., Karl, K.A., & et al. (1992). Science, 258, 1903-1910.
- Gritti, I., Mainville, L., & Jones, B.E. (1994). Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. J.Comp.Neurol., 295, 251-268.
- Gutiérrez, H., Gutiérrez, R., Silva-Gandarias, R., Estrada, J., Miranda, M.I., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999a). Differential effects of 191IgG-saporin and NMD-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation. Brain Res.
- Gutiérrez, H., Hernández-Echeagaray, E., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999b). Blockade of N-Methy-D-Aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. Neuroscience, 89(3), 751-758.
- Gutiérrez, H., Miranda, M.I., & Bermúdez-Rattoni, F. (1997). Learning impairment and cholinergic deafferentation after cortical nerve growth factor deprivation. J.Neuroscience, 17(10), 3796-803.
- Hammond, E.J., Meador, K.J., Aunq-Din, R., & Wilder, B.J. (1987). Cholinergic modulation of human P3 event-related potentials. Neurology, 37, 346-350.
- Hars, B., Maho, C., Edeline, J.M., & Hennevin E. (1993). Basal forebrain stimulation facilitates tone-evoked responses in the auditory cortex of awake rat. Neuroscience, 56, 61-74.
- Harvey, A. (1993). Natural and synthetic neurotoxins. San Diego, CA: Academic Press.
- Hasselmo, M.E., Anderson, B.P., & Bower, J.M. (1992). Cholinergic modulation of cortical associative memory function. J.Neurophysiol., 67, 1230-1246.
- Heimer, L., & Alheid, G.F. (1991). Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. In T. C. Napier, P. W. Kalivas, & I. Hanin (Eds.), The basal forebrain: anatomy to function. (pp. 1-42). New York: Plenum Press.
- Inglis, F. M. Day, J. & Fibiger H. C. (1994). Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during anticipation and consumption of palatable meal. Neuroscience 62:1049-1056.
- Inglis F. M. & Fibiger H. C. (1995). Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. Neuroscience 66:81-86.
- Iversen, S.D. (1998). The pharmacology of memory. Life Sciences, 321, 209-215.
- Jiménez-Capdeville M. E. & Dykes R. W. (1993). Daily changes in the release of acetylcholine from rat primary somatosensory cortex. Brain Res 625:152-158.
- Jiménez-Capdeville M. E. & Dykes R. W. (1996). Changes in cortical acetylcholine release in the rat during day and night: differences between motor and sensory areas. Neuroscience 71:567-579.
- Jiménez-Capdeville M. E. ; Dykes R. W., & Myasnikov A. A. (1997). Differential control of cortical activity by the basal forebrain in rats: a role for both cholinergic and inhibitory influences. J.Comp.Neurol. 381:53-67,.

- Jones, B., & Mishkin M. (1972). Limbic lesions and the problem of stimulus-reinforcement association. Exp.Neurol., 36, 362-377.
- Jones, B.E. (1993). The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states. Progr.Brain Res., 98, 61-71.
- Jones, B.E., & Cuello, A.C. (1989). Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic-catecholamine, serotonin, and acetylcholine neurons. Neuroscience, 31, 37-61.
- Jones, B.F., Mainville, L., Mancía, M., & Gritti, I. (1995). GABAergic and another non-cholinergic basal forebrain neurons project to meso- and iso-cortical regions in the rat brain. Soc.Neurosci.Abstr., 21, 1617
- Kanai, T., & Szerb, J.C. (1965). Mesencephalic reticular activating system and cortical acetylcholine output. Nature, 205, 80-82.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., & Jessell, T.M. (1991). Principles of neural science. (Third edition ed.). New York, NY.: Elsevier.
- Kilgard, M.P., & Merzenich, M.M. (1998). Cortical map reorganization enables by nucleus basalis activity. Science, 279, 1714-1718.
- Kivosawa, M., Baron, J.C., Hamel, E., & et al. (1989). Time course of effects of unilateral lesions of the nucleus basalis of Meynert on glucose utilization by the cerebral cortex. Brain, 112, 435-455.
- Kohler, C., & Swanson, L.W. (1984). Acetylcholine esterase-containing cells in the lateral hypothalamic area are immunoreactive for alpha melanocyte stimulating hormone and have cortical projections in the rat. Neurosci Lett., 49, 39-43.
