

Eliminación del trazo gustativo tras la administración de MK-801

Traverso L.M., Camino, G., Ruiz, G., y De la Casa*, L.G.

Universidad de Sevilla (España)

La administración sistémica de antagonistas de NMDA produce una interrupción de la Aversión Condicionada al Sabor cuando el fármaco se inyecta antes de la presentación de los estímulos. Sin embargo, existen en la literatura muy pocos experimentos que analicen la relación entre el aprendizaje de aversión al sabor y la actividad de los receptores NMDA cuando los compuestos farmacológicos se inyectan por vía sistémica entre el Estímulo Condicionado (EC) y el Estímulo Incondicionado (EI), siendo además en estos casos los resultados más contradictorios. En este trabajo presentamos dos experimentos destinados a analizar si la administración de MK-801 (*dizolcipina maleate*) entre el EC y el EI produce una interrupción de la Aversión Condicionada al Sabor (Experimento 1), y si la introducción de una demora temporal entre el EC y la administración del MK-801 anula el efecto disruptivo de la droga sobre la aversión al sabor (Experimento 2). Los resultados revelan que el MK-801 produce la interrupción de la ACS cuando se inyecta entre el EC y el EI y que el efecto desaparece cuando se introduce un intervalo temporal entre la administración del fármaco y el EI. Estos resultados apuntan al importante papel que los receptores NMDA desempeñan en la codificación y consolidación del trazo de memoria para el sabor.

El fenómeno de la Aversión Condicionada al Sabor (ACS) constituye un procedimiento de condicionamiento clásico que ha sido ampliamente utilizado para el estudio de procesos de aprendizaje y de memoria, tanto a un nivel netamente psicológico, como a un nivel psicobiológico (Bermúdez-Rattoni, 2004; Garcia, 1989; Garcia, 1990; Garcia, Brett y Rusiniak, 1989; Garcia, Lasiter, Bermúdez-Rattoni y Deems, 1985; Garcia, Rusiniak, Kiefer y Bermúdez-Rattoni, 1982). La ACS se caracteriza por presentar cualidades diferenciales respecto a otros tipos de procedimientos de condicionamiento

* Agradecimientos: Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2009-07536) y de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (P07-SEJ-02618). La correspondencia referida a este artículo debe dirigirse a L. Gonzalo de la Casa, Dpto. de Psicología Experimental, C/ Camilo José Cela, s/n. 41018 Sevilla. E-mail: delacasa@us.es

clásico. Así, cuando se condiciona aversivamente un sabor es posible establecer una demora prolongada entre el Estímulo Condicionado (EC) y el Estímulo Incondicionado (EI) (García, Ervin y Koelling, 1966; Bures, 1998). A su vez, el sabor tiende a asociarse más efectivamente con compuestos tóxicos como el cloruro de litio (LiCl), que produce efectos a nivel interoceptivo y propioceptivo, frente a estímulos de naturaleza exteroceptiva como, por ejemplo, las descargas eléctricas (Domjan, 1983; García y Koelling, 1966). Por último, es posible establecer un sólido condicionamiento aún cuando el sabor y el malestar se emparejen en un solo ensayo (Seligman, 1970).

Desde una perspectiva psicofisiológica, varios estudios han establecido una relación entre los procesos psicológicos responsables de la ACS y la actividad de los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (p.ej. Escobar, Alcocer y Bermúdez-Rattoni, 2002; Gutiérrez, Hernández-Echeagaray, Ramírez-Amaya y Bermúdez-Rattoni, 1999). De acuerdo a la propuesta realizada por Bermúdez-Rattoni y su grupo, existen dos tipos de memoria encargadas de registrar y almacenar la relación entre un sabor y sus consecuencias. Así, si la ingesta de un sabor novedoso no va seguida de consecuencias pasará a ser etiquetado como familiar y seguro. Por el contrario, si el consumo va seguido por algún tipo de malestar interno, el sabor será etiquetado como familiar y aversivo. Ambos trazos de memoria son mutuamente excluyentes, existiendo un marco temporal crítico (de aproximadamente dos horas) que determina el tipo de asociación que se va a establecer (segura o aversiva) en función de las consecuencias que tenga la asimilación del sabor (ver, para una revisión, Bermúdez-Rattoni, 2004). Los receptores NMDA, junto con los receptores muscarínicos, parecen ser claves en el establecimiento de la memoria aversiva (Ferreira, Gutiérrez, De la Cruz y Bermúdez-Rattoni, 2002). Sin embargo, mientras que los receptores muscarínicos parecen modular la habituación a la neofobia (proceso mediante el cual un sabor novedoso llega a ser familiar y seguro), los receptores NMDA parecen no tener una implicación directa en este tipo de memoria (Gutiérrez, Téllez y Bermúdez-Rattoni, 2003). No obstante, esta cuestión no está cerrada, ya que otros autores han propuesto que la habituación a la neofobia es un fenómeno que depende de la actividad de los receptores NMDA (Figuroa-Guzmán y Reilly, 2008; Figuroa-Guzmán, Kuo y Reilly, 2006).

En conjunto, los datos disponibles en la literatura parecen apuntar a un papel clave de los receptores NMDA en la formación y consolidación de un nuevo trazo de memoria para el sabor, sea este aversivo o seguro. Más específicamente, algunos autores han propuesto que la principal función de los receptores NMDA es la codificación de la información durante la

