



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN
LA CORTEZA INSULAR DURANTE EL APRENDIZAJE
GUSTATIVO**

T E S I S

QUE PAR AOBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

LUIS NÚÑEZ JARAMILLO

TUTOR DE TESIS:
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos, porque han estado ahí en los momentos más importantes de mi vida, dejando parte de ellos en la persona que soy ahora, y por todo el apoyo que siempre me han otorgado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me brindó para desarrollarme tanto en lo académico, como en lo intelectual y en lo personal.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por su apoyo para llevar a cabo el doctorado y sus consejos.

A la Dra. Patricia Joseph y al Dr. Ricardo Tapia, por haberme ayudado y aconsejado durante mi doctorado.

A Beatriz Jiménez, Nadia Ramírez y Claudio Luna, con quienes desarrollé una parte importante de esta tesis, y con quienes tuve la oportunidad de convivir.

A Wendy Herrera, por todo lo que ha aportado a mi vida, dentro y fuera del laboratorio. Por las largas horas de plática y las meditaciones en silencio, por el trabajo arduo en el laboratorio y por las escapadas de pinta al cine. Por su amistad y complicidad. Por todo lo que hemos compartido, y por lo que aún viene.

A Leticia Ramírez, por haber sido mi maestra y amiga desde que puse un pie en el laboratorio, hace ya 7 años. Por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, ya sea comiendo en el pozole o de vacaciones en la huasteca. Por todo lo que hemos convivido y aprendido en esta larga amistad, que espero dure muchos años más.

A todos mis compañeros y amigos, Nines, Andrea, Royero, Rodrigo, Sandra, Ilse, Kioko, Perla, Vanesa (E.P.D), Israela, Ivonne, Bárbara, Tomás (casi del laboratorio), Paloma, Pamela, Chacón y Pascal, entre muchos más con quienes he tenido la suerte de convivir, que me han visto crecer durante años, y que han formado en poco o en mucho a la persona que soy ahora. Gracias por todas las vivencias dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Martha Escobar, el Dr. Gabriel Gutiérrez, la Dra. Clorinda Arias, el Dr. Alejandro Zentella, la Dra. Lourdes Massieu y el Dr. Roberto Prado, por la revisión de este texto y por sus valiosos comentarios.

A Yolanda Díaz, Adriana Morales, Sara Noguera, Félix, Federico Jandete y Oreste Carbajal por el apoyo que recibí de ellos a lo largo de mis estudios.

A CONACyt y DGEP por el apoyo económico otorgado a través de los proyectos 42657Q y DGEP-UNAM 220706-03

No abras los labios si no estás seguro de que lo que vas a decir es más hermoso que el silencio
Proverbio árabe

Los años enseñan muchas cosas que los días jamás llegan a conocer
Emerson, Ralph W

El hombre que se levanta es aún más grande que el que no ha caído
Arenal, Concepción

Pensamientos tontos los tenemos todos, pero el sabio se los calla
Wilhelm Bush

INDICE

Agradecimientos y Dedicatorias	
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Indice.....	vi
Tabla de abreviaturas.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Importancia evolutiva del sistema gustativo.....	4
Etiquetamiento de un sabor novedoso como seguro. Atenuación de la neofobia a los sabores (AN).....	7
Etiquetamiento de un sabor novedoso como aversivo. Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).....	8
Diferencias entre el etiquetamiento de un sabor como seguro o aversivo.....	9
Corteza insular y aprendizaje gustativo	10
Modulación del receptor NMDA durante el aprendizaje gustativo.....	12
Regulación del receptor NMDA por fosforilación.....	13
CAPITULO I.....	17
Papel de PKC en la corteza insular en el aprendizaje gustativo.....	17
Antecedentes.....	17
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y METODO.....	20
RESULTADOS.....	21
Discusión Capítulo I	25
CAPITULO II.....	27
Cambio en la presencia de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la fracción de membrana resistente a detergentes (DRM) en la CI tras el consumo de un sabor nuevo.....	27
Antecedentes.....	27
HIPOTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	31
MATERIAL Y METODO.....	31
RESULTADOS.....	32
Incremento en la presencia de NR2A y NR2B en DRMs.....	32
Discusión Capítulo II	39

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES.....	40
METODOLOGÍA	50
Procedimientos conductuales.....	50
Para la obtención de muestras de novedad-familiaridad de la . sacarina.....	50
Condicionamiento Aversivo a los sabores.....	50
Atenuación de la neofobia	51
Extracción de la muestra.....	51
Aislamiento de DRM's.....	51
SDS-PAGE.....	52
Implantación de las cánulas.....	54
Microinyecciones.....	54
REFERENCIAS	56
ANEXO (Artículos)	64

TABLA DE ABREVIATURAS

TMS	Trazo de memoria del sabor
CAS	Condicionamiento aversivo a los sabores
CI	Corteza insular
PKC	Proteína cinasa C
AN	Atenuación de la neofobia
CP	Corteza insular
NMDA	M-metil-d-aspartato
LTP	Potenciación a largo plazo
DRM	Fracción membranal resistente a detergentes
mAChR	Receptores muscarínicos de acetilcolina
NBM	Núcleo basal magnocelular

RESUMEN

Se sabe que la corteza insular juega un papel determinante en la formación de memorias gustativas. Se ha reportado también que dentro de la corteza insular se llevan a cabo muchos procesos de señalización intracelular tras el consumo de un sabor nuevo, tales como la forforilación de los receptores a glutamato tipo NMDA y la activación de cinasas como ERK I/II. En esta tesis se describe inicialmente la participación diferencial de la proteína cinasa C en la corteza insular en la formación de una memoria gustativa aversiva o segura, siendo indispensable para la primera, pero no para la segunda. La participación de la proteína cinasa C en la corteza parietal adjacente a la corteza insular no es necesaria para la formación de la memoria de aversión al sabor.

En el segundo capítulo de esta tesis se describe como, tras el consumo de un sabor nuevo, las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la corteza insular, incrementan su presencia en la fracción de membrana resistente a detergentes. Este incremento está altamente relacionad con la novedad del estímulo gustativo, no se debe a un cambio en la cantidad de proteína total de estas subunidades, y es sensible al bloqueo de los receptores muscarínicos de acetílcolina y a la inhibición de la proteína cinasas C.

Los resultados son discutidos en términos de la modulación del receptor NMDA y su participación en la cortezaa insular en la interacción entre el estímulo gustativo y las señales de toxicidad durante la formación de la memoria de aversión al sabor. También se sugiere la participación de la proteína cinasa C en la regulación de la actividad del receptor NMDA en la corteza insular.

ABSTRACT

It is widely known that the insular cortex plays a determining role in the formation of gustatory memories. It has also been reported that within the insular cortex, a large number of intracellular processes take place after consumption of a new taste, such as the phosphorylation of the NMDA type of glutamate receptors and the activation of kinases such as ERK I/II. In this thesis we first describe the differential role of protein kinase C in the IC in the formation of an aversive or safe taste memory, being necessary only for the first but not for the second. The participation of protein kinase C in the parietal cortex adjacent to the insular cortex is not necessary for the formation of the aversive taste memory.

In the second chapter of this thesis it is described that, after consumption of a new taste, NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor in the insular cortex increase their presence in the detergent resistant fraction of the membrane. This increase is highly related with the novelty of the gustatory stimulus, is not due to a change in the total amount of protein of these subunits, and is sensitive to the blockade of muscarinic acetylcholine receptors and to the inhibition of protein kinase C.

Results are discussed in terms of the modulation of NMDA receptor activity, and its participation in the insular cortex in the interaction of taste stimulus and toxicity signals, in order to form an aversive taste memory. It is also suggested the participation of the protein kinase C in the regulation of NMDA receptor activity in the insular cortex.

INTRODUCCIÓN

Entender la forma en la que aprendemos y recordamos los acontecimientos de la vida diaria ha sido desde hace mucho tiempo una inquietud para la humanidad. Lo que somos hoy en día depende en gran medida de todo lo que hemos experimentado, de la gente y los eventos que han influido sobre nosotros, forjando hasta cierta medida nuestro carácter y la perspectiva que tenemos de las cosas a las que nos enfrentamos día con día. Pero todo esto depende finalmente de nuestros recuerdos, entonces, ¿sería posible tener una identidad si no se tuviese la capacidad de *recordar* nuestras vivencias? Desde es punto de vista la memoria se convierte en la esencia de la identidad. Quizá sea por esto que a lo largo de los siglos la memoria ha sido un tema de estudio para disciplinas tales como la filosofía, la psicología y la fisiología.

El aprendizaje, es un proceso que nos permite aprender acerca de la información del mundo que nos rodea, y la memoria nos permite retener esta información para poder evocarla posteriormente. Con base en estudios conductuales ha sido posible elaborar una descripción conductual de la memoria, así como una clasificación de los diferentes tipos de esta. La primera división separa la memoria explícita o declarativa, de la memoria implícita o no declarativa (Fernandez y Bermúdez, 2001). Una diferencia importante entre estas dos clases de memorias es que en el caso de la primera el individuo recuerda “conscientemente”, como cuando recordamos un número telefónico, o las respuestas a las preguntas de un examen. En el segundo caso la experiencia

altera inconscientemente la conducta del individuo, como cuando después de algún tiempo escuchamos una canción y nos percatamos de que nos pone tristes o contentos debido a que fue asociada con algún evento de nuestras vidas, o cuando el olor de cierta comida nos recuerda nuestra casa cuando estamos lejos, etc.

La memoria explícita se clasifica a su vez en memoria de semántica y episódica. La memoria semántica se refiere a recordar conceptos o fechas, mientras que en el caso de la memoria episódica, todos estos elementos (fechas, objetos, acciones) se conjuntan en una memoria que involucra a quien recuerda.

Por otra parte, la memoria implícita se divide en 4 categorías:

- De habilidades y hábitos, como aprender a manejar, o a andar en bicicleta.
- Cebar*, que es cuando la ejecución de una tarea de memoria se ve afectada por información a la que se ha tenido acceso recientemente. Por ejemplo, si acabamos de comer tacos de barbacoa y nos piden que mencionemos 10 animales es más probable que digamos borrego a que digamos águila.
- Memorias asociativos, como el ejemplo donde un olor nos recuerda un lugar.
- Memorias no asociativos como la habituación, por ejemplo, al acostumbrarnos a llevar una gorra en la cabeza ya no nos percatamos más de su presencia (Fernandez y Bermúdez, 2001).

En el caso del aprendizaje asociativo, un ejemplo que importante es el de el condicionamiento clásico de Ivan P. Pavlov (Bermudez et al., 2001). Cuando a un perro se le presenta un trozo de carne comienza a salivar, Pavlov observó que si acostumbraba al perro a oír el sonido de una campana cuando se le presentaba la carne, llegaba un momento en que el perro salivaba como respuesta a la campana, a pesar de que la carne no estuviera presente, lo que significaba que el perro había aprendido a asociar el sonido de la campana con la presencia de la carne. En esta caso la carne es un estímulo que provoca *per se* una respuesta en el perro, por lo que lo llamó estímulo incondicionado (EI), la campana en cambio, es un estímulo que va a generar salivación en el perro únicamente después de que se presencia ha sido asociada a la carne, por lo que Pavlov la llamó estímulo condicionado (EC). Estos dos términos serán utilizados más adelante en esta tesis.

Sin embargo, los mecanismos fisiológicos del aprendizaje, es decir, qué es lo que sucede en el cerebro cuando el individuo aprende algo, no comenzaron a estudiarse sino hasta la segunda mitad del siglo XX. Para llevar a cabo estos estudios se han utilizado diversas tareas conductuales que tratan de imitar condiciones con las que un animal puede encontrarse en la naturaleza, por ejemplo, el conocer perfectamente el área que habita le permite identificar rutas que lo lleven a lugares donde encuentre comida o donde pueda escapar de sus depredadores, así como la ruta a su madriguera, etc. Todas estas situaciones son en realidad un conjunto de estímulos que el animal siente a través de los

sentidos y que adquieren significado en el entorno particular en que se presentan, dependiendo de la relevancia de estos para la sobrevivencia del animal. El animal siente estos estímulos a través de diferentes sistemas, como son el visual, el olfativo o el gustativo, este último juega un papel fundamental en las conductas estudiadas en esta tesis.