- Kurosawa, M., Sato, A., & Sato, Y. (1989). Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases acetylcholine release in the cerebral cortex in rats. Neurosci.Lett., 98, 45-50.
- Lamberty, Y., & Gower, A.J. (1991). Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water-maze. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 305, 5-19.
- Lamour, Y., Dutar, P., & Jobert, A. (1984). Septohippocampal and other medial septal-diagonal band neurons: Electrophysiological and pharmacological properties. Brain Res., 309, 227-239.
- Levin, E.D., Castonguay, M., & Ellison, G.D. (1987). Effects of nicotinic receptor blocker, mecamylamine, on radial-arm maze performance in rats. Behav.Neurol.Biol., 48, 206-212.
- Levin, E.D., Lee, C., Rose, J.E., Reyes, A., & Ellison, G.D. (1990). Chronic nicotine and withdrawal effects on radial-arm maze performance in rats. Behav.Neurol.Biol., 53, 269-276.
- López-García, J.C., Fernández-Ruíz, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1990). Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. Brain Res., 523, 105-110.
- López-García, J.C., Fernández-Ruíz, J., Escobar, M.L., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1993). Effects of excitotoxic lesions of the Nucleus Basalis Magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. Pharmacol.Biochem.Behav., 45, 147-152.
- Ma, W., Höhmann, C.F., Coyle, J.T., & Juliano, S.L. (1989). Lesion of the basal forebrain alter stimulus evoked metabolic activity in mouse somatosensory cortex. J.Comp.Neurol., 288, 414-427.
- Mandel, R.J., Gage, F.H., & Thal, L.J. (1989a). Enhanced detection of nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial learning deficit in rats by modification of training regimen. Behavioral Brain Research, 31, 221-229.

- Mandel, R.J., Gage, F.H., & Thal, L.J. (1989b). Spatial learning in rats: correlation with cortical choline acetyltransferase and improvement with NGF following NBM damage. Experimental Neurology, 104, 208-217.
- McCormick, D.A. (1989). Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. Trends in Neurosci., 12, 215-221.
- McCormick, D.A., & Thompson, R.F. (1984). Cerebellum: essential involvement in the classically conditioned eyelid response. Science, 223, 296-299.
- McKenna, T.M., Ashe, J.H., Hui, G.K., & Weinberger, N.M. (1988). Muscarinic agonist modulate spontaneous and evoked unit discharge in auditory cortex of cat. Synapse, 2, 54-68.
- Melander, T., Staines, W.A., Hokfelt, T., & et al. (1985). Galanin-like immunoreactivity in cholinergic neurons of the septum-basal forebrain complex projecting in the hippocampus of the rat. Brain Res., 360, 130-138.
- Mesulam, M.M. (1995). The cholinergic contribution to neuromodulation in the cerebral cortex. The Neurosciences, 7, 297-307.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levy, A.I., & Wainer, B.H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nucleus, basalis (substantia innominata) and hypothalamus in the rhesus monkey. J.Comp.Neurol., 214, 170-197.
- Metherate, R., & Ashe, J.H. (1993). Nucleus basalis stimulation facilitates thalamocortical synaptic transmission in the rat auditory cortex. Synapse, 14, 132-143.
- Metherate, R., & Weinberger, N.M. (1990). Cholinergic modulation of responses to single tones produces tone specific receptive field in cat auditory cortex. Synapse, 6, 133-145.
- Miranda, M.I., & Bermúdez-Rattoni, F. (1997). Recovery of taste aversion learning induced by fetal neocortex grafts: correlation with *in vivo* extracellular acetylcholine. Brain Res., 759, 141-148.
- Miranda, M.I., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96, 6478-6482.
- Muir, J.L., Everitt, B.J., & Robbins, T.W. (1994). AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role of the cortical cholinergic system in attentional function. J.Neuroscience, 14, 2313-2326.
- Nagai, T., Kimura, H., Maeda, T., McGeer, P.L., Peng, F., & McGeer, E.G. (1982). Cholinergic projections from the basal forebrain of rat to the amygdala. Brain Res.Bull., 2, 513-520.
- Naor, C., & Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. Behavioral Brain Research, 79, -61
- Norgen, R. (1984). Central neural mechanisms of taste. In I. Darian-Smith (Ed.), Handbook of physiology, the nervous system, sensory processes III. (pp. 1087-1128). Bethesda, MD: American Physiological Society.