adquisición del aprendizaje (ver, por ejemplo, Riedel, Platt y Micheau, 2003). De esta forma, los receptores NMDA parecen desempeñar un papel importante en la formación inicial del trazo gustativo, ya que la administración sistémica de compuestos antagonistas de NMDA como, por ejemplo, la ketamina o el MK-801 antes de la presentación de los estímulos, impide el desarrollo del condicionamiento de aversión al sabor (p.ej. Aguado, San Antonio, Pérez, Del Valle y Gómez, 1994; Walker y Scully, 1996; Welzl, Alessandri, y Bättig, 1990). Asimismo, la administración de microinyecciones de AP5 en la corteza insular o en la amígdala basolateral antes de la presentación del sabor impide la habituación a la neofobia, así como la ACS (Escobar et al., 2002; Ferreira et al., 2002; Figueroa-Guzmán y Reilly, 2008; Figueroa-Guzmán et al., 2006; Gutiérrez et al., 2003). Los resultados experimentales son más contradictorios cuando los fármacos se inoculan entre el EC y el EI, o una vez que ha tenido lugar el emparejamiento entre el EC y el EI. Por ejemplo, Welzl et al., (1990) encontraron que la ketamina, administrada entre el sabor y el LiCl, no tiene efecto sobre la ACS, aunque en otros trabajos un incremento en la dosis de ketamina sí ha afectado a la asociación EC-EI (Traverso, Ruiz, Camino y De la Casa, 2008). Si la administración del antagonista AP5 se produce en la corteza insular durante el intervalo sabor-LiCl, algunos autores no encuentran efecto sobre la ACS (Ferreira et al., 2002), mientras que otros han demostrado una interferencia sobre el aprendizaje (Rosenblum, Berman, Hazvi, Lamprecht y Dudai, 1997), resultado que también se obtiene cuando la droga es inoculada en la amígdala basolateral (Yasoshima, Morimoto y Yamamoto, 2000). Cuando la administración de AP5 tiene lugar inmediatamente después del compuesto EC-EI se ha encontrado una interrupción de la ACS a corto y a largo plazo con administración intracraneal (Ferreira et al., 2002), aunque en otros trabajos no se ha encontrado ningún efecto sobre el condicionamiento con la administración sistémica de MK-801 (Traverso, Ruiz y De la Casa, 2003). Las discrepancias en los resultados de los estudios que hemos descrito pueden deberse a diferencias en las vías de administración de los fármacos, a las dosis empleadas, a diferencias en los protocolos experimentales, etc.

El objetivo fundamental de la presente investigación fue analizar la implicación de los receptores NMDA en la formación del trazo de memoria para el sabor. Con este fin se administraron diferentes concentraciones de MK-801 después de la presentación de sacarosa (EC) y antes del LiCl (EI) en una preparación de ACS (Experimento 1). En base a la evidencia previa, esperábamos que el MK-801 impidiera el establecimiento del trazo de memoria del sabor y que, por tanto, la ACS no se estableciera. Además, este resultado podría resultar dependiente de la dosis administrada. Por otra

parte, en el Experimento 2 analizamos si los receptores NMDA se limitan a modular la formación de un trazo de memoria para el sabor, o si su influencia se extiende al establecimiento de la asociación EC-EI y al procesamiento de las propiedades aversivas del LiCl. Para verificar esta posibilidad, el MK-801 o una dosis equivalente de solución salina se inyectaron inmediatamente después, 20 minutos después o 40 minutos después del EC.

EXPERIMENTO 1

Si los receptores NMDA modulan el procesamiento del EC, o la formación del trazo gustativo en la memoria, podríamos esperar que la administración de MK-801 en el intervalo que media entre la presentación del EC y del EI interfiera en el establecimiento de la ACS (por ej, Traverso et al., 2008). Para contrastar esta hipótesis con los parámetros específicos que empleamos en nuestro laboratorio llevamos a cabo un diseño típico de ACS en el que los animales tenían acceso al sabor (sacarosa) diluido en agua para, posteriormente, recibir la administración intraperitoneal del MK-801 o un volumen equivalente de solución salina, seguida en último término por una inyección de LiCl. Empleamos tres dosis diferentes de MK-801 (0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg ó 0.2 mg/kg), con objeto de identificar si la interferencia sobre el condicionamiento de la droga era dependiente de la dosis administrada. En base a estos parámetros en este experimento empleamos cuatro grupos: SAL, MK/0.05, MK/0.1 y MK/0.2 cuyo tratamiento aparece detallado en la Tabla 1.

Este experimento nos permitirá analizar el efecto del bloqueo de los receptores NMDA sobre la ACS sin que los efectos analgésicos o anestésicos de fármacos utilizados en experimentos previos como la ketamina tengan ninguna incidencia.

MÉTODO

Sujetos. Se utilizaron 32 ratas *Wistar* macho, experimentalmente ingenuas. El peso medio de los animales era de 313 grs. (rango de 247-370 grs.) al inicio del experimento. Los animales se alojaron individualmente en cajas de plexiglás transparente (43 x 25 x 15 cm). El ciclo luz/oscuridad oscilaba en intervalos de 12 hrs. Los animales fueron sometidos a un programa de privación de líquido (30 min. de acceso diario al agua) siete días antes del inicio de los tratamientos experimentales.

Tabla 1: Resumen del diseño del Experimento 1. SAL: Solución salina; MK: MK-801; Sac: Sacarosa; LiCl: Cloruro de Litio.

Grupo	Condicionamiento	Prueba
SAL	Sac- SAL - LiCl	Sac
MK/0.05	Sac- MK (0.05 mg/kg) - LiCl	Sac
MK/0.1	Sac- MK (0.1 mg/kg) - LiCl	Sac
MK/0.2	Sac- MK (0.2 mg/kg) - LiCl	Sac

Aparatos. Las sesiones experimentales se desarrollaron en una sala experimental diferente al estabulario. Cada animal se trasladaba de su jaula hogar a una caja de plexiglás transparente (30 x 18 x 18 cm) durante el desarrollo de las sesiones. El EC, sacarosa disuelta en agua (0.5%), se presentaba en botellas de plástico graduadas (150 ml de capacidad), con boquillas de acero inoxidable y sistema antigoteo. Las botellas se acoplaban a una abertura frontal de la caja, a través de la cual los animales podían acceder al fluido. La cantidad de líquido ingerido se calculaba a partir de la diferencia entre el peso de la botella antes y después de cada ensayo. Tanto el MK-801 (0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg o 0.2 mg/kg, en función del grupo) como el LiCl (0.4 Molar, 190 mg/kg), y la solución salina se administraban por vía intraperitoneal.

Procedimiento.

Línea Base. Durante los tres últimos días de la fase de privación se medía la cantidad de agua que consumían los animales en sus cajas hogar durante un período de 30 min. Los sujetos en los diferentes grupos experimentales (n=8) se distribuyeron en base a este consumo para reducir la variabilidad entre grupos.