IMPORTANCIA EVOLUTIVA DEL SISTEMA GUSTATIVO.

La función del sistema gustativo va más allá del uso hasta cierto punto cultural que tiene en las sociedades modernas. Mientras que en las sociedades humanas el gusto se emplea prácticamente como un medio para disfrutar de nuestros alimentos, la verdadera función de este sentido es impedir que consumamos alimentos que puedan resultarnos tóxicos, siendo en un medio natural un elemento que podría diferenciar entre la vida y la muerte.

El sistema gustativo consiste en una serie de quimiorreceptores en la boca que permiten conocer algunas características químicas de lo que se consume. En Desde organismos relativamente simples como las bacterias o los protozoarios podemos encontrar mecanismos que responden a la presencia de diferentes compuestos en el medio a través de quimiorreceptores. Este mecanismo le permite al organismo conocer diferentes aspectos del medio en el que se encuentra indicándole la presencia de alimento o de sustancias tóxicas y moléculas que participan en procesos de comunicación intracelular. Los organismos unicelulares detectan estos compuestos a través de receptores en su

membrana y responden acercándose o alejándose de estos estímulos (Meisami, 1991).

En los animales invertebrados los mecanismos de quimiorrecepción están muy desarrollados, particularmente en insectos, donde se pueden observar diferentes mecanismos de quimiorrecepción que no se limitan únicamente a gusto y olfato, sino que pueden percibir a través de quimiorreceptores en todo el cuerpo, la presencia de sustancias nocivas como el amonio. En el caso del sistema gustativo de los insectos, este puede distinguir una variedad relativamente amplia de estímulos, y tiene una función principalmente alimenticia. Los insectos detectan los sabores a través de estructuras llamadas *sensilias gustativas*, las cuales se encuentran principalmente en la boca, aunque también llegan a encontrarse en las antenas y en otras superficies del cuerpo cuya función principal no es la caracterización química del medio. La estimulación de estas estructuras por diferentes compuestos genera diferentes *conductas* en los insectos, por ejemplo, cuando se les presenta a las moscas agua endulzada extienden su proboscis para beberla, esta conducta no se observa si se le presenta solamente agua, o agregando quinina a la solución de agua con azúcar. Las orugas hacen un fuerte movimiento de la boca en respuesta a compuestos salados o amargos y las abejas rechazan la miel tratada con quinina (Meisami, 1991).

Las células del cuerpo de los vertebrados tienen diferentes quimiorreceptores en su membrana que les permiten responder a una gran variedad de estímulos químicos. Los vertebrados tienen cuatro tipos básicos de sistemas quimiorreceptores: un sentido químico general que detecta sustancias dañinas y cuyos receptores se encuentran en la piel y en las mucosas de la boca y del sistema respiratorio, un sistema quimiorreceptor interno que participa en la regulación de funciones viscerales, y los sentidos especializados del olfato y del gusto (Meisami, 1991).

Los receptores gustativos de los vertebrados se encuentran en la cavidad bucal y participan en la detección, selección y rechazo de los compuestos químicos asociados con los alimentos (Meisami, 1991).

El sistema gustativo ha evolucionado a partir de sistemas de quimiorrepción menos especializados y tiene una participación importante en la determinación de la conducta alimenticia de diferentes organismos. Como ya se mencionó, la detección de las características químicas de un alimento puede generar diferentes conductas en los animales, conductas que le permiten sobrevivir al evitarle consumir sustancias tóxicas.

En resumen, la función del sistema gustativo es servir como último filtro de entrada de los alimentos, después de la vista y el olfato. Con la ayuda de este sistema los organismos pueden distinguir las características químicas de lo que

consumen. Uno de los aspectos más útiles de este sistema es el de consumir únicamente aquellos alimentos que son “seguros”, evitando consumir aquellos que le hayan resultado tóxicos provocándole algún malestar. Lo anterior implica que el animal *recuerda* lo que sucedió cuando probó por primera vez un determinado alimento, indicando la existencia de mecanismos que le permiten almacenar en su memoria las características químicas (sabor) de un alimento, y las consecuencias que éste tuvo. A grandes rasgos, el animal divide los alimentos que prueba en 2 categorías principales: seguro y aversivo, y se han diseñado tareas que nos permiten estudiar estos aprendizajes en el laboratorio.

Etiquetamiento de un sabor novedoso como seguro.

Atenuación de la neofobia a los sabores (AN).

Una forma en la que los animales evitan consumir alimentos tóxicos es consumiendo sólo aquellos cuyas consecuencias ya conocen, dado que un alimento desconocido implica un posible riesgo de intoxicación. Sin embargo, el tener una mayor variedad de alimentos viables conocidos aumenta sus posibilidades de sobrevivir, ya que no depende forzosamente de la disponibilidad de un alimento que puede agotarse o ser inaccesible por algún motivo.

La forma en que los animales conjugan conductualmente estos dos aspectos es mediante la *neofobia* (temor a lo nuevo) a los sabores y su posterior atenuación. Cuando un animal presenta neofobia a un sabor, consume sólo una pequeña parte de este alimento nuevo para minimizar los efectos de una posible

intoxicación. Si el consumo del nuevo alimento no le provocó ningún tipo de malestar, la siguiente vez que el animal lo encuentra consume un poco más. Esta conducta pensamos que indica que el animal *recuerda* que la última vez que lo probó no le provocó ningún daño, a este proceso se le conoce como atenuación de la neofobia y es una conducta que indica que el animal etiqueta como *seguro* un alimento (Domjan, 1976). Se ha determinado que esta conducta depende del número y duración de las exposiciones que tenga el animal al estímulo gustativo y de la intensidad (concentración) del mismo (Domjan, 1976).

Etiquetamiento de un sabor novedoso como aversivo.

Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).

Una de las conductas más observadas e importantes en muchas especies es la de evitar la ingestión de alimentos que le resultan nocivos o venenosos. Aprender a evitar alimentos nocivos implica una ventaja evolutiva, dado que el animal que consume de manera reiterada alimentos que le produzcan algún daño tiene pocas probabilidades de sobrevivir. Los animales detectan un alimento dañino mediante las consecuencias de su ingestión, estas consecuencias pueden variar desde un ligero malestar gástrico hasta fiebre severa, o inclusive la muerte; si el animal sobrevive asociará el daño con las características del sabor del alimento ingerido, de manera que la próxima vez que lo encuentre no lo comerá. El CAS recrea experimentalmente estas condiciones. El entrenamiento para el CAS consiste en presentar al animal un estímulo gustativo novedoso, el cuál será seguido de un estímulo aversivo que le

causará al animal un efecto dañino. El estímulo aversivo más comúnmente utilizado es una inyección intraperitoneal (i.p.) de cloruro de litio (LiCl), el cuál le provoca un malestar gástrico que asociará con el estímulo gustativo, de manera que la próxima vez que el estímulo le sea presentado tenderá a rechazarlo.

DIFERENCIAS ENTRE EL ETIQUETAMIENTO DE UN SABOR COMO SEGURO O AVERSIVO.

Los aprendizajes antes mencionados pueden ser desencadenados por el mismo estímulo gustativo dependiendo de las consecuencias que el consumo del mismo tenga para el animal. Existen reportes en la literatura en los cuales se puede ver que el aprendizaje de lo seguro y de lo aversivo emplea diferentes mecanismos, aún antes de determinarse el valor hedónico del alimento. Buresova y Bures (Buresova y Bures, 1980) demostraron que durante la primera hora posterior al consumo de un sabor novedoso (jugo de manzana) podían impedir la atenuación de la neofobia con tratamientos como choques electroconvulsivos, hipotermia, así como el anestésiar al animal con éter o con pentobarbital sódico, tratamientos que no afectan el aprendizaje del CAS cuando son aplicados entre el sabor novedoso y el agente inductor de malestar (Buresova y Bures, 1980).

Más recientemente, Gutiérrez y colaboradores (Gutierrez et al., 2003b) demostraron que el sistema colinérgico en la corteza insular de la rata participa de forma diferente en el aprendizaje de la aversión o seguridad de un estímulo

gustativo novedoso, dado que el bloqueo de los receptores muscarínicos en esta estructura después de que el animal consume un sabor nuevo afecta únicamente el etiquetamiento de un sabor como seguro (atenuación de la neofobia e inhibición latente) pero no tiene efectos sobre el etiquetamiento de ese mismo sabor como aversivo (CAS); mientras que el bloqueo de los receptores muscarínicos en la corteza insular antes de que la rata pruebe el sabor afecta a las dos tareas. Lo anterior sugiere una participación diferencial del sistema colinérgico en la corteza insular en el etiquetamiento de un sabor como seguro o como aversivo.

Por lo tanto, el sabor debe de ser capaz de inducir los mecanismos neuronales necesarios para que el animal aprenda cualquiera de estas dos consecuencias.

CORTEZA INSULAR Y APRENDIZAJE GUSTATIVO.

La corteza insular (CI) es una región de la corteza temporal. La corteza gustativa se encuentra en la corteza insular agranular (Braun, 1990). Esta corteza ha sido involucrada por varios autores en el aprendizaje gustativo (Bures et al., 1998).

La corteza gustativa presenta conexiones recíprocas con la amígdala (Yamamoto et al., 1994), aferencias provenientes del Nucleus Basalis Magnocelularis (NBM) (Bielavska y Roldan 1996; Gutierrez et al. 1999), conexiones recíprocas con el núcleo parabraquial (Yamamoto et al., 1994; Reilly, 1999), y eferencias hacia el núcleo del tracto solitario (Schafe y Bernstein, 1998).

Se ha visto que la CI es una estructura de vital importancia para el aprendizaje gustativo, dado a que al lesionarla no es posible aprender el CAS (Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991; Ormsby et al., 1998). Se ha observado también que el bloqueo de los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) impide el aprendizaje del CAS y de la AN (Ferreira et al., 2002; Gutierrez et al., 2003b; Gutierrez et al., 2003a), mientras que el interferir con el sistema de transmisión glutamatérgico al bloquear, ya sea los receptores NMDA o AMPA/Kainato, se interfiere con la formación de la memoria del CAS (Ferreira et al., 2002) .

En la corteza insular se han detectado varios eventos intracelulares asociados al consumo de un sabor nuevo tales como la activación de las cinasas reguladas extracelularmente (ERK1/II por sus siglas en inglés, extracellular regulated kinase) (Berman et al., 1998; Swank y Sweatt, 2001) y de el elemento de unión al ADN que responde a niveles de AMP cíclico (CREB, por sus siglas en inglés, cAMP response element binding) (Swank y Sweatt, 2001). También se ha reportado en esta corteza un incremento en la liberación de ACh tras el consumo de un sabor nuevo (Miranda et al., 2000), esta liberación está fuertemente asociada a la novedad del estímulo gustativo, siendo menor al hacerse familiar el estímulo mediante presentaciones sucesivas. Se ha reportado también la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B del receptor a glutamato tipo NMDA tras el consumo de un sabor nuevo y asociada al CAS (Rosenblum et al., 1997), que se sabe regula positivamente la actividad del canal (Lin et al., 1998).

En resumen, la corteza insular es un área en la que podrían estar llevándose a cabo eventos intracelulares relacionados con el etiquetamiento de un sabor nuevo como seguro o como aversivo.

MODULACIÓN DEL RECEPTOR NMDA DURANTE EL APRENDIZAJE GUSTATIVO

El receptor a glutamato tipo NMDA conduce Ca^{2+} tras su activación, desencadenando una gran cantidad de mecanismos de señalización intracelular que llevan a la expresión de diferentes genes , evento relacionado con el establecimiento de memoria a largo plazo (Jodar y Kaneto, 1995).

Se ha reportado que el bloqueo de este receptor afecta el aprendizaje de diferentes tareas como el laberinto de agua y el condicionamiento aversivo a los sabores (Gutierrez et al., 1999). De hecho, profundizando un poco más en la participación del receptor NMDA en el aprendizaje gustativo, se ha reportado que en la CI está involucrado en el aprendizaje del CAS pero no de la atenuación de la neofobia (Gutierrez et al., 2003a).