- O'dell, T.J., Kandel, E.R., & Grant, S.G. (1991). Nature, 353, 558-560.
- Ohno, M., Yamamoto, T., & Watanabe, S. (1994). Blockade of hippocampal M1 muscarinic receptors impairs working memory performance of rats. Brain Res., 650, 260-266.
- Olds, J., Disterhoft, J.F., Segal, M., Kornblith, C.L., & Hirsh, R. (1972). Learning centers of rat brain

- mapped by measuring latencies of conditioned unit responses. *J.Neurophysiol.*, **35**, 202-219.
- Oliverio, A. (1966). Effects of mecamylamine on avoidance conditioning and maze learning of mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **154**, 350-356.
- Orsetti, M., Casamenti, F., & Pepeu, G. (1996). Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res.*, **724**, 89-96.
- Page, K.J., Everitt, B.J., Robbins, T.W., Martson, H.M., & Wilkinson, L.S. (1991). Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA and ibotenic acid induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss. *Neuroscience*, **43**, 457-472.
- Pang, K., Williams, M.J., Egeth, H., & Olton, D.S. (1993). Nucleus Basalis Magnocellularis and attention: Effects of muscimol infusions. *Behavioral Neurosciences*, **107**(6), 1031-1038.
- Pascoe, J.P., & Kapp, B.S. (1987). Responses of amygdaloid central nucleus neurons to stimulation of the insular cortex in awake rabbits, *Neuroscience*, **21**, 471-485.
- Pirch J. H., Turco K., and Rucker H. K. (1992) A role of acetylcholine in conditioning-related responses of a rat frontal cortex neurons: microiontophoretic evidence. *Brain Res.* **586**:19-26.
- Rasmusson, D. D. Clow, K. & Szerb J. C. (1992). Frequency-dependent increase in cortical acetylcholine release evoked by stimulation of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Brain Res.* **594**:150-154.
- Rasmusson, D.D., Clow, K., & Szerb, J.C. (1994). Modification of neocortical acetylcholine release and electroencephalogram desynchronizaton due to brainstem stimulation by drugs applied to basal forebrain. *Neuroscience*, **60**, 665-677.
- Rasmusson, D.D., & Dykes, R.W. (1988). Long-term enhancement of evoked potentials in cat somatosensory cortex produced by co-activation of the basal forebrain and cutaneous receptors. *Exp.Brain Res.*, **70**, 276-286.
- Richardson R.T. & DeLong. M. R.(1986). Nucleus basalis of Meynert neuronal activity during a delayed response task in the monkey. *Brain Res* **399**:364-368.
- Rigdon G. C. and Pirch J. H. (1986). Nucleus basalis involvement in conditioned neuronal responses in rat frontal cortex. *J.Neuroscience* **6**:2535-2542,.
- Roberts, A.C., Robbins, T.W., Everitt, B.J., & Muir, J.L. (1992). A specific form of cognitive rigidity following excitotoxic lesions of the basal forebrain in marmosets. *Neuroscience*, **47**, 251-264.
- Rose, S.P.R. (1995). Memory for taste aversion: molecular and cellular mechanisms. In K. Kurihara, N. Susuki, & H. Ogawa (Eds.), *Olfaction and Taste*. (pp. 462-466). Tokyo: Springer Verlag.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hasvi, S., & Dudai, Y. (1996). Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *NeuroReport*, **7**, 1401-1404.
- Rosenblum, K., Meiri, N., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav.Neurol.Biol.*, **59**, 49-56.
- Rosenblum, K., Schul, R., Meiri, N., Hadari, Y.R., Zick, Y., & Dudai, Y. (1995). Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**, 1157-1161.
- Rye, D.B., Wainer, B.H., Mesulam, M.M., Mufson, E.J., & Saper, C.B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined

- retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline-acetyltransferase. Neuroscience, **13**, 627-643.
- Sahakian, B.J., & Coull, J.T. (1994). Nicotine and tetrahydroaminoacridine: evidence for improved attention in patients with dementia of the Alzheimer type. Drug.Dev.Res., **31**, 80-88.
- Saper, C.B. (1984). Organization of cerebral cortical afferents systems in the rat: I. Magnocellular basal nucleus. J.Comp.Neurol., **222**, 313-342.
- Sarter, M., Schneider, H.H., & Stephens, D.N. (1988). Treatment strategies for senile dementia: antagonist beta-carbolines. Trends Neurosci., **11**, 13-17.