Condicionamiento. El día siguiente los animales se trasladaban desde la colonia a la sala experimental y se introducían individualmente en las cajas experimentales. Posteriormente se les permitía el acceso a la solución de sacarosa durante 10 min. para, inmediatamente después, administrar la dosis correspondiente de MK-801 (0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg o 0.2 mg/kg) o de solución salina, según correspondiese (ver Tabla 1). Por último todos los sujetos recibían la inyección de LiCl ajustada a su peso corporal. Una vez concluido el ensayo de condicionamiento se permitió a los animales acceso libre a agua durante 20 min. para completar los 30 min de acceso a líquido diarios. El condicionamiento tuvo lugar en un solo ensayo.

Prueba. El día siguiente al condicionamiento se llevaba a cabo la prueba. Para ello los animales se trasladaban a las cajas experimentales y se les permitía el acceso a la botella con la disolución de sacarosa durante 10 min. El consumo en este ensayo se empleó como indicio del nivel de condicionamiento alcanzado (Respuesta Condicionada o RC). En este ensayo los animales no recibían ningún tipo de droga ni sustancia tóxica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 representa el consumo medio de sacarosa durante el día del condicionamiento (antes de la administración del EI) y el día de la prueba, en función de las diferentes dosis de MK-801. Como se puede observar en la figura, apareció un claro efecto de ACS en todos los grupos en el ensayo de prueba, al reducirse la ingesta de sacarosa. Sin embargo, la reducción fue de máxima intensidad en el grupo SAL y en el grupo MK/0.05. El nivel de condicionamiento fue ligeramente menor en el grupo MK/0.1, mientras que se observó una clara interferencia sobre la ACS en el grupo MK/0.2.

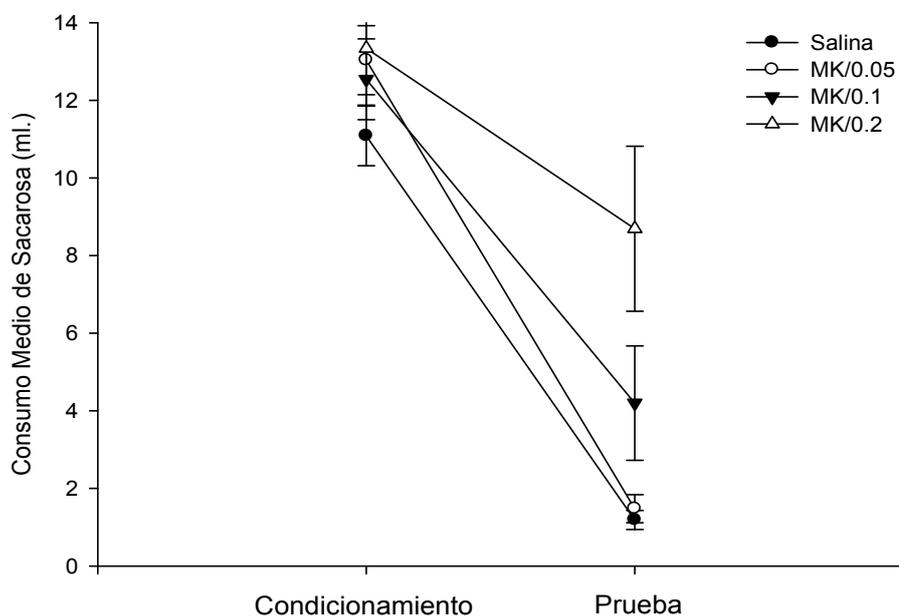


Figura 1. Consumo medio de sacarosa (ml.) correspondiente a los ensayos de condicionamiento y prueba en función de la droga inyectada (solución salina o dosis de 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg ó 0.2 mg/kg de MK-801).

Estas impresiones se vieron confirmadas por un ANVAR mixto 2 x 4 (Ensayos x Grupos, siendo el primero de los factores intra sujeto) realizado sobre el consumo medio de sacarosa. El análisis reveló un efecto significativo de los factores Ensayos, $F(1,28)=92.31$; $p<0.001$, debido a la reducción general del consumo el día de la prueba, y Grupos, $F(1,28)=6.91$; $p<0.01$, debido al decremento global en el consumo a medida que la intensidad de la dosis de MK-801 inyectada aumentaba. La interacción Ensayos x Grupos resultó marginalmente significativa, $F(3,28)=2.71$; $p=0.06$. Para explorar esta interacción, llevamos a cabo comparaciones *a priori* entre los grupos (*t* de Student, $p<0.05$) basadas en nuestras hipótesis sobre el consumo medio correspondiente al día del condicionamiento y al de la prueba. Mientras que el día del condicionamiento no se produjeron diferencias entre los grupos, los análisis para el ensayo de prueba revelaron que el consumo en el grupo MK/0.2 fue significativamente mayor que el de los grupos SAL, MK/0.05 y MK/0.1. Ninguna otra comparación de interés fue significativa.

Estos resultados revelan que una dosis de 0.2 mg/kg es efectiva para producir una interrupción de la ACS cuando se administra inmediatamente después del EC e inmediatamente antes del EI. Este efecto replica resultados previos cuando la inyección tiene lugar antes de los tratamientos (Walker y Scully, 1996) y es coherente con los estudios previos que no habían encontrado dicha interrupción cuando la dosis empleada es de 0.05 mg/kg (Robinson, Crooks, Shinkman y Gallagher, 1989). En base a estos resultados podemos confirmar que la administración de MK-801 (0.2 mg/kg) dificultaría la formación del trazo de memoria gustativo, o memoria gustativa a corto plazo, lo que impediría el establecimiento de la asociación con el EI (ver Welzl et al., 1990 y Traverso et al., 2008, para conclusiones similares con ketamina).