El receptor NMDA está compuesto al menos de 2 tipos de subunidades: NR1, de la cuál existen 10 variantes generadas por “splicing” alternativo, esta subunidad contiene el sitio de unión a glicina, que es indispensable para el funcionamiento del receptor, por lo que siempre está presente; NR2 (A, B, C y D) , de las cuáles

la C y D se expresan principalmente en neuronas embrionarias aunque siguen expresándose en niveles bajos en la corteza del adulto (Goebel y Poosch, 1999); y las NR3 (A y B) que se presentan también principalmente durante el desarrollo embrionario, además de que su presencia en el receptor disminuye la conductividad de Ca^{++} inducida por su activación (Sasaki et al., 2002; Matsuda et al., 2003). Se ha reportado que en corteza de ratas adultas los receptores NMDA están compuestos en su mayoría por una combinación de subunidades NR1/NR2A/NR2B (Luo et al., 1997).

Regulación del receptor NMDA por fosforilación

La función del receptor NMDA puede ser regulada por medio de la fosforilación de sus subunidades NR2A y NR2B, lo que potencia su actividad al incrementar la conducción de Ca^{++} a través del canal al ser activado (Kohr y Seeburg, 1996; Leonard y Hell, 1997; Levine et al., 1998; Lin et al., 1998; Li et al., 2001; Liao et al., 2001). Se ha propuesto también que la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B del receptor NMDA puede desencadenar al activación de cascadas de señalización intracelular dependientes de dicha fosforilación, se ha visto por ejemplo que la cinasa PI3K interactúa con la subunidad NR2B del receptor NMDA únicamente cuando este está fosforilado en tirosinas, de manera muy similar a los receptores para factores tróficos (Moon et al., 1994; Hisatsune et al., 1999)

De forma interesante, se ha detectado la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en diferentes áreas cerebrales, y asociada a modelos de plasticidad sináptica. Se ha reportado que la inducción de potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés, Long Term Potentiation) en el hipocampo incrementa el nivel de fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA (Rosenblum et al., 1996a; Rostas et al., 1996; Li et al., 2001), así como durante el aprendizaje de diferentes tareas tales como el aprendizaje espacial y el gustativo (Rosenblum et al., 1997; Mizuno et al., 2003), donde se ha observado que el entrenamiento en dichas tareas incrementa el nivel de fosforilación en tirosinas de la misma subunidad.

El principal efecto reportado de la fosforilación de NR2A o NR2B (ya sea en serinas o en tirosinas) es la regulación positiva del canal, lo que lleva a una mayor cantidad de Ca^{++} entrando a la célula tras la activación del receptor (Kohr y Seeburg, 1996; Leonard y Hell, 1997; Levine et al., 1998; Lin et al., 1998; Li et al., 2001; Liao et al., 2001). Esto podría amplificar las cascadas de señalización intracelular dependientes de la activación del receptor NMDA. Por lo tanto, un receptor con las subunidades NR2A o NR2B fosforiladas podría generar una respuesta incrementada a la estimulación, en comparación con receptores no fosforilados. Eso es altamente relevante en procesos de plasticidad, ya que el estímulo inicial (el que indujo que se fosforilaran las subunidades del receptor NMDA) produciría un efecto en la forma en que el segundo estímulo sería procesado (aquel que activa al receptor fosforilado), pudiendo ser este cambio

en la posible respuesta a un estímulo presentado con anterioridad, la base de la plasticidad y el aprendizaje.

En la CI se ha reportado que la subunidad NR2B del receptor NMDA es fosforilada en tirosinas tras el consumo de un sabor nuevo, y que esta fosforilación está altamente relacionada con el nivel de novedad familiaridad del sabor que consume el animal (Rosenblum et al., 1997). Sin embargo, los mecanismos por medio de los cuales esta fosforilación se lleva a cabo aun son desconocidos. Se ha sugerido que los mAChR podrían estar involucrados (Rosenblum et al., 1996b), lo cual es muy probable dada la participación de estos receptores en la CI en el aprendizaje gustativo (Miranda y Bermudez-Rattoni, 1998, 1999; Miranda et al., 2000; Ramirez-Lugo et al., 2003).

Se ha reportado que la proteína cinasa C (PKC) puede inducir la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA, ya sea directamente en serinas, o en tirosinas, al activar las cinasas de la familia *src* (Grosshans y Browning, 2001; Liao et al., 2001). Además, se ha reportado que la inhibición de PKC en la CI impide el aprendizaje del CAS (Yasoshima y Yamamoto, 1997).

En resumen, sabemos que el receptor NMDA juega en la CI un papel importante en el aprendizaje gustativo, sabemos además que este receptor es regulado en la CI mediante la fosforilación en tirosinas de su subunidad NR2B. Sin embargo,

no sabemos a ciencia cierta los mecanismos que subyacen dicha fosforilación ni el papel que estos mecanismos pudieran tener en el aprendizaje gustativo.

Por otra parte, la PKC parece tener un papel fundamental en el aprendizaje gustativo en la CI (Yasoshima y Yamamoto, 1997), sin embargo, aún no se ha determinado la especificidad de la participación de PKC en el aprendizaje gustativo que, como ya se mencionó, tiene principalmente dos consecuencias, ya sea que el sabor sea seguro o aversivo.

CAPÍTULO I

PAPEL DE PKC EN LA CORTEZA INSULAR EN EL APRENDIZAJE GUSTATIVO.

Antecedentes.

PKC es una enzima cinasa de serina/treonina cuya actividad se ha visto altamente implicada en procesos de aprendizaje y memoria. Esta familia de cinasas consta de 11 isoformas que se clasifican en 3 tipos: convencionales, nuevas y atípicas, con base en su dependencia de Ca^{++} y fosfolípidos para su activación. Siendo las convencionales, particularmente la $PKC\gamma$, la más reportada en procesos de aprendizaje y memoria (Angenstein y Staak, 1997).

Se ha reportado que PKC es necesaria para el aprendizaje de tareas de aprendizaje espacial como el laberinto radial y el laberinto de agua (Van der Zee y Douma, 1997; Van der Zee et al., 1997; Rossi et al., 2005).

En el caso particular del aprendizaje gustativo se ha detectado que es necesaria en la CI, el Núcleo Parabraquial (NPB) y la amígdala (Yasoshima y Yamamoto, 1997; Sacchetti y Bielavska, 1998). Además, se ha reportado que tras el aprendizaje de aversión al sabor, se observa un incremento sostenido (al menos 48 hrs) en la cantidad de esta proteína en el citoplasma de la neurona en el NPB, cabe mencionar que la PKC en citoplasma se considera inactiva, y dado que no es necesaria para la evocación del CAS este dato sugiere un papel de

esta cinasa en procesos de establecimiento de cambios plásticos a largo plazo tras este tipo de aprendizaje.

Como ya se mencionó, cuando un animal prueba un sabor nuevo lo etiqueta a grandes rasgos como seguro o aversivo con base en las consecuencias que le provocó su ingestión la primera vez. Lo anterior implica que el sabor es capaz de inducir la activación de mecanismos necesarios para aprender cualquiera de estas dos cosas.

Interesantemente, se ha reportado que la PKC tiene la capacidad de regular la función del receptor NMDA mediante fosforilación directa de sus subunidades NR2A y NR2B en serinas, o indirectamente en tirosinas al activar cinasas de la familia *src* (Grosshans y Browning, 2001; Liao et al., 2001).

Por otra parte, si bien se sabía que PKC es necesaria en la CI para el aprendizaje del CAS, hasta el momento no se sabía si PKC jugaba un papel diferencial en el aprendizaje de aversión o seguridad de un sabor ya que no existían datos acerca de la participación de esta cinasa en el aprendizaje de la AN, por lo que determinar la participación de PKC en el aprendizaje gustativo nos ayudaría en inicio a comprender como los mecanismos necesarios para 2 aprendizajes diferentes dan inicio en la CI tras el consumo de un sabor nuevo. Por otra parte, nos permitirá acercarnos posteriormente hacia los mecanismos

por medio de los cuales el receptor NMDA es regulado en la CI durante el aprendizaje gustativo.

Por lo tanto, el primer objetivo de esta tesis fue determinar si la activación de la PKC participa diferencialmente en la CI en el aprendizaje gustativo, dependiendo de si el animal aprende que un sabor es seguro o aversivo.

Hipótesis

Si PKC es necesaria en la CI para aprender si un sabor es seguro o aversivo, su inhibición afectará el aprendizaje de la AN o del CAS respectivamente.

Objetivos

- Determinar el papel de PKC en la CI en el aprendizaje de la AN
- Determinar el papel de PKC en la CI en el aprendizaje del CAS

Material y Método

Consultar la sección de material y método al final de esta tesis.

Resultados

Como Se observa en la figura 1, la inhibición de PKC con queleritrina 10mM en la CI no afecta el aprendizaje de la AN, dado que el incremento en el consumo de sacarina durante su segunda presentación es muy similar en todos los grupos. Mediante una ANOVA se observó que no había diferencia alguna entre los grupos (queleritrina n=9, vehículo n=7, intacto n=7) debida al tratamiento.

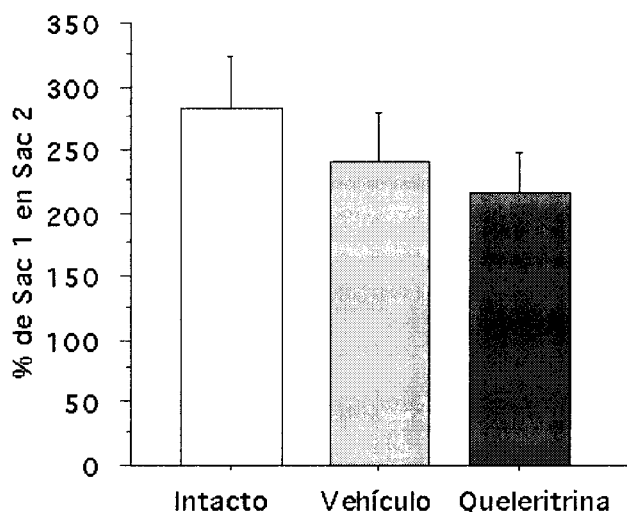
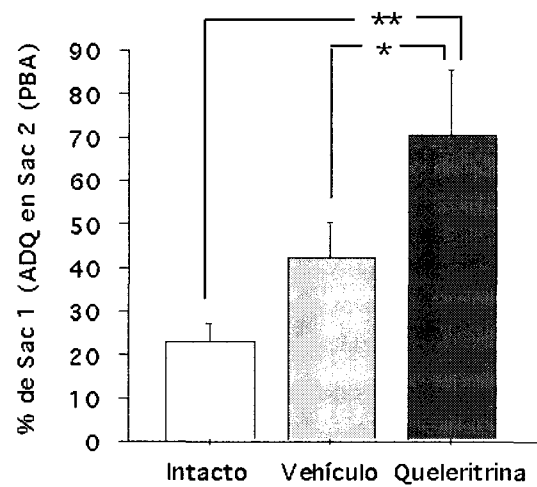


Figura 1. Efecto de la inyección en CI de queleritrina antes del primer consumo de sacarina 0.25% sobre la atenuación de la neofobia. Porcentaje del consumo de sacarina durante la segunda presentación con respecto a la consumida la primera vez.

Sin embargo, al probar la inyección del mismo fármaco en la corteza insular sobre el aprendizaje del CAS, una ANOVA muestra un efecto del tratamiento sobre esta tarea ($F_{2,20}=6.96$, $p<0.01$), como muestra la figura 2. Una prueba *post hoc* de Fisher reveló diferencias entre el grupo inyectado con queleritrina 10mM (n=6) y los controles inyectados con vehículo (n=8, $p<0.05$) y contra los controles intactos (n=9, $p<0.01$). Como se puede observar, el efecto se presenta únicamente al usar una dosis de 10mM, pero no con una dosis Más baja (5mM) (queleritrina n=8, vehículo n=6, intactos n=6), este efecto dosis-respuesta ya

había sido descrito en el NPB por el grupo de Bielavska (Sacchetti y Bielavska, 1998). Dado que los animales son capaces de presentar neofobia e inclusive atenuarla bajo el efecto de la queleritrina en la corteza insular, el efecto de este fármaco sobre el aprendizaje del CAS no se debe a que el animal no sea capaz de detectar adecuadamente el estímulo gustativo o a que sea incapaz de procesarlo.