- Sarter, M., & Bruno, J.P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. Brain Res.Rev., **23**, 28-46.
- Sato, A., Hata, V., Masui, H., & Tsumoto, T. (1987). A functional role of cholinergic innervation to neurons in the cat visual cortex. J.Neurophysiol., **58**, 765-780.
- Sato, H., Hata, V., Hagihara, K., & Tsumoto, T. (1997). Effects of cholinergic depletion on neuron activities in the cat visual cortex. J.Neurophysiol., **58**, 781-794.
- Semba, K., Reiner, P.B., McGeer, E.G., & Fibiger, H.C. (1988). Brainstem afferents to the magnocellular basal forebrain studied by axonal transport, immunohistochemistry, and electrophysiology in the rat. J.Comp.Neurol., **267**, 433-453.
- Semba, K. (1991). The cholinergic basal forebrain: a critical role in cortical arousal. In T. C. Napier, P. W. Kalivas, & I. Hanin (Eds.), The basal forebrain: anatomy to function. (pp. 197-218). New York: P.
- Semba, K., Reiner, P.B., McGeer, E.G., & Fibiger, H.C. (1989). Brainstem projecting neurons in the rat basal forebrain: neurochemical topographical and physiological distinctions from cortically projecting cholinergic neurons. Brain Res.Bull., **22**, 501-509.
- Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M., & Kemeyama, M. (1985). Biochemical characterization of the nicotinic cholinergic receptors in human brain: binding of (-)-(3H)nicotine. J.Neurochem., **445**, 604-610.
- Shimura, T., & Yamamoto, T. (1995). Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. Brain Res., **679**, 221-226.
- Singh, B., & Schweitzer, J.B. (1995). Loss of p75 nerve growth factor receptor mRNA containing neurons in rat forebrain after intraventricular IgG 192-saporin administration. Neuroscience Letters, **194**, 117-120.
- Stewart, D.J., Macfabe, D.F., & Vanderwolf, C.H. (1984). Cholinergic activation of the electrocorticogram: role of the substantia innominata and effects of atropine and quinuclidinyl benzilate. Brain Res. (322), 219-232.
- Swanson, L.W., Mogenson, G.J., Gerfen, C.R., & Robinson, P. (1984). Evidence for a projection from lateral preoptic area and substantia innominata to the 'mesencephalic locomotor region' in the rat. Brain Res., **295**, 161-178.
- Szymusiak, R. (1995). Magnocellular Nuclei of the basal forebrain: Substrates of sleep and arousal regulation. Sleep, **18**(6), 478-500.
- Szymusiak, R., & McGinty, D. (1989). Sleep-waking discharge of basal forebrain projection neurons in cats. Brain Res.Bull., **22**, 423-430.
- Szymusiak, R., & McGinty, D. (1990). State-dependent neurophysiology of the basal forebrain: relationship

- to sleep, arousal, and thermoregulatory function. In M. Mancina & G. Marini (Eds.), The diencephalon and sleep. (pp. 11-123). New York: Raven Press.
- Tang, Y., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., & Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory. Nature, 401, 63-69.
- Terry, A.V.Jr., Buccafusco, J.J., & Jackson, W.J. (1993). Scopolamine reversal of nicotine enhanced delayed matching-to-sample performance in monkeys. Pharmacol.Biochem.Behav., 45, 925-929.
- Torres, E.M., Perry, T.A., Blokland, A., Wilkinson, L.S., & Wiley, R.G. (1994). Behavioral, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. Neuroscience, 63, 95-122.
- Tremblay, N., Warren, R.A., & Dykes, R.W. (1990). Electrophysiological studies of acetylcholine and the role of the basal forebrain in the somatosensory cortex of the cat II. Cortical neurons excited by somatic stimuli. J.Neurophysiol., 64, 1212-1222.
- Vertes, R.P. (1988). Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. Neuroscience, 24, 907-935.
- Vincent, S.R., McIntosh, C.H.S., Buchan, A.M.J., & Brown, J.C. (1985). Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. J.Comp.Neurol., 238, 169-186.
- Voytko, M.L., Olton, D.S., Richardson, R.T., Gorman, L.K., Tobin, J.R., & Price, D.L. (1994). Basal forebrain lesions in monkeys disrupts attention but not learning and memory. J.Neuroscience, 14, 167-186.