EXPERIMENTO 2

El Experimento 1 demostró que los receptores NMDA desempeñan un papel clave en el procesamiento de los estímulos gustativos. No obstante, ya que en el primer experimento la administración del fármaco se produjo inmediatamente antes del EI, es posible que se pueda haber producido algún tipo de interferencia del MK-801 sobre el efecto del LiCl, lo que podría haber dado lugar a la reducción de la intensidad del condicionamiento. Para excluir esta posibilidad llevamos a cabo un segundo experimento en el que desarrollamos un diseño factorial 3 x 2 (Demora: 0 vs. 20 vs. 40 min x Droga: Salino vs. MK-801). Los animales en cada grupo recibieron el MK-801 o la solución salina inmediatamente después del EC, 20 minutos

después o 40 min después, en función del grupo al que estuvieran asignados (en la Tabla 2 aparece un resumen del diseño experimental). Si los receptores NMDA están implicados en el procesamiento del EC, pero no interfieren en la acción del EI, el condicionamiento debería reducirse sólo en aquellos grupos que reciben el fármaco inmediatamente después del sabor. Por el contrario, si el MK-801 produce algún efecto cruzado sobre mecanismos o procesos relacionados con el efecto del LiCl, el condicionamiento debería verse afectado en todos los grupos en los que se inyectó el fármaco, independientemente del momento de su administración.

Tabla 2. Resumen del diseño del Experimento 2. SAL: Solución salina; MK: MK-801; Sac: Sacarosa; LiCl: Cloruro de Litio.

Grupo	Condicionamiento	Prueba
SAL/0 min	Sac - 0 min - SAL - 40 min - LiCl	Sac
MK/0 min	Sac - 0 min - MK - 40 min. - LiCl	Sac
SAL/20 min	Sac - 20 min - SAL - 20 min. - LiCl	Sac
MK/20 min	Sac - 20 min - MK - 20 min - LiCl	Sac
SAL/40 min	Sac - 40 min - SAL - 0 min - LiCl	Sac
MK/40 min	Sac - 40 min - MK - 0 min - LiCl	Sac

MÉTODO

Sujetos. Utilizamos 42 ratas *Wistar* macho experimentalmente ingenuas. El peso medio de los animales fue de 301 grs. (rango entre 249-349 grs.). Siete días antes del inicio de los tratamientos experimentales los animales fueron sometidos a un programa de privación de agua por el que recibían acceso a 30 min. de agua cada día. El resto de las condiciones fueron similares a las descritas para el experimento anterior.

Aparatos. Las sesiones se desarrollaron en la misma sala experimental descrita en el experimento anterior. Igualmente, las cajas y las botellas empleadas fueron las mismas descritas para el Experimento 1. El índice de consumo se registraba de la misma forma, mientras que el MK-801 se administraba a dosis de 0.2 mg/kg, y el LiCl se inyectaba con el mismo volumen y molaridad que en el experimento previo. El EC empleado fue una disolución de sacarosa en agua corriente (0.5%).

Procedimiento

Línea Base. Se midió la cantidad de agua que los animales ingirieron a lo largo de los tres días previos a la fase de adquisición. Al igual que en el experimento anterior, los animales se distribuyeron entre los grupos (n=7) atendiendo al consumo medio durante estos tres días para minimizar las diferencias en la ingesta el día del condicionamiento.

Condicionamiento. Tal y como describimos para el Experimento 1, las sesiones de condicionamiento y prueba tuvieron lugar en la sala experimental. Una vez introducidos en las cajas experimentales, se permitía a los animales el acceso a la solución de sacarosa durante 10 min. La inyección de MK-801 se administraba inmediatamente después del sabor, 20 min. después del sabor, o inmediatamente antes del LiCl, en función del grupo experimental (ver Tabla 2). Para todos los animales el LiCl se inyectó 40 min después de que finalizara el consumo de sacarosa.

Prueba. La prueba se llevó a cabo 24 horas después de la fase de adquisición. Los animales tuvieron acceso en las cajas experimentales a la disolución de sacarosa durante 10 min. La cantidad de sacarosa consumida se empleó como índice del condicionamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 2 representa el consumo medio de sacarosa durante el día del condicionamiento y el día de la prueba para los animales que habían recibido solución salina (Sección A) ó 0.2 mg/Kg de MK-801 (Sección B) en función del intervalo entre el consumo de sacarosa y la administración del fármaco.

Con objeto de identificar las diferencias entre los grupos aplicamos un ANVAR mixto 2 x 2 x 3 (Ensayos x Droga x Demora) sobre el consumo medio de sacarosa correspondiente a los ensayos de condicionamiento y de prueba. Tanto el efecto principal de los Ensayos como el de la Droga fueron estadísticamente significativos, $F(1,36)=531.83$; $p<0.001$ y $F(1,36)=9.01$; $p<0.01$, respectivamente. El efecto de los Ensayos refleja el decremento general del consumo que se produjo en el ensayo de prueba debido a la ACS, mientras que el efecto de la Droga se debió a un mayor consumo general de sacarosa para los animales a los que se les administró el MK-801 (Media=14.41 ml., SD=1.82), comparado con el consumo de los animales inyectados con la solución salina (Media=12.61 ml., SD=1.26). El efecto principal del factor Demora no fue estadísticamente significativo, $F(2,36)=1.07$; $p<0.35$.