A)



B)

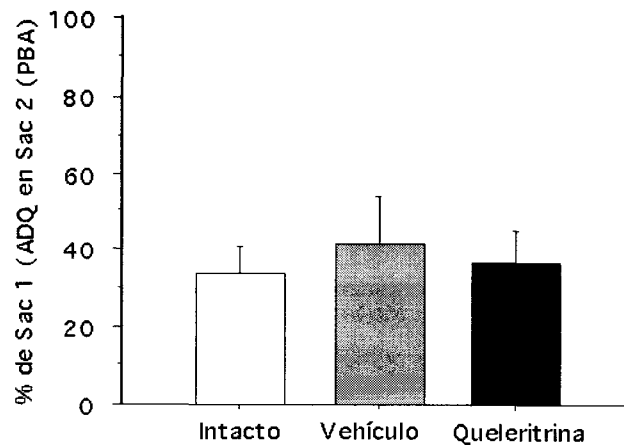


Figura 2. Efecto de la inyección en CI de queleritrina antes del consumo de sacarina sobre el aprendizaje del CAS. Porcentaje del consumo de sacarina durante la adquisición más error estándar. A) Inyección de queleritrina 5mM; B) Inyección de queleritrina 10mM.

El efecto de la inyección del inhibidor de PKC en la CI sobre el aprendizaje del CAS es específico de esta estructura, ya que la inyección de queleritrina en la corteza parietal adyacente a la corteza insular, como demostró una prueba de t no pareada, no produce déficit alguno en el aprendizaje del CAS (queleritrina n=6, vehículo n=8), como se ve en la Figura 3.

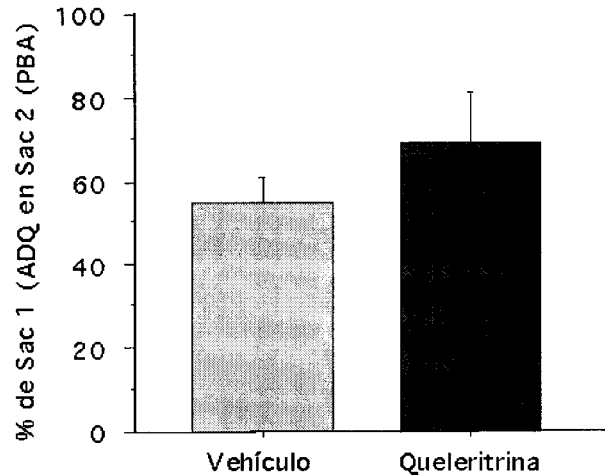


Figura 3. Efecto de la inyección de queleritrina 10mM en la corteza parietal sobre el aprendizaje del CAS.

En la figura 4 se muestran fotos representativas de los sitios de inyección en CI y corteza parietal. Se puede observar que, a pesar de la cercanía de las dos estructuras, el efecto de la inyección de queleritrina sobre el aprendizaje del CAS es distinto, lo que sugiere un papel de PKC en la CI que no se generaliza a áreas adyacentes.

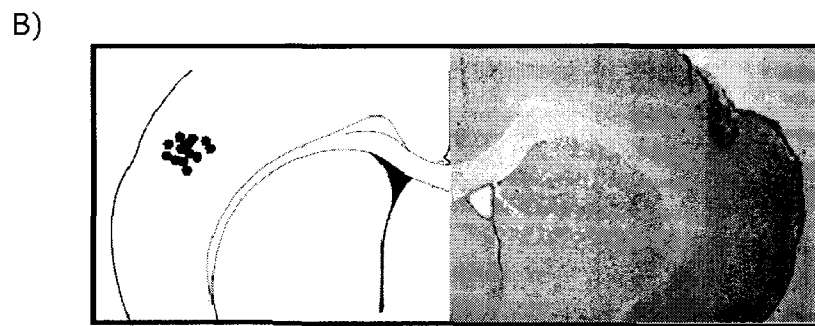
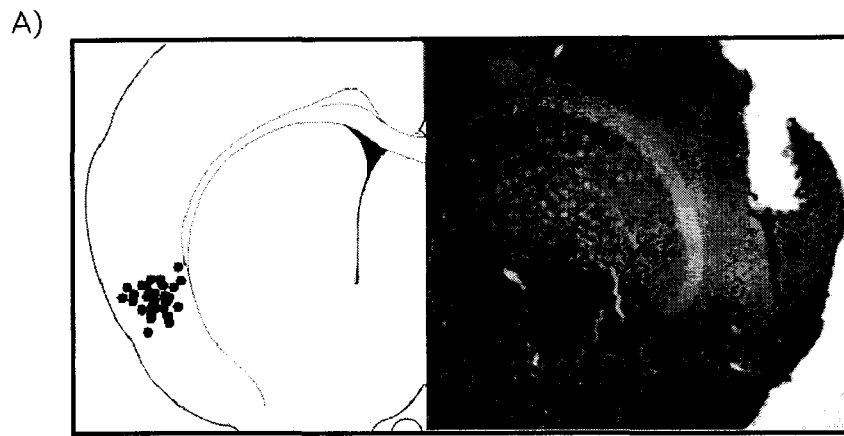


Figura 4. Fotomicrografías de los sitios de inyección en A) CI, y B) corteza parietal. A la izquierda, los puntos representan los sitios de inyección observados; a la derecha se presenta una microfotografía representativa.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Como se puede observar, la aplicación del inhibidor de PKC en la CI tiene un efecto diferencial sobre el aprendizaje gustativo, ya que afecta el aprendizaje del CAS pero deja intacto el aprendizaje de la AN. De manera que la participación de PKC en la corteza insular es necesaria para el aprendizaje de aversión, pero no de seguridad de un sabor. Adicionalmente, los controles utilizados nos permiten sugerir que el papel de PKC en la CI no es un artefacto de la dosis o la zona en la que se inyectó el fármaco, ya que la inyección de una dosis menor en la CI, o de la misma dosis en un área cercana (corteza parietal) no producen el mismo efecto.

¿Cuál pudiera ser el papel de PKC en la CI en el aprendizaje de aversión al sabor? Se sabe, como ya se mencionó, que PKC tiene la capacidad de regular, entre otros sistemas, al receptor NMDA mediante fosforilación (Grosshans y Browning, 2001; Liao et al., 2001). Se ha reportado también que PKC puede regular la actividad del receptor NMDA cambiando su localización. La inducción de LTP en rebanadas hipocámpales induce el movimiento de receptores NMDA de pozas intracelulares hacia la membrana, siendo este movimiento dependiente de la actividad de PKC (Lan et al., 2001; Grosshans et al., 2002).

Como ya se mencionó, se ha reportado la regulación por fosforilación del receptor NMDA en la CI tras el consumo de un sabor nuevo, y se ha visto que esta fosforilación podría estar ligada a la activación de receptores muscarínicos

(Rosenblum et al., 1996b; Rosenblum et al., 1997), receptores que tiene la capacidad de activar a PKC (Felder, 1995).

Dado que se ha reportado que el receptor NMDA en la CI participa, al igual que PKC, en el aprendizaje de aversión pero no en el de seguridad de un sabor (Gutierrez et al., 2003a), podría ser esta proteína la responsable de regular al receptor NMDA en la CI durante la formación de la memoria gustativa de aversión.

CAPÍTULO II

CAMBIO EN LA PRESENCIA DE LAS SUBUNIDADES NR2A Y NR2B DEL RECEPTOR NMDA EN LA FRACCIÓN DE MEMBRANA RESISTENTE A DETERGENTES (DRM) EN LA CI TRAS EL CONSUMO DE UN SABOR NUEVO.

Antecedentes

Tras los resultados obtenidos en la primera parte de la tesis, la idea inicial era determinar si el receptor NMDA era regulado en la CI por fosforilación en serinas (probablemente vía PKC) durante el aprendizaje gustativo. Sin embargo, un análisis más detallado de la metodología utilizada nos permitió observar que lo que inicialmente considerábamos como fosforilación en serinas, representaba en realidad un incremento en la cantidad de subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en una fracción membranal resistente a la acción de detergentes no iónicos, como el Nonidet P40 o el Tritón 100 (Suzuki, 2002; Abulrob et al., 2005).

Si bien estos complejos se descubrieron por su resistencia a la acción de detergentes, no es esta su única característica interesante. Se ha observado que la composición de estos complejos puede ser regulada por estímulos externos. De hecho, se ha reportado que la presencia del receptor NMDA en estos complejos incrementa tras la deprivación de oxígeno y glucosa en cultivos neuronales (modelo de hipoxia). Además, se observó que la presencia del receptor NMDA en estos complejos determina si la activación de estos

receptores induce o no la muerte de las neuronas, ya que al aplicar ciclodextrinas al medio para sustraer el colesterol de la membrana, lo que regresaba al receptor NMDA a la fracción de membrana soluble en detergentes no iónicos, las células no morían al incluir en NMDA el medio, a pesar de que la cantidad de Ca^{++} que pasaba a través del receptor no cambiaba (Abulrob et al., 2005).

Se ha reportado el movimiento lateral de receptores NMDA tras la inducción de isquemia global, o tras el bloqueo de los receptores NMDA sinápticos con MK-801, en cuyo caso se ve un movimiento de receptores de la extrasinapsis hacia la sinapsis para compensar este bloqueo (Tovar y Westbrook, 2002; Besshoh et al., 2005) así como su tráfico hacia la sinapsis desde pozas intracelulares como respuesta a la inducción de LTP en rebanadas hipocampales, o tras el entrenamiento en la tarea de prevención pasiva (Cammaraota, de Stein et al. 2000; Grosshans, Clayton et al. 2002) .

En el caso del movimiento lateral, se ha reportado que los receptores que se integran a la sinapsis provienen principalmente de sitios extrasinápticos (Tovar y Westbrook, 2002). Las implicaciones de este movimiento radican en el hecho de que los receptores NMDA en sitios extrasinápticos están acoplados a cascadas de señalización intracelular diferentes, y hasta cierto punto antagónicas a las que activan en la sinapsis, por ejemplo, los receptores NMDA

extrasinápticos inducen la inactivación de CREB, mientras que los sinápticos inducen su activación (Hardingham et al., 2002).

Dado que, como vimos en el caso del trabajo de Abulrob y colaboradores (Abulrob et al., 2005), el movimiento de estos receptores puede influir sobre las consecuencias de su activación, es presumible que aquellos eventos que produzcan un cambio en la respuesta de los receptores NMDA tengan detrás un cambio en la localización de estos receptores, ya sea al incorporarse a la sinapsis desde sitios extrasinápticos por movimiento lateral, o desde pozas intracelulares; o que salgan de la sinapsis al moverse a sitios extrasinápticos, o al ser internalizados.

En la literatura existen pocos reportes al respecto. Se ha reportado que el entrenamiento en prevención pasiva induce la inserción transitoria de nuevos receptores NMDA en la sinapsis provenientes de pozas intracelulares (Cammarota et al., 2000). En el caso de la inducción de LTD se ha reportado que lleva a una disminución en la respuesta del receptor NMDA (Montgomery y Madison, 2002). Esto último podría estar dado por un cambio en la localización del receptor, aunque hasta la fecha nadie lo ha reportado.

Por lo tanto, a lo largo del capítulo II de esta tesis se analiza este el cambio en la presencia de las subunidades NR2A y NR2B en las fracciones de membrana

resistentes a detergentes (DRM) y su relación con la novedad-familiaridad del estímulo gustativo presentado a las ratas.

Hipótesis

El consumo de un sabor nuevo genera, en la CI, un incremento en la presencia de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en DRM's.

Objetivos

-Determinar si el consumo de un sabor nuevo genera, en la CI, un incremento en la la presencia de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en los DRM en la CI, y si este cambio podría estar relacionado a la novedad-familiaridad del estímulo.