- Wainer, B.H., Levy, A.I., Rye, D.B., Mesulam, M.M., & Mufson, E.J. (1985). Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. Neurosci Lett., 54, 45-52.
- Waite, J.J., & Thal, L.J. (1996). Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain; excitotoxic vs. an immunotoxin. Life Sciences, 58(1947), 1953
- Webster, H.H., Rasmusson, D.D., & Dykes, R.W. (1991). Long-term enhancement of the evoked potentials in raccoon somatosensory cortex following co-activation of the nucleus basalis of Meynert complex and cutaneous receptors. Brain Res, 545, 292-296.
- Weinberger, N.M., & Bakin, J.S. (1998). Learning-induced physiological memory in adult primary auditory cortex: Receptive field plasticity, model and mechanisms. Audiol.Neurootol., 3, 145-167.
- Wiley, R.G., Oeltman, T.N., & Lappi, D.A. (1991). Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. Brain Research, 562, 149-153. Brain Res., 562, 149-153.
- Wilson, F.A.W., & Rolls, E.T. (1990a). Neuronal responses related to novelty and familiarity of visual stimulus in the substantia innominata, diagonal band of Broca and paraventricular region of the primate basal forebrain. Experimental Brain Research, 80, 104-120.
- Wilson F. A. W. and Rolls E. T. (1990b). Learning and memory is reflected in the responses of reinforcement-related neurons in the primate basal forebrain. J.Neuroscience 10:1254-1267.
- Wolf, N.J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. Prog.Neurobiol., 37, 475-524.
- Wolf, N.J. (1998). A structural basis for memory storage in mammals. Prog.Neurobiol., 55, 59-77.
- Wolf, N.J., Eckenstein, F., & Butcher, L.L. (1983). Cholinergic projections from the basal forebrain to the frontal cortex: a combined fluorescent tracer and immunohistochemical analysis in the rat. Neurosci Lett., 40, 93-98.

- Woolf, N.J., Eckenstein, F., & Butcher, L.L. (1984). Cholinergic system in the rat brain: I. Projections to the limbic telencephalon. Brain Res.Bull. **13**, 751-784.
- Woolf, N.J., Hernit, M.C., & Butcher, L.L. (1986). Cholinergic and non-cholinergic projections from the rat basal forebrain revealed by combined choline acetyltransferase and phaseolus vulgaris leucoagglutinin immunohistochemistry. Neurosci.Lett. **66**, 281-286.
- Yamamoto, T. (1993). Neuronal mechanisms of taste aversion learning. Neuroscience Research. **16**, 181-185.
- Yamamuro, Y., Hori, K., Tanaka, Y., Ywano, H., & Nomura, M. (1995). Septo-hippocampal cholinergic system under the discrimination learning task in the rat: a microdialysis study with the dual-probe approach. Brain Res. **684**, 1-7.
- Yeomans, J.S., Kofman, O., & McFarlane, V. (1984). Cholinergic involvement in lateral hypothalamic rewarding brain stimulation. Brain Res. **329**, 19-26.
- Yoshimura, H., & Ueki, S. (1977). Biochemical correlates in mouse-killing behavior of the rat: prolonged isolation and brain cholinergic function. Pharmacol.Biochem.Behav. **6**, 193-196.
- Zaborozski, L., Carlsen, J., Brashear, H.R., & Heimer, L. (1986). Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in rat with special emphasis on the projections neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. J.Comp.Neurol. **243**, 488-509.
- Zaborozski, L., Cullinan, W.E., & Braun, A. (1991). Afferents to basal forebrain cholinergic projection neurons: an update. In T. C. Napier, P. W. Kalivas, & I. Hanin (Eds.), The basal forebrain: anatomy to function. (pp. 43-100). New York: Plenum Press.
- Zahm, D.S., & Heimer, L. (1988). Ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. I Neuronal compartmentation as reflected by the distribution of neurotensin and substance P immunoreactivity. J.Comp.Neurol. **272**, 516-535.
- Zhuravin, I.A., & Bures, J. (1991). Experimental Brain Research. **83**, 687-690.
- Zola-Morgan, S., & Squire, R.L. (1986). Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. Behav Neurosci. **100**, 155-160.
- Zola-Morgan, S., Squire, R.L., & Mishkin M. (1982). The neuroanatomy of amnesia: amygdala-hippocampus versus temporal stem. Science. **218**, 1337-1339.

ESTA
SALIR
LIBRERIA