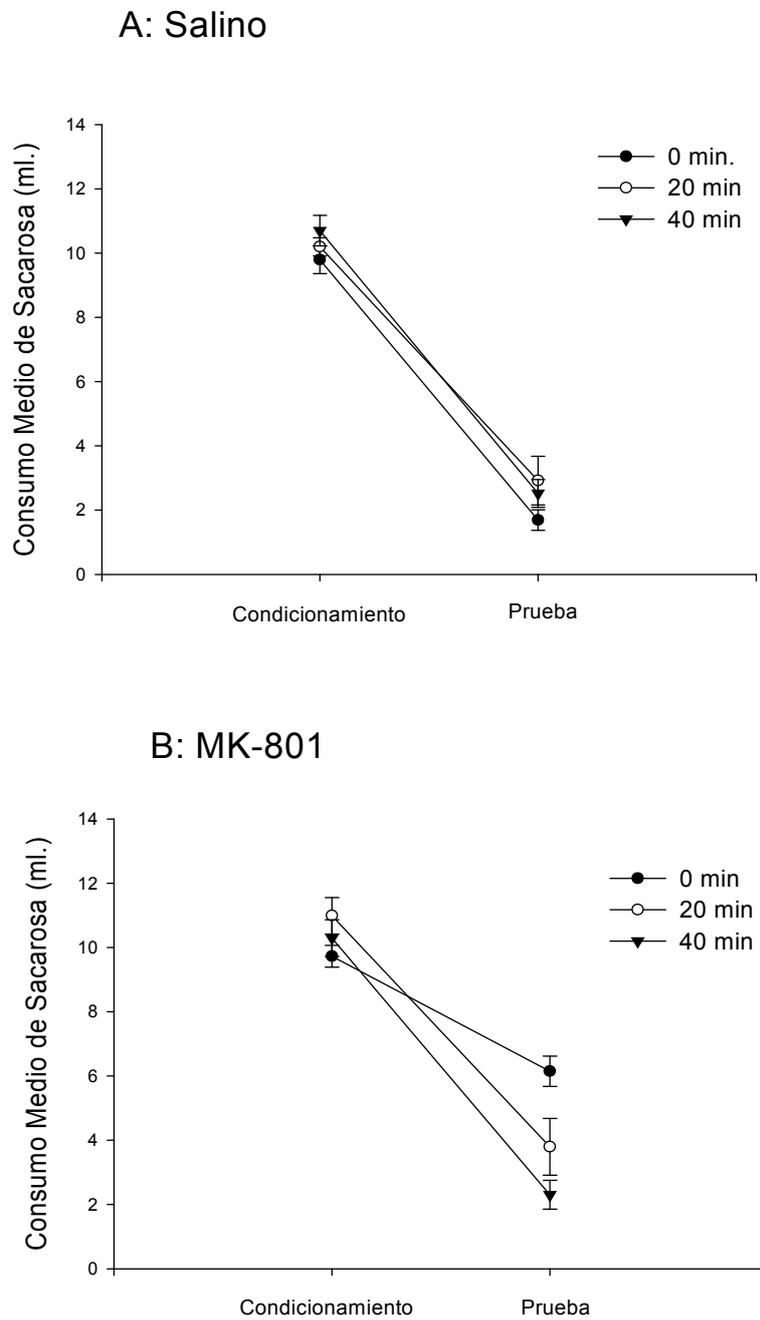


Figura 2. Consumo medio de sacarosa (ml.) correspondiente a los ensayos de condicionamiento y prueba en función del intervalo entre el EC y la administración de la droga (0, 20 ó 40 min) para los grupos inyectados con solución salina (Sección A) o con 0.2 mg/Kg de MK-801 (Sección B).

Todas las interacciones entre los factores fueron significativas ($p < .05$), aunque sólo analizaremos en profundidad la triple interacción entre los Ensayos, la Droga y la Demora, $F(2,36)=5.72$, $p < 0.01$, por corresponder con los resultados que anticipábamos en nuestras hipótesis. Para identificar el origen de esta interacción llevamos a cabo dos ANVAR 2 x 3 (Droga x Demora) independientes sobre el consumo medio correspondiente al día del condicionamiento y al día de la prueba. El análisis sobre el día del condicionamiento reveló que no existieron efectos significativos para el factor Droga, $F(1,36) < 1$ ni para el factor Demora, $F(2,36)=1.98$; $p > 0.1$. La interacción tampoco resultó significativa, $F(2,36) < 1$. El mismo análisis aplicado al consumo el día de la prueba reveló un efecto significativo del factor Droga, $F(1,36)=12.66$; $p < 0.01$, ya que los sujetos que recibieron MK-801 consumieron de forma global más sacarosa que los sujetos asignados a la condición salina. También resultó estadísticamente significativo el factor Demora, $F(2,36)=3.35$; $p < 0.05$, ya que, de forma global, los animales inyectados inmediatamente después del EC (grupos SAL/0 min y MK/0 min) consumieron más sacarosa que aquellos grupos que fueron inyectados 20 min. ó 40 min. después del sabor. También fue significativa la interacción Droga x Demora, $F(2,36)=8.66$, $p < 0.01$.

El origen de esta interacción se puede identificar en la Figura 3, donde se representa el consumo medio de sacarosa para los diferentes grupos el día de la prueba. Como se puede observar en la figura, en los grupos inyectados con solución salina tuvo lugar un condicionamiento intenso con independencia del momento en que se administraba esta sustancia. Sin embargo, se produjo un efecto disruptivo de la ACS cuando se inyectó el MK-801 justo después de la exposición al sabor. No obstante, a medida que aumentaba el intervalo de tiempo entre la presentación del EC y la administración del MK-801 el efecto disruptivo de la droga sobre el condicionamiento tendió a desaparecer.

Estas impresiones fueron confirmadas por comparaciones *a priori* basadas en nuestras hipótesis (*t* de student, $p < .05$). Concretamente, los grupos que habían recibido la solución salina no difirieron entre ellos. El condicionamiento fue significativamente menor en el grupo MK/0 min comparado con su respectivo control de salino (SAL/0 min). Sin embargo, la comparación entre los grupos MK/20 min y MK/40 min con sus controles de salino correspondientes (SAL/20 min y SAL/40 min) no reveló diferencias significativas. Finalmente, el consumo en el grupo de MK/0 min fue significativamente mayor que en los grupos MK/20 min y MK/40 min, mientras que la diferencia entre estos dos últimos grupos no fue significativa. Por consiguiente, los resultados sugieren que el MK-801

produjo una atenuación de la ACS únicamente cuando el fármaco se inyectó inmediatamente después del sabor.