Material y Método

Consultar la sección de material y método al final de esta tesis

Resultados

Cuando las ratas probaron por primera vez sacarina 0.1% (Fig 13A) (n=13) se observó un decremento en el consumo, que incrementó nuevamente cuando el sabor se volvió familiar tras 2 o 3 presentaciones. Una ANOVA de una vía mostró un efecto de la familiaridad del sabor sobre su consumo ($F_{2,36}=13.171$, $p<0.0001$), y una prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre la primera y la segunda presentación de ($p<0.01$), así como entre la primera y la tercera presentación del sabor ($p<0.0001$).

Cuando la concentración de sacarina se incrementó a 0.25% (Fig 13B) (n=16), se observó un efecto similar. Una ANOVA de una vía mostró un efecto de la familiaridad del sabor sobre el consumo de ($F_{2,45}=32.598$, $p<0.0001$), y una prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos que probaron la sacarina 1 y 3 ($p<0.0001$).

Incremento en la presencia de NR2A y NR2B en DRMs

Como se observa en la figura 5A, el consumo de un sabor nuevo (sacarina 0.1%) produce un incremento en la presencia de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en , la cuál disminuyó cuando el sabor se convirtió en familiar después de 2 o 3 presentaciones de sacarina. Tras el primer consumo de sacarina, el nivel de NR2A detectado en DRMs se elevó a $176\% \pm 9.06\%$ (n=4) en comparación de los animales que bebieron solo agua, y disminuyó a $156.7\% \pm 16.65\%$ (n=4) y $91\% \pm 16.55\%$ del control (n=4) durante el segundo y

tercer consumo respectivamente. Una ANOVA reveló un efecto de la familiaridad del sabor sobre la presencia de NR2A en DRMs ($F_{2,9}=9.411$, $p<0.01$). Una prueba *post hoc* de Fisher reveló diferencias entre los grupos que bebieron sacarina 1 y 3 veces ($p<0.01$), así como entre los que probaron el sabor 2 y 3 veces ($p<0.05$).

Se encontraron resultados similares cuando se detectó la presencia de NR2B en DRMs. Cuando los animales probaron por primera vez la sacarina 0.1% la presencia de NR2B en DRMs incrementó a $193.7\% \pm 8.71\%$ ($n=4$) en comparación de los controles, y disminuyó a $97.2\% \pm 20.1\%$ ($n=4$) y $44.5\% \pm 10.6\%$ ($n=4$) cuando el sabor se volvió familiar tras 2 y 3 presentaciones respectivamente (Fig 5A). Una ANOVA de una vía reveló un efecto significativo de la familiaridad de la sacarina sobre la presencia de NR2B en DRMs ($F_{2,9}=29.011$, $p=0.0001$) y una prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos que bebieron sacarina 1 o dos veces ($p<0.01$), una y 3 veces ($p<0.0001$), y entre los grupos con 2 y 3 presentaciones del sabor ($p<0.05$).

Cuando se utilizó una concentración más alta de sacarina (sacarina 0.25%) se encontraron resultados muy similares (Fig 5B). Cuando las ratas bebieron sacarina 0.25% por primera vez el incremento en la presencia de NR2A y NR2B en DRMs en la CI fue de $185.6\% \pm 21.96\%$ ($n=6$) y $224.76 \pm 33.34\%$ ($n=5$) de los controles, respectivamente. Para la segunda presentación de sacarina disminuyó a $135.8\% \pm 11.36\%$ ($n=6$) para NR2A y a $157.2 \pm 38.23\%$ ($n=5$) para

NR2B. Después de la tercera presentación de sacarina 0.25% el valor disminuyó a $77.5 \pm 16.32\%$ (n=6) para NR2A y a $95 \pm 17.66\%$ (n=5) para NR2B. Una ANOVA de una vía reveló un efecto del tratamiento sobre la presencia de NR2A en DRM's ($F_{2,15}=10.007$, $p<0.01$). Una prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos que bebieron sacarina 1 y 3 ($p<0.01$), así como entre los que la probaron 2 y 3 veces ($p<0.05$). Para el caso de NR2B, la ANOVA reveló un efecto de la familiaridad sobre la presencia de esta proteína en DRM's ($F_{2,12}=4.378$, $p<0.05$), y la prueba *post hoc* de Fisher reveló una diferencia significativa entre los grupos con 1 o 3 presentaciones de sacarina ($p<0.05$).

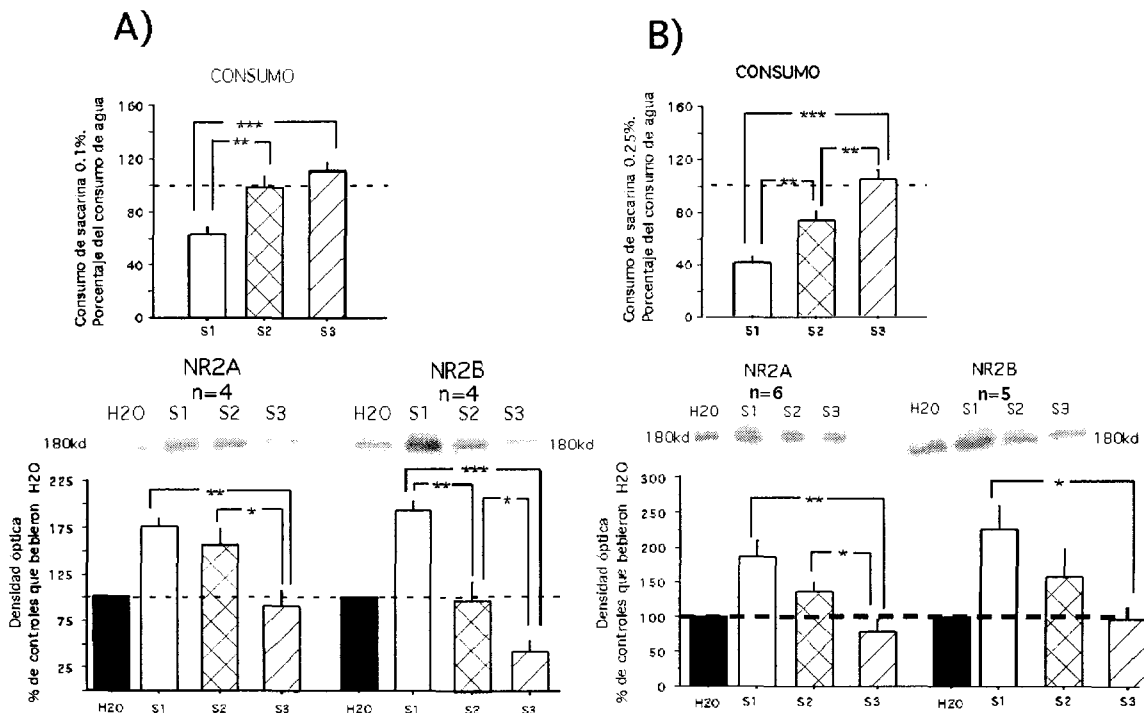


Figura 5. El consumo de un sabor nuevo induce neofobia y la familiaridad del mismo induce su atenuación, de manera similar el consumo de un sabor nuevo induce un incremento en las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en los DRM's, que va disminuyendo conforme el sabor se hace familiar con sacarina 0.1% (A) o 0.25% (B). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.0001$.

Este cambio no se debió a que cambiara la cantidad de proteína de NR2A o NR2B a lo largo de los tres días estudiados o como efecto del consumo de sacarina, ya que la cantidad de proteína de estas subunidades no cambia (Fig 6).

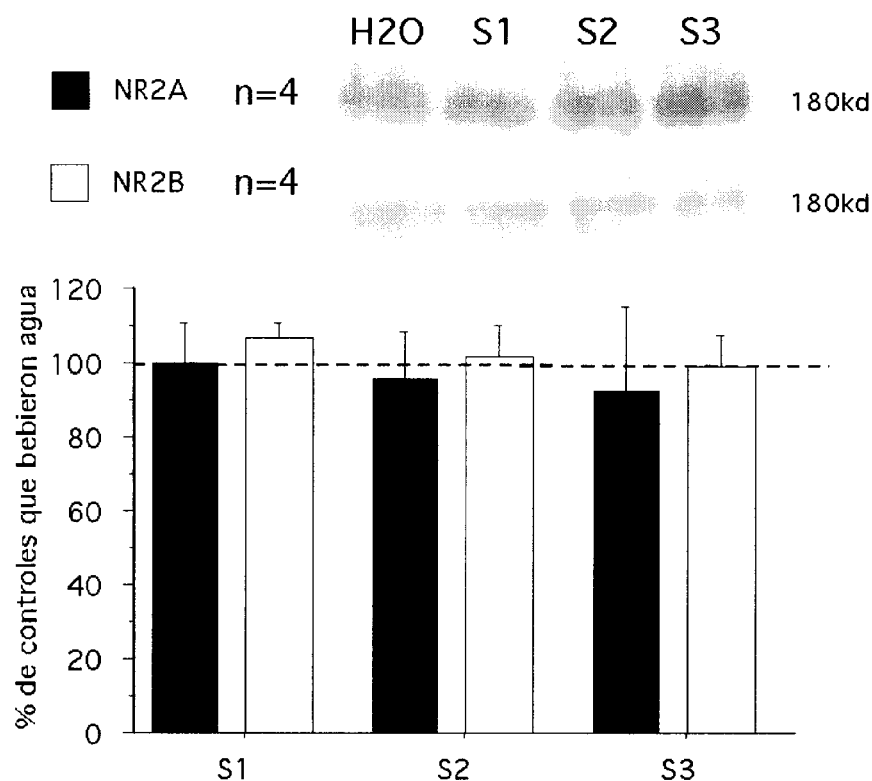


Figura 6. Proteína total de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la corteza insular tras el consumo de sacarina nueva, sacarina en su segunda presentación y sacarina en su tercera presentación. Porcentaje de la cantidad de proteína total en el grupo de animales con presentación de agua.

En contraste a lo observado en CI, no se observó el mismo incremento en la presencia de NR2B en DRMs en la corteza parietal adyacente (Fig 7). En un grupo de 4 ratas observamos que, mientras en la CI la presencia de NR2B incrementó a $290.5\% \pm 53.41\%$ de los controles tras el consumo de un sabor nuevo ($n=4$), en la corteza parietal este valor alcanzó el $138.7\% \pm 28.09\%$ ($n=4$)

del observado en los controles. Una prueba de t no pareada reveló una diferencia significativa en la presencia de NR2B en DRMs en las dos estructuras ($p < 0.05$).

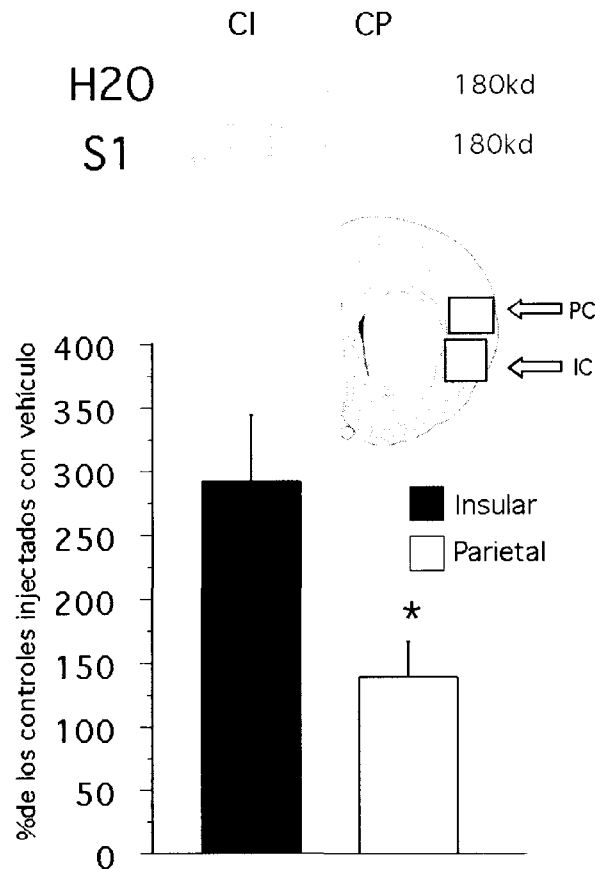


Figura 7. El incremento en NR2B en la corteza insular tras el consumo de un sabor nuevo no es observable en la corteza parietal adyacente. $*p < 0.05$. PC, corteza parietal; IC, corteza insular.

La siguiente interrogante a resolver fue el determinar los mecanismos por medio de los cuáles se lleva a cabo este fenómeno. Dada la importancia del sistema colinérgico en la corteza insular tanto en el procesamiento de la novedad de sabor, como en diferentes modelos de aprendizaje gustativo (Rosenblum, Berman et al. 1996; Rosenblum, Berman et al. 1997; Berman, Hazvi et al. 1998; Miranda, Ramirez-Lugo et al. 2000; Gutierrez, Rodriguez-Ortiz et al. 2003), el

siguiente paso fue determinar el papel de estos receptores en el incremento de NR2A y NR2B en DRM's. Como se puede observar en la figura 8, el bloqueo de los receptores muscarínicos (n=5) en la CI reduce considerablemente la presencia de NR2A y NR2B en DRM en la corteza insular como consecuencia del consumo de un sabor nuevo.

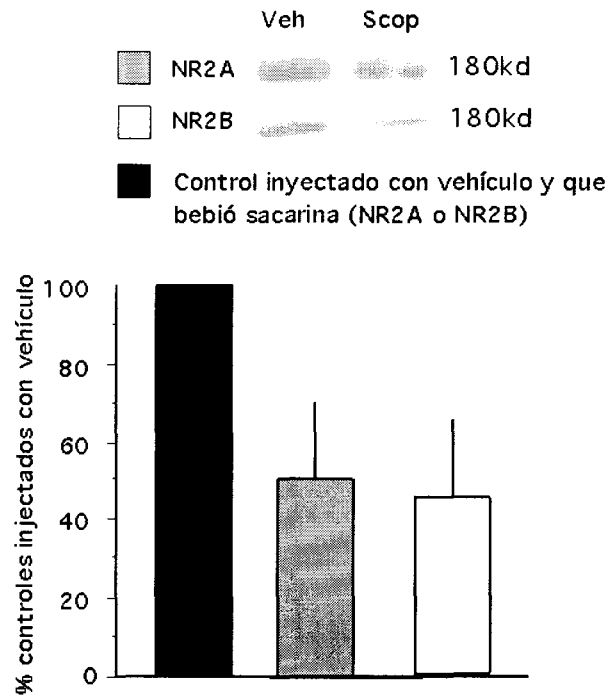


Figura 8. Efecto de la inyección intracortical de escopolamina sobre el incremento en complejos pesados de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la corteza insular desencadenada por el consumo de un sabor nuevo. Porcentaje de la subunidad detectada en animales que consumieron sacarina y fueron inyectados con vehículo más error estándar.

Como se mencionó anteriormente, una de las principales vías de transducción de señales activada por los mAChR es la vía de PKC (Felder, 1995; Rossi et al., 2005), además, se ha reportado el papel de PKC en la relocalización de receptores NMDA como consecuencia de diferentes tipos de estimulación (Lan et al., 2001; Grosshans et al., 2002). Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar el papel de PKC en el incremento de las subunidades NR2A y NR2B del

receptor NMDA en DRM's en la CI después del consumo de un sabor nuevo. Como se observa en la figura 9, a pesar de que la el número de geles es muy pequeño (2 para NR2A y 3 para NR2B), se alcanza a observar un importante efecto de la inhibición de PKC sbre este fenómeno.

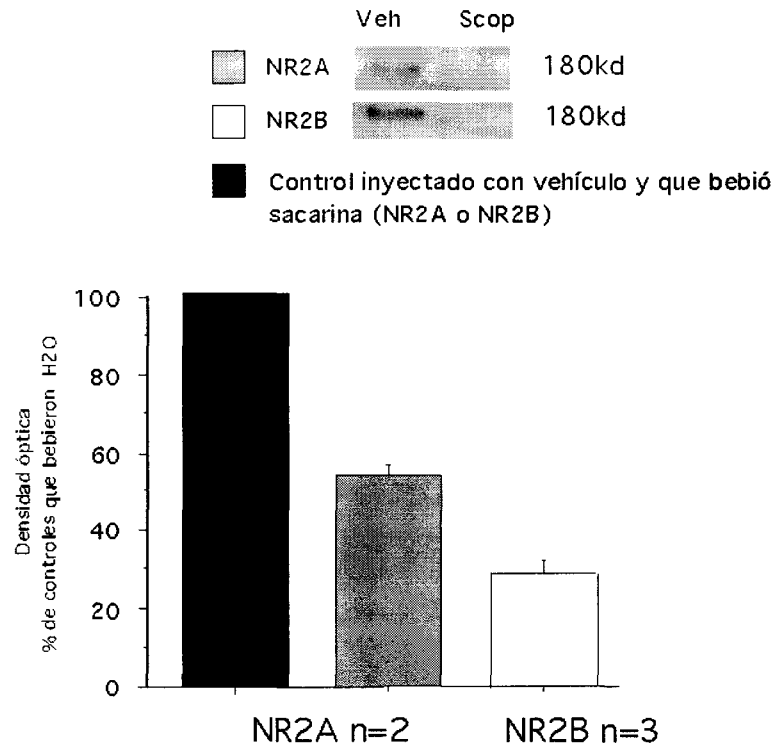


Figura 9. Efecto de la inyección intracortical de quelicitrina sobre sobre el incremento en complejos pesados de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la corteza insular desencadenada por el consumo de un sabor nuevo. Porcentaje de la subunidad detectada en animales que consumieron sacarina y fueron inyectados con vehículo más error estándar.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

Con base en los experimentos mostrados a lo largo del capítulo II podemos concluir que el consumo de un sabor nuevo produce en la CI un incremento de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en los DRM. Este incremento está estrechamente relacionado con el nivel de familiaridad del estímulo gustativo, ya que tras al segunda y tercera presentación del sabor, la presencia de estas subunidades en DRM's disminuyó considerablemente. Este incremento no se da en la corteza parietal adyacente, y no se debe a un cambio en la cantidad total de proteína de esta subunidades, ya que esta no presenta cambios a lo largo de los 3 días de presentaciones de sacarina. Por otra parte, este fenómeno depende de la actividad de los mAChR, ya que su bloqueo disminuye considerablemente. De una manera similar, este fenómeno parece depender de la actividad de PKC, ya que su inhibición tiende a disminuir la presencia de NR2A y NR2B en DRM's tras el consumo de un sabor nuevo.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES.

El consumo de un sabor nuevo induce en la corteza insular mecanismos involucrados con la capacidad del animal de aprender algo de ese sabor. Hasta ahora se había reportado en esta corteza la activación de diferentes cinasas y la fosforilación del receptor NMDA, así como mecanismos relacionados con el control de la expresión de genes tales como la acetilación de histonas (Rosenblum, Berman et al. 1997; Berman, Hazvi et al. 1998; Swank y Sweatt 2001). En esta tesis se reportan datos nuevos acerca de la modulación de señales intracelulares asociadas al aprendizaje del CAS que se pueden resumir en los siguientes puntos:

-El bloqueo de PKC en la corteza insular impide el aprendizaje del CAS, pero no de la atenuación de la neofobia.

-Las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA se ven incrementadas en la fracción de DRM's en la corteza insular tras el consumo de un sabor nuevo. Este fenómeno parece estar relacionado con el aprendizaje de aversión al sabor, más no con el etiquetamiento de ese sabor como seguro (atenuación de la neofobia).

-El bloqueo de los receptores muscarínicos de acetilcolina en la corteza insular interfiere con el incremento de la subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la fracción DRM de la membrana, presentada tras el consumo de un sabor nuevo.

-La inhibición de PKC en la CI produce un efecto similar al de la escopolamina sobre el incremento de NR2A y NR2B en DRMs, es decir, interfiere con dicho proceso.

En resumen, el consumo de un sabor nuevo genera en la corteza insular la activación de diferentes mecanismos intracelulares involucrados con el procesamiento del estímulo gustativo para formar una memoria del sabor. Entre los mecanismos que participan dentro de la CI en la formación de la memoria gustativa se encuentra la cinasa PKC, que juega en la CI un papel diferencial en el establecimiento de una memoria segura o aversiva de un estímulo gustativo, siendo indispensable para el aprendizaje del CAS pero no para el aprendizaje de la atenuación de la neofobia.

Dado que se sabe que el receptor NMDA, al igual que PKC, es necesario en la CI para el aprendizaje del CAS pero no para el de la AN (Gutierrez et al., 1999; Gutierrez et al., 2003a), podría ser que hubiese una interacción entre PKC y el receptor NMDA.

Se sabe que PKC puede regular la actividad del receptor NMDA al fosforilar sus subunidades, ya sea directamente en serinas (Liao et al., 2001) o induciendo la fosforilación en tirosinas de sus subunidades (Grosshans y Browning, 2001). Se sabe también que la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del receptor

NMDA incrementa la conducción de Ca^{++} a través del canal cuando el receptor es activado (Lan et al., 2001; Liao et al., 2001).

La primera parte de esta tesis sugería que uno de los papeles de PKC en la CI en el aprendizaje del CAS podría ser la regulación de la actividad del receptor NMDA. Dado que un mecanismo por medio del PKC puede regular este receptor directamente es mediante la fosforilación en serinas de sus subunidades NR2A y NR2B (Liao et al., 2001) el objetivo inicial de la segunda fase de la tesis fue determinar la presencia de fosforilación en serinas de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la CI tras el consumo de un sabor nuevo aunque, como ya se mencionó, encontramos un fenómeno muy interesante, es decir, el incremento de subunidades del receptor NMDA en DRM's.

Procedimos a determinar algunos de los mecanismos involucrados en el incremento de las subunidades NR2A y NR2B en DRM's en la corteza insular tras el consumo de un sabor nuevo, y encontramos que este proceso requería de la actividad de los mAChR y de PKC.

Como ya se mencionó, el incremento en las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en DRMs está fuertemente relacionado con el nivel de novedad-familiaridad del estímulo gustativo, siendo más fuerte cuando el sabor es nuevo y más débil cuando el sabor se vuelve familiar. Lo anterior podría sugerir que

este mecanismo está involucrado en el aprendizaje de atenuación de la neofobia, ya que el consumo de un sabor es menor cuando es nuevo e incrementa conforme se vuelve familiar, en una relación inversa con respecto a la presencia de estas subunidades en DRMs. Sin embargo, se ha reportado que el receptor NMDA no es necesario para el aprendizaje de la atenuación de la neofobia (Gutierrez et al., 2003a), por lo que es poco probable que la regulación de este receptor sea necesaria para este aprendizaje.

Por otra parte, dado que el receptor NMDA sí es necesario en la CI para el aprendizaje del CAS (Gutierrez et al., 1999; Ferreira et al., 2002), y que la inhibición de PKC en esta estructura afecta tanto el aprendizaje del CAS como el incremento de las subunidades NR2A y NR2B en DRMs en esta misma corteza, es muy probable que dicho incremento de subunidades juegue un papel importante en el aprendizaje de aversión al sabor.

En la figura 10 se muestra el esquema general de lo que hasta ahora se sabe sucede en la CI cuando un animal consume un sabor nuevo. El probar un sabor nuevo induce en la CI un incremento significativo en la liberación de Ach proveniente del Nucleo Basal Magnocelular (NBM), la cuál estimula los mAChR en la postsinapsis, siendo esta activación indispensable para el aprendizaje gustativo (tanto de la AN como del CAS) (Gutierrez et al., 2003b). Entre otras acciones que se atribuyen a la activación de los mAChR están la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA (Rosenblum et al., 1996b), y la

activación de PKC (Felder, 1995). En esta tesis se describe como el consumo de un sabor nuevo genera también un incremento en la presencia de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en DRM's en la CI. Estos mecanismos son desencadenados por el consumo del sabor nuevo, independientemente de las consecuencias que tenga para el organismos, formando un trazo de memoria del sabor (TMS) seguro. Si el animal no percibe un señales de toxicidad del alimento consumido, se establecerá una memoria en el sentido de que es seguro consumir ese sabor.