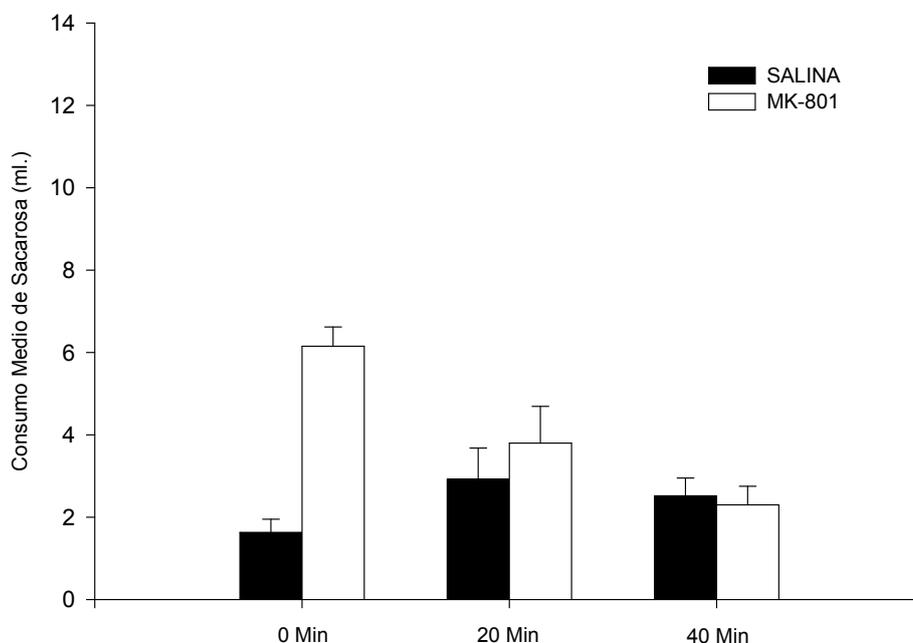


Figura 3. Consumo medio de sacarosa (ml.) el día de la prueba del condicionamiento en función de la droga inyectada (MK-801 o solución salina) y del intervalo entre el EC y la administración de la droga (0, 20 ó 40 min).

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados del Experimento 1 muestran que la administración de MK-801 (0.2 mg/kg), entre la presentación del sabor y la inyección de LiCl, produce una atenuación de la ACS. Esto parece indicar que los receptores NMDA desempeñan un papel clave en la adquisición y consolidación del trazo gustativo en la memoria (Traverso et al., 2008; ver también Traverso, et al., 2003; Traverso, Quintero, Vargas, De la Casa y López, 2010). No obstante, en base a los resultados de este experimento no puede descartarse completamente la posible influencia del MK-801 sobre las propiedades aversivas del EI. Precisamente ese fue el objetivo del Experimento 2, cuyos resultados muestran que cuando la droga se inyectaba inmediatamente

después del sabor era efectiva para producir la atenuación de la ACS, pero cuando la administración se distanciaba temporalmente de la exposición al EC (20 ó 40 min.) el condicionamiento se establecía con normalidad. En conjunto, los resultados indican que los receptores NMDA desempeñan un papel clave en la adquisición de la información relativa al EC, aunque parecen ser menos relevantes una vez que se ha establecido la asociación EC-EI. A su vez, los resultados parecen mostrar que el MK-801 no tiene un efecto significativo sobre el impacto del LiCl en el organismo.

En otros experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, la administración de dosis anestésicas de ketamina (75 mg/kg y 120 mg/kg), otro antagonista no competitivo de los receptores NMDA, entre el sabor y el LiCl ha producido una reducción en el nivel de ACS (Traverso et al., 2008). Este efecto no se observa cuando se inyectan dosis subanestésicas (25 mg/kg y 50 mg/kg). A su vez, si se establece una demora temporal de 30 min. entre el EC y el EI, las dosis más elevadas de ketamina (75 mg/kg y 120 mg/kg) atenúan el aprendizaje cuando se inyectan inmediatamente después del sabor, pero no cuando transcurre un intervalo de 15 ó 30 min. entre el consumo de la sacarosa y la administración del fármaco (Traverso et al., 2008). Por tanto, los resultados que se recogen en este trabajo utilizando MK-801 reproducen aquellos que se obtienen con ketamina, aumentando su fiabilidad y validez. Es interesante señalar que la ketamina posee propiedades anestésicas (p.ej. Haas y Harper, 1992; Irufine, Shimizu y Nomoto, 1991; Kelland, Soltis, Boldry y Walters, 1993) y analgésicas (p.ej. Reich y Silvay, 1989; Subramaniam, Subramaniam, y Steinbrook, 2004) y, por tanto, la utilización de MK-801 permite excluir la influencia de los efectos anestésicos o analgésicos sobre el aprendizaje. De hecho, el MK-801 potencia las propiedades anestésicas de otros compuestos farmacológicos (Daniell, 1990), pero no es un anestésico eficaz por sí mismo (Kelland et al., 1993), ni parece tener efectos analgésicos significativos cuando se administran dosis similares a las empleadas en nuestro estudio (Sufka, 1994), aunque algunos trabajos han demostrado que el MK-801 produce una reducción del dolor cutáneo y muscular (Ma y Woolf, 1995; Woolf y Thompson, 1991).

Es importante reseñar que los resultados obtenidos en nuestros experimentos no pueden atribuirse a posibles efectos del fármaco sobre la capacidad sensorial del animal, puesto que los animales recibían la inyección de MK-801 tras la presentación del sabor. Por tanto los estímulos habrían sido procesados correctamente por el sistema sensorial del animal en el momento en que se administraba el fármaco. Además, nuestros resultados apuntan en la misma línea de otras investigaciones en las que se ha evaluado la influencia de la ketamina sobre la percepción sensorial de

estímulos como la sacarina o el LiCl, ya que esta sustancia no afecta a las capacidades sensoriales para percibir el malestar gastrointestinal (Mickley, Remmers-Roeber, Dengler, McMullen, Kenmuir, Girdler, Crouse y Walker, 2002).

La reducción en el nivel de aprendizaje que se observa en los dos experimentos tampoco puede atribuirse a un efecto del MK-801 sobre la capacidad locomotora de los sujetos experimentales, ya que al administrarse el antagonista tras la presentación del sabor los efectos motores no pudieron alterar la respuesta de ingesta del líquido. Sí fue evidente que la administración de las dosis más elevadas del fármaco (0.1 mg/kg y 0.2 mg/kg) producían efectos motores visibles en los animales (por ej., hiperlocomoción, ataxia, estereotipia, movimientos de lado a lado, etc). Esta alteración de los movimientos naturales del animal se prolongaba durante períodos que oscilaban aproximadamente entre los 60-120 min. en línea con lo reflejado en trabajos previos (p.ej. Traverso et al., 2003).