Sin embargo, si el consumo de ese sabor nuevo produce alguna señal de toxicidad, se producirá un incremento en la liberación de glutamato proveniente d ela amígdala basolateral (Miranda et al., 2002), que estimulará a los receptores NMDA, indispensables para la formación de la memoria del CAS, produciendo cambios hasta ahora no descritos en su totalidad que permitan que, en la CI, el trazo de memoria del sabor se convierta en un TMS aversivo y se forme una memoria de aversión al sabor (Bermudez-Rattoni et al., 2005).

Como se puede observar, el consumo de un sabor nuevo genera en la CI la regulación de la actividad del receptor NMDA por forforilación en tirosinas (Rosenblum et al., 1997) y al incrementar su presencia en DRM's. Sin embargo, para el aprendizaje de la AN no es necesaria la activación de este receptor (Gutierrez et al., 2003a), sino que se requiere para el aprendizaje del CAS (Ferreira et al., 2002).

Interesantemente, en el momento en que el estímulo gustativo induce el incremento de receptores NMDA en DRM's en la CI, así como su fosforilación en tirosinas, la señal que hace la diferencia entre la atenuación de la neofobia y el CAS, es decir, la inyección de LiCl, aún no está presente (Rosenblum et al., 1995; Rosenblum et al., 1997) y es imposible que el sistema sepa *a priori* de la llegada de este estímulo, de manera que, esta es una evidencia bioquímica de que, dada la importancia del aprendizaje del CAS para la sobrevivencia del organismo, el sistema se “prepara” para que, en caso de que el alimento consumido resulte tóxico, el organismo sea capaz de recordarlo.

Además, integrando los resultados de la primera parte de esta tesis, PKC podría tener una participación importante en la regulación del receptor NMDA en la CI durante el aprendizaje gustativo ya que, tal como parece ser el caso del incremento en la presencia de subunidades del receptor NMDA en DRM's, participa en el aprendizaje del CAS. Por otra parte, se sabe que PKC puede inducir tanto la fosforilación (Grosshans y Browning, 2001) como la relocalización del receptor NMDA (Grosshans et al., 2002). En este último caso, se describió el movimiento de subunidades del receptor NMDA de pozas intracelulares a la superficie de la membrana como consecuencia de la inducción de LTP. Lo anterior refuerza la idea de la participación de la regulación de la actividad del receptor NMDA por relocalización, en el desarrollo de fenómenos plásticos, en este caso en la inducción de LTP.

Ya ha sido propuesto que el receptor NMDA juega un papel fundamental en la corteza insular en la integración del estímulo aversivo (LiCl) con el estímulo gustativo (Bermudez-Rattoni, 2004), de manera que esta modulación de receptores NMDA podría modificar la forma en como responderían las células en la corteza insular a la llegada de la señal originada por la inyección de LiCl como estímulo incondicionado, integrando de esta forma la señal del estímulo gustativo con la señal del LiCl, como se propone en la figura 10.

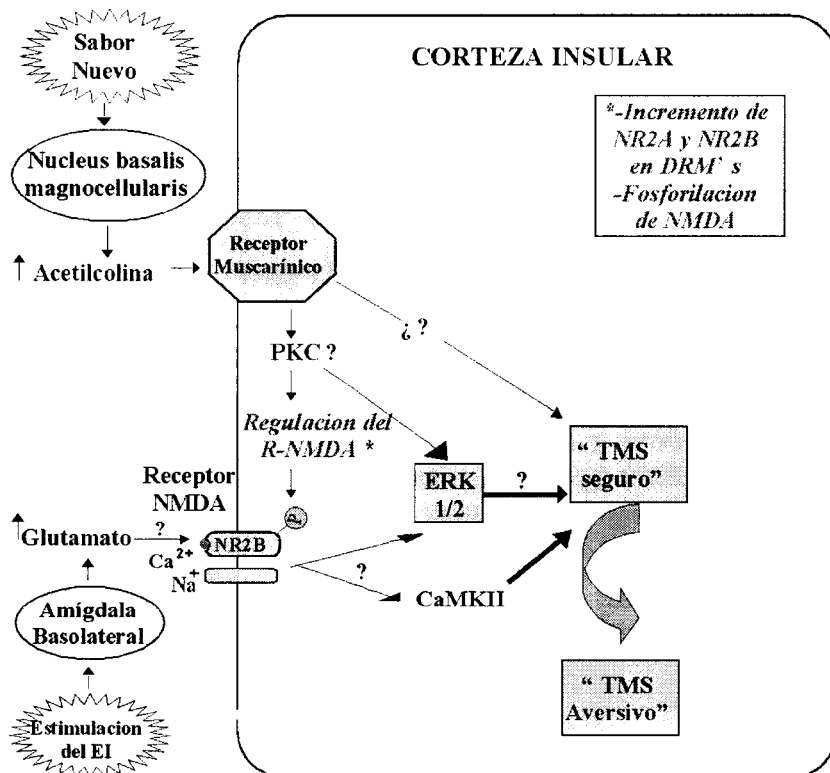


Figura 10.- Esquema que muestra como la regulación del receptor NMDA por fosforilación, o al incrementar su presencia en DRMs podría estar afectando la forma en la cual, la CI procesa la información del estímulo incondicionado durante la formación de la memoria del CAS (modificado de Bermúdez-Rattoni et al, 2005).

En la literatura ya se ha reportado que la activación de receptores NMDA genera una respuesta diferente dependiendo de la localización de este receptor en

diferentes zonas de la membrana, por ejemplo, se ha reportado que la activación de receptores NMDA en la extrasinapsis activa vías de señalización no solo diferentes, sino incluso antagónicas a las que activa dentro de la sinapsis dado que, por ejemplo, la activación de receptores NMDA sinápticos incrementa la actividad de CREB, los receptores NMDA extrasinápticos la disminuyen (Hardingham et al., 2002).

Si bien no existen muchos reportes acerca del papel del receptor NMDA dentro de los DRM's, sí se ha reportado que su presencia en estos complejos cambia las consecuencias que tiene la activación de este receptor. Se ha observado, en un modelo *in vitro* de hipoxia, que la deprivación de oxígeno y glucosa produce el movimiento de receptores NMDA a la fracción de la membrana no soluble en detergentes (en esta tesis descritos como DRM's), y que este cambio incrementa la toxicidad de la activación de estos receptores con NMDA, provocando la muerte de las neuronas. Sin embargo, al disgregar estos complejos el receptor NMDA aparece nuevamente en la fracción de membrana soluble a detergentes, y la aplicación de NMDA no produce la muerte de las neuronas, a pesar de que la conductividad de Ca^{++} a través del receptor no se ve alterada (Abulrob et al., 2005).

Por lo tanto, a nivel intracelular esta modulación de receptores NMDA determinaría el tipo de moléculas efectoras que traducirán la señal llevada por el

neurotransmisor y generarán diferentes efectos tales como fosforilación de diferentes proteínas y la expresión de diferentes genes.

Hasta el momento se ha reportado ampliamente la movilidad del receptor NMDA tras diferentes tipos de estímulos, como la estimulación del receptor TRKB (Elmariah et al., 2004), o el bloqueo de los receptores NMDA (Tovar y Westbrook, 2002).

Acerca de la identidad de estos complejos pesados a los cuales se están incorporando las subunidades del receptor NMDA, se ha reportado que estos DRMs pueden ser subfraccionados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (Suzuki, 2002), y se ha descrito la distribución diferencial de varias proteínas en diferentes fracciones de este gradiente (Hering et al., 2003), e incluso el movimiento de receptores NMDA entre las diferentes fracciones de este gradiente como consecuencia de la reperfusión de sangre tras la inducción de hipoxia (Besshoh et al., 2005).

A nivel más macroscópico, este incremento de receptores en DRM's podría ser una forma en la que el sistema procesa diferencialmente estímulos involucrados con conductas diferentes mediante el mismo sistema de neurotransmisión en la misma área. Por ejemplo, los receptores NMDA en la corteza insular han sido involucrados en el aprendizaje gustativo y en el aprendizaje espacial (Gutierrez et al., 1999). Evidentemente en cada tipo de aprendizaje se encuentran

involucradas otras estructuras cerebrales regulando la integración de la información, pero a nivel local, una forma en la que el mismo receptor puede estar desencadenando diferentes efectos a nivel intracelular dependiendo del tipo de conducta que generó su activación, es la localización del receptor NMDA en diferentes compartimentos intracelulares donde puede desencadenar diferentes efectos tras su activación. Sin embargo, estas son teorías que requerirán de estudios en un futuro para poder determinar su factibilidad.

METODOLOGÍA.

Se utilizaron para todos los experimentos ratas macho de la cepa wistar con un peso de 280-310g al inicio del procedimiento experimental, provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las ratas son mantenidas en un ciclo de 12h luz 12h oscuridad con acceso a comida y agua *ad libitum*, a excepción de lo indicado durante los procedimientos conductuales, los cuales fueron realizados durante la fase de luz.

Procedimientos conductuales.

Para la obtención de muestras de novedad-familiaridad de la sacarina.

Las ratas fueron privadas de agua durante 24 horas, tras las cuales se les permitió el acceso al agua durante 15 minutos al día durante 3 días. El cuarto día se les presentó una solución de sacarina (0.1% ó 0.25%, según el grupo). Para cada concentración se tuvieron 4 grupos, un grupo fue sacrificado 15 minutos después de su primer consumo de sacarina, al segundo grupo se le dió nuevamente sacarina el día 5 y se sacrificó 15 minutos después de su segunda presentación de sacarina, y el tercer grupo fue sacrificado 15 minutos después de su tercera presentación de sacarina el día 6. Adicionalmente, a un grupo de animales se les dio agua el día 4 y fueron sacrificados 15 minutos después.

Condicionamiento Aversivo a los Sabores.

El cuarto día el agua es sustituida por una solución de sacarina al 0.1%, 15 minutos después de que se les retira la sacarina, las ratas reciben una inyección

de LiCl 0.4M (9.37ml/kg de peso). Los días 5 y 6 las ratas tienen nuevamente acceso al agua por 15 minutos. El día 7 (prueba) se les presenta nuevamente sacarina.

Atenuación de la neofobia.

El día 4 el agua es reemplazada por una solución de sacarina al 0.25%, después de la cual los animales tienen acceso al agua durante 15 minutos para evitar la deshidratación que puede producirse dado el bajo consumo de sacarina a esta concentración. El procedimiento del día 4 se repite durante 3 días más.

Extracción de la muestra.

Los animales fueron decapitados 15 minutos después de terminar el tratamiento (consumo de sacarina) y el cerebro fue removido y colocado en solución salina (NaCl 0.15M) fría. La corteza insular es extraída y homogeneizada en buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sodio y un cocktail de inhibidores de proteasas (kit de inmunoprecipitación, ROCHE)). Se realizó una medición de proteínas con el método de Lowry.

Aislamiento de DRM's.

Se preincubó el anticuerpo contra serinas fosforiladas (3 μ l, SIGMA) con 50 μ l de proteína G (kit de inmunoprecipitación, ROCHE) y 200 μ l de buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sodio y un cocktail de inhibidores de proteasas (kit de inmunoprecipitación,

ROCHE)) durante 4 horas a 4°C. Se cuantificó la concentración de proteínas en la muestra mediante el método de Lowry y se tomaron 2000µg de proteína, llevándolo el volumen total a 500µl con buffer de lisis. Se hicieron 5 lavados de 15 minutos cada uno a 4°C. 2 lavados con el buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sodio y un cocktail de inhibidores de proteasas (kit de inmunoprecipitación, ROCHE)), 2 lavados con buffer 2 (50mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% Nonidet P40 y 0.5% de deoxicolato de sodio), y un lavado con buffer 3 (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet P40 y 0.5% deoxicolato de sodio). Tras cada lavado las muestras fueron centrifugadas a 12000G durante 1 minuto, el sobrenadante fue desechado y se agregaron 200 µl del buffer correspondiente para el siguiente lavado. Después del último lavado el sobrenadante fue desechado y se le agregaron al *pellet* 25µl de laemli buffer (BioRad) con 5% de β-mercaptotanol (SIGMA). El pellet es reincorporado y las muestras se centrifugan nuevamente.

SDS-PAGE.

Se cargan 20 µl del sobrenadante obtenido tras la última centrifugación en cada carril de un gel de acrilamida al 7.5% y se corre a 60 V durante 3 horas y media. En el caso de los geles para los que se utilizó homogenadoo total de la corteza insular, se cargaron 80 µg de proteína por carril en un volumen igual de buffer de carga (laemli buffer con 5% de β-mercaptotanol). Al terminar de correr, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Al día siguiente se bloquea la membrana en BSA al 0.1% en PBS (NaCl 0.13M, Na₂HPO₄ 0.015M

y KH_2PO_4 0.014M) con 1% de Tween 20 (PBS-Tween). Posteriormente se incubaba con el primer anticuerpo (contra la subunidad NR2B, 1:500, Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4°C. Después se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBS Tween y se incubaba el segundo anticuerpo (IgG anti-cabra 1:10000, Jackson) durante 1 hora. Le siguen 2 lavados con PBS Tween y un lavado con PBS. Al terminar los lavados, las membranas se incuban en reactivo de quimioluminiscencia (Pierce) durante 20 minutos y la señal es detectada en una placa fotográfica.

Para el análisis de densidad óptica, la película se digitaliza y se analiza con ayuda del programa Image J. Se selecciona un área idéntica con la cual se midió la densidad de píxeles de todas las bandas. El tamaño del área con la cuál se midió la densidad de píxeles fue determinado por la banda más grande, sin permitir que fuera tan grande como para abarcar más de una banda a la vez. Los datos de densidad óptica arrojados por el programa fueron convertidos en porcentajes del control que bebió agua en el caso de los grupos que no fueron canulados, y en porcentaje de los controles que fueron inyectados con vehículo y bebieron sacarina en el caso de los grupos que fueron canulados. Esto último fue con la finalidad de homogenizar el rango en que se encontraban los valores de densidad óptica arrojados por el programa, y poder hacer promedios de los geles.

Después del revelado las membranas fueron lavadas durante 45 minutos con PBS-Tween para eliminar la señal de la inmunodetección comntra NR2B (se realizaron los controles correspondientes para determinar que la señal desapareciera con este tratamiento). Tras lo cual fueron incubadas con un anticuerpo contra la subunidad NR2A (1:500, Santa Cruz biotechnology) y se siguió el procedimiento descrito para la subunidad NR2B.

Implantación de cánulas.

Para poder realizar las manipulaciones farmacológicas en la corteza insular con el animal despierto (con la finalidad de estudiar la conducta) se implantaron cánulas dirigidas a esta estructura.

Para la implantación de cánulas las ratas fueron anestesiadas con halotano. Una vez bajo los efectos de la anestesia se les implantaron cánulas bilaterales 2.5 milímetros arriba de la corteza insular con base en las coordenadas de Paxinos (Paxinos y Watson, 1986) AP=+1.2, LAT=±5.5, DV= -3 con respecto a Bregma. Las cánulas son fijadas al cráneo con cemento dental y 2 tornillos.

Microinyecciones.

Las ratas recibieron la inyección del fármaco (ver abajo) o vehículo 20 minutos antes de consumir el sabor novedoso. Las inyecciones se hacen a través de una aguja dental que baja hasta la coordenada de corteza insular (DV=-5.5), la aguja se encuentra conectada a una bomba de microinfusión a través de una tubería

de polietileno. Se les inyecta un volumen de 1 μ l por lado en un tiempo total de 2 minutos de escopolamina 156mM en ringer (NaCl 118mM, KCl 4.7mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, CaCl₂ 2.5mM, NaHCO₃ 19mM y Glucosa 3.3mM), queleritina 10mM en H₂O, o el vehículo correspondiente, se dejaron pasar 2 minutos adicionales antes de retirar la aguja para permitir una mejor difusión del fármaco.

REFERENCIAS.

- Abulrob A, Tauskela JS, Mealing G, Brunette E, Faid K, Stanimirovic D (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem* 92:1477-1486.
- Angenstein F, Staak S (1997) Receptor-mediated activation of protein kinase C in hippocampal long-term potentiation: facts, problems and implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:427-454.
- Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y (1998) Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci* 18:10037-10044.
- Bermudez F, Quirarte G, Prado R (2001) Pavlov y sus perros. In: *Memoria. Donde reside y como se forma.* (Bermudez F, ed), pp 71-84. México: Trillas.
- Bermudez-Rattoni F (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5:209-217.
- Bermudez-Rattoni F, McGaugh JL (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res* 549:165-170.
- Bermudez-Rattoni F, Nunez-Jaramillo L, Balderas I (2005) Neurobiology of Taste-recognition Memory Formation. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i156-i157.
- Besshoh S, Bawa D, Teves L, Wallace MC, Gurd JW (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-

- synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 93:186-194.
- Braun JJ (1990) Gustatory Cortex: Definition and Function. In: *The cerebral cortex of the rat* (Kolb B, Tees RC, eds). Cambridge, Massachusetts: The MIT Press.
- Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T (1998) *Conditioned Taste Aversion. Memory of a Special Kind*: Oxford University Press.
- Buresova O, Bures J (1980) Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats. *Behav Brain Res* 1:299-312.
- Cammarota M, de Stein ML, Paratcha G, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2000) Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. *Neurochem Res* 25:567-572.
- Domjan M (1976) Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 2:17-27.
- Elmariah SB, Crumling MA, Parsons TD, Balice-Gordon RJ (2004) Postsynaptic TrkB-mediated signaling modulates excitatory and inhibitory neurotransmitter receptor clustering at hippocampal synapses. *J Neurosci* 24:2380-2393.
- Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J* 9:619-625.
- Fernandez J, Bermúdez F (2001) Clasificación de la memoria. In: *Memoria. Donde reside y como se forma* (Bermúdez F, ed), pp 11-25. Mexico: Trillas.
- Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez-Rattoni F (2002) Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 16:1139-1145.

- Goebel DJ, Poosch MS (1999) NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69:164-170.
- Grosshans DR, Browning MD (2001) Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurochem* 76:737-744.
- Grosshans DR, Clayton DA, Coultrap SJ, Browning MD (2002) LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat Neurosci* 5:27-33.
- Gutierrez H, Hernandez-Echeagaray E, Ramirez-Amaya V, Bermudez-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.
- Gutierrez R, Tellez LA, Bermudez-Rattoni F (2003a) Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* 17:1556-1562.
- Gutierrez R, Rodriguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Núñez-Jaramillo L, Bermudez-Rattoni F (2003b) Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 80:323-331.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
- Hering H, Lin CC, Sheng M (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23:3262-3271.

- Hisatsune C, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T (1999) Phosphorylation-dependent interaction of the N-methyl-D-aspartate receptor epsilon 2 subunit with phosphatidylinositol 3-kinase. *Genes Cells* 4:657-666.
- Jodar L, Kaneto H (1995) Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn J Pharmacol* 68:359-387.
- Kohr G, Seeburg PH (1996) Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol* 492 (Pt 2):445-452.
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (2001) Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci* 4:382-390.
- Leonard AS, Hell JW (1997) Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 272:12107-12115.
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10235-10239.
- Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12742-12747.
- Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP (2001) Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol* 59:960-964.

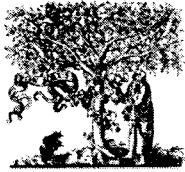
- Lin SY, Wu K, Levine ES, Mount HT, Suen PC, Black IB (1998) BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res* 55:20-27.
- Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB (1997) The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* 51:79-86.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.
- Meisami M (1991) Chemoreception. In: *Neural and integrative animal physiology*, pp 335-434. USA: Wiley-Lyss.
- Miranda MI, Bermudez-Rattoni F (1998) Acetylcholine determination of microdialysates of fetal neocortex grafts that induce recovery of learning. *Brain Res Brain Res Protoc* 2:215-222.
- Miranda MI, Bermudez-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 U S A* 96:6478-6482.
- Miranda MI, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 882:230-235.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11417-11422.

- Mizuno M, Yamada K, He J, Nakajima A, Nabeshima T (2003) Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* 10:108-115.
- Montgomery JM, Madison DV (2002) State-dependent heterogeneity in synaptic depression between pyramidal cell pairs. *Neuron* 33:765-777.
- Moon IS, Apperson ML, Kennedy MB (1994) The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3954-3958.
- Ormsby CE, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F (1998) Long-term memory retrieval deficits of learned taste aversions are ameliorated by cortical fetal brain implants. *Behav Neurosci* 112:172-182.
- Ramirez-Lugo L, Miranda MI, Escobar ML, Espinosa E, Bermudez-Rattoni F (2003) The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 79:184-193.
- Reilly S (1999) The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res Bull* 48:239-254.
- Rosenblum K, Dudai Y, Richter-Levin G (1996a) Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10457-10460.
- Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Dudai Y (1996b) Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *Neuroreport* 7:1401-1404.
- Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* 17:5129-5135.

- Rosenblum K, Schul R, Meiri N, Hadari YR, Zick Y, Dudai Y (1995) Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1157-1161.
- Rossi MA, Mash DC, deToledo-Morrell L (2005) Spatial memory in aged rats is related to PKC γ -dependent G-protein coupling of the M1 receptor. *Neurobiol Aging* 26:53-68.
- Rostas JA, Brent VA, Voss K, Errington ML, Bliss TV, Gurd JW (1996) Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10452-10456.
- Sacchetti B, Bielavska E (1998) Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat. *Brain Res* 799:84-90.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87:2052-2063.
- Schafe GE, Bernstein IL (1998) Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion. II. Insular (gustatory) cortex. *Brain Res* 800:40-47.
- Suzuki T (2002) Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci Res* 44:1-9.

- Swank MW, Sweatt JD (2001) Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J Neurosci* 21:3383-3391.
- Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34:255-264.
- Van der Zee EA, Douma BR (1997) Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:379-406.
- Van der Zee EA, Luiten PG, Disterhoft JF (1997) Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:531-572.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* 65:123-137.
- Yasoshima Y, Yamamoto T (1997) Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. *Neuroreport* 8:1363-1367.

ANEXO



Research Report

PKC blockade differentially affects aversive but not appetitive gustatory memories

Luis Núñez-Jaramillo, Ilse Delint-Ramirez, Federico Bermúdez-Rattoni*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510 México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 14 February 2007

Available online 24 February 2007

Keywords:

Taste

Recognition memory

Insular cortex

Learning

Memory

Conditioning

ABSTRACT

After consumption of a new taste, there are mainly two possible outcomes for the establishment of a taste memory, either it will be aversive or safe depending on the consequences of taste consumption. It has been proposed that both types of learning share a common initial taste memory trace, which will lead to two different memory traces, safe or aversive. To study the role of PKC activity in aversive or safe taste memory formation, we administered chelerythrine, a PKC inhibitor, into the insular cortex or parietal cortex 20 min before conditioned taste aversion or attenuation of neophobia training. The results suggest that PKC activity is needed in the insular cortex for the establishment of aversive taste memory, but not for safe taste memory.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In order to survive, animals have developed mechanisms to recognize safe or toxic meals. When an animal finds a new taste it consumes only a small amount of food or drink, which is known as neophobic response. The consequences of food ingestion will determine the future reaction of the animal to that taste. If it has no toxic consequences, the taste cue will be recognized as safe and the animal will increase its consumption, presenting attenuation of neophobia. Conversely, if the taste is followed by signals of toxicity such as gastric malaise, it will be recognized as aversive and the animal will reduce its consumption. Since both types of learning can be derived from the same taste, this taste must be able to unleash mechanisms necessary to learn either of them. It has been proposed that both learnings (safe and aversive) share a common initial taste memory trace (TMT), which is the neural representation of the

taste that will eventually form a gustatory memory, once the consequences of taste consumption have been established. This initial memory trace apparently will divide afterwards in at least two different TMT. These two processes might share similar mechanisms, such as the need of muscarinic