Por otro lado, en nuestro estudio la administración del antagonista está limitada a la fase de condicionamiento, mientras que la fase de prueba se lleva a cabo sin influencia farmacológica. De este modo, el fármaco podría haber inducido un cambio en el estado interno del animal durante la fase de condicionamiento. Este estado interno podría modificar el procesamiento de la sacarosa durante ese período. Por el contrario, los animales se encontraban en un estado interno neutro en el momento en que tenían acceso al sabor durante la fase de prueba. Este contraste en el estado interno que el sujeto experimenta entre la fase de condicionamiento y la fase de prueba podría explicar en cierta medida la reducción en la aversión a través del fenómeno conocido como efecto dependiente de estado (Overton, 1978). No obstante, existen varios datos que hacen poco probable esta posibilidad. En primer lugar, la droga se administró tras la presentación del sabor, por lo que el procesamiento inicial de la información sensorial durante la fase de condicionamiento se produjo en condiciones similares a las que el sujeto experimentó en la fase de prueba. En segundo lugar, un efecto dependiente de estado debería reducir el consumo de sacarosa en todos los grupos del Experimento 2 que recibieron la administración del MK-801, con independencia del momento en que se administró la droga, lo que no se observó en los resultados.

Una última posibilidad que podría afectar al resultado de los experimentos tiene que ver con el posible papel como EI que podría haber jugado el MK-801 (p.ej. Jackson y Sanger, 1989), compitiendo con el LiCl para asociarse con el sabor. De este modo, la asociación sacarosa-MK-801 podría haber bloqueado o ensombrecido la asociación sacarosa-LiCl. Sin embargo, los datos obtenidos en el Experimento 2 descartan esta hipótesis,

ya que el fármaco debería haber competido con el LiCl con independencia del momento en que se hubiera administrado.

Un aspecto a tener en cuenta en la interpretación de nuestros resultados está relacionado con la dinámica farmacológica del MK-801. Este compuesto, al igual que la ketamina, es un antagonista no competitivo que bloquea progresivamente el canal de calcio de los receptores NMDA. El tiempo exacto que tarda la ketamina o el MK-801 en bloquear el canal es desconocido, pero el proceso parece ser relativamente lento y depende de si el canal iónico está abierto o cerrado. Una vez que el canal está abierto, es bloqueado rápidamente por la droga, pero como la probabilidad de que el canal este abierto es baja, en su conjunto el proceso de bloqueo es lento y gradual (ver Huettner y Bean, 1988; MacDonald, Miljkovic y Pennefather, 1987). El MK-801 produce efectos sobre la conducta motora en unos 10 ó 20 minutos cuando se emplean dosis que van de 0.05 a 0.3 mg/kg. Se estima que el efecto de los antagonistas de NMDA sobre la conducta motora es un indicio de su acción sobre el canal de calcio del receptor (p.ej. Hargreaves y Cain, 1992) y en nuestro estudio el MK-801 debería producir un efecto sobre el aprendizaje en un intervalo temporal de 10 - 20 minutos. En el Experimento 2 se observa que cuando se incrementa el tiempo entre la administración de la droga y la exposición a la sacarosa, el efecto de deterioro del condicionamiento decrece. Esto parece indicar que si los receptores NMDA no están completamente bloqueados cuando la conexión sabor-malestar se establece a nivel central, la capacidad del fármaco para interferir en la asociación se reduce significativamente. Por consiguiente, y de acuerdo a nuestros resultados, parece que en el grupo MK/0.2 del Experimento 1, y en el grupo MK/0 min. del Experimento 2, el bloqueo funcional del receptor NMDA tuvo lugar antes de que la influencia del LiCl sobre el sistema nervioso central fuera lo suficientemente intensa como para asociarse efectivamente a la huella de memoria del sabor.

En resumen, nuestros resultados están en línea con aquellas investigaciones que han encontrado que el trazo de memoria para un determinado sabor, es dependiente de la actividad de los receptores NMDA (Aguado et al., 1994; Escobar et al., 2002; Ferreira et al., 2002; Figueroa-Guzmán y Reilly, 2008; Figueroa-Guzmán et al., 2006; Gutiérrez et al., 2003; Rosenblum et al., 1997; Walker y Scully, 1996; Welzl et al., 1990; Yasoshima et al., 2000), aunque contradicen aquellos que no han encontrado efectos sobre el establecimiento de ACS (Ferreira et al., 2002). En este sentido, los receptores NMDA parecen desempeñar un papel clave en la codificación y/o consolidación del trazo de memoria para el sabor, o memoria gustativa a corto plazo (Traverso et al., 2003, 2008, 2010). Esta memoria podría depender de los receptores NMDA hasta el momento en

que es clasificada por el organismo como familiar y segura, o hasta el momento en que entra en conexión con la información procedente de aquellos centros neurales que procesan el EI, etiquetándose en ese caso como familiar y aversiva.

ABSTRACT

Disruption of taste trace by MK-801 administration. Systemic administration of NMDA antagonists induces a disruption of Conditioned Taste Aversion when the drug is administered before stimuli presentation. However, there is scarce evidence, and such evidence is contradictory, on the role of NMDA receptors on Conditioned Taste Aversion when the drugs are injected in the interval between the Conditioned Stimulus (CS) and the Unconditioned Stimulus (US). In this paper we describe two experiments designed to analyze whether MK-801 (dizolcipine maleate) administration during the interval between the CS and the US disrupts Conditioned Taste Aversion (Experiment 1), and whether the introduction of a delay between MK-801 administration and US presentation prevents such disruption (Experiment 2). The results show the predicted Conditioned Taste Aversion disruption when the drug was injected immediately before the US, and normal Conditioned Taste Aversion when a delay was introduced between the NMDA antagonist and the US. These results support a relevant role of NMDA receptors in encoding and consolidation of the taste memory trace.

REFERENCIAS

- Aguado, L., San Antonio, A., Pérez, L., Del Valle, R., y Gómez, J. (1994). Effects of the NMDA receptor antagonist ketamine on flavor memory: Conditioned aversion, latent inhibition and habituation of neophobia. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 271-281.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 209-217.
- Bures, J. (1998). Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA. En J. Bures, F. Bermúdez-Rattoni, T. y Yamamoto (Eds.), *Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind* (pp. 1-13). Oxford: Oxford University Press.
- Daniell, L.C. (1990). The non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists, MK-801, phencyclidine and ketamine, increase the potency of general anesthetics. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 36, 111-115.
- Domjan, M. (1983). Biological constraints on instrumental and classical conditioning: Implications for general process theory. En G.H. Bower (Ed.), *The psychology of learning and motivation* (pp. 215-277). Nueva York: Academic Press.
- Escobar, M.L., Alcocer, I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 129, 101-106.

- Ferreira, G., Gutiérrez, R., De la Cruz, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, *16*, 1139-1145.
- Figueroa-Guzmán, Y. y Reilly, S. (2008). NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Research*, *1210*, 200-203.
- Figueroa-Guzmán, Y., Kuo, J.S. y Reilly, S. (2006). NMDA receptor antagonist MK-801 infused into the insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Research*, *1114*, 183-186.
- García, J. (1989). Food for Tolman: cognition and cathesis in concert. En T. Archer y L.G. Nilson (Eds.), *Aversion, avoidance and anxiety* (pp. 45-85). Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.
- García, J. (1990). Learning without memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *2*, 287-305.
- García, J. y Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, *4*, 123-124.
- García, J., Brett, L. y Rusiniak, K. (1989). Limits of Darwinian conditioning. En S. Klein y R. Mowrer (Eds.), *Contemporary learning theories: Instrumental conditioning theory and the impact of biological constraints on learning* (pp. 181-203). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- García, J., Ervin, F.R. y Koelling, R.A. (1966). Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science*, *5*, 121-122.
- García, J., Lasiter, P., Bermúdez-Rattoni, F. y Deems, D. (1985). A general theory of aversion learning. En N.S. Braveman y P. Bronstein (Eds.), *Experimental assessments and clinical applications of conditioned food aversions* (pp. 8-21). New York, Annals of the New York Academy of Sciences.
- García, J., Rusiniak, K.W., Kiefer, S.W. y Bermúdez-Rattoni, F. (1982). The neural integration of feeding and drinking habits. En C. Woody (Ed.), *Conditioning* (pp. 567-579). New York: Plenum Press.
- Gutiérrez, R., Téllez, L.A. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, *17*, 1556-1562.
- Gutiérrez, H., Hernández-Echeagaray, E., Ramírez-Amaya, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1999) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, *89*, 751-758.
- Haas, D.A. y Harper, D.G. (1992). Ketamine: a review of its pharmacologic properties and use in ambulatory anesthesia. *Anesthesia progress*, *39*, 61-68.
- Hargreaves, E.L. y Cain, D.P. (1992). Hyperactivity, hyper-reactivity, and sensorimotor deficits induced by low doses of the N-methyl-D-aspartate non-competitive channel blocker MK-801. *Behavioural Brain Research*, *47*, 23-33.
- Huettnner, J.E. y Bean, B.P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 1307-1311.
- Irufine, M., Shimizu, T. y Nomoto, M. (1991). Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *40*, 399-407.
- Jackson, A. y Sanger, D.J. (1989). Conditioned taste aversions induced by phencyclidine and other antagonists of N-methyl-D-aspartate. *Neuropharmacology*, *28*, 459-464.

- Kelland, M.D., Soltis, R.P., Boldry, R.C. y Walters, J.R. (1993). Behavioral and electrophysiological comparisons of ketamine with dizocilpine in the rat. *Physiology and Behavior*, *54*, 547-554.
- Ma, Q.P. y Woolf, C.J. (1995). Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain*, *61*, 383-390.
- McDonald, J.F., Miljkovic, Z. y Pennefather, P. (1987). Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *Journal of Neurophysiology*, *58*, 251-266.
- Mickley, G.A., Remmers-Roeber, D.R., Dengler, C.M., McMullen, C.A., Kenmuir, C.L., Girdler, B., Crouse, C. y Walker, C. (2002). Simple behavioral methods to assess the effect of drugs or toxins on sensory experience. *Journal of Neuroscience Methods*, *115*, 85-92.
- Overton, D.A. (1978). Major theories of state-dependent learning. En B.T. Ho, D.W. Richards y D.L. Chute (Eds.), *Drug discrimination and state-dependent learning* (pp. 284-309). New York: Academic Press.
- Reich, D.L. y Silvay, G. (1989). Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Canadian Journal of Anaesthesia*, *36*, 186-197.
- Riedel, G., Platt, B. y Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, *140*, 1-47.
- Robinson, G.S., Crooks, G.B., Jr., Shinkman, P.G. y Gallagher, M. (1989). Behavioral effects of MK-801 mimic deficits associated with hippocampal damage. *Psychobiology*, *17*, 156-164.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, S., Lamprecht, R. y Dudai, Y. (1997). NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *The Journal of Neuroscience*, *17*, 5129-5135.
- Traverso, L.M., Ruiz, G. y De la Casa, L.G. (2003). Latent inhibition disruption by MK-801 in a conditioned taste-aversion paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, *80*, 140-146.
- Traverso, L.M., Ruiz, G., Camino, G. y De la Casa, L.G. (2008). Ketamine blocks the formation of a gustatory memory trace in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *90*, 305-311.
- Traverso, L.M., Quintero, E., Vargas, J.P., De la Casa, L.G. y López, J.C. (2010). Taste memory trace disruption by AP5 administration in basolateral amygdala. *Neuroreport*, *21*, 99-103.
- Seligman, M.E.P. (1970). On the generality of the laws of learning. *Psychological Review*, *77*, 406-418.
- Subramaniam, K., Subramaniam, B. y Steinbrook, R.A. (2004). Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review. *Anesthesia and Analgesia*, *99*, 482-495.
- Sufka, K.J. (1994). Conditioned place preference paradigm: a novel approach for analgesic drug assessment against chronic pain. *Pain*, *58*, 355-366.
- Walker, M.L. y Scully, V.M. (1996). Disruption of the acquisition of a conditioned taste aversion by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Zeitschrift-fuer-Psychologie*, *204*, 305-313.
- Welzl, H., Alessandri, B. y Bättig, K. (1990). The formation of a new gustatory memory trace in rats is prevented by the non-competitive NMDA antagonist ketamine. *Psychobiology*, *18*, 43-47.
- Woolf, C.J. y Thompson, S.W. (1991). The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation;

implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*, 44, 293-299.

Yasoshima, Y., Morimoto, T. y Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Research*, 869, 15-24.

(Manuscrito recibido: 12 Mayo 2011; aceptado: 18 Julio 2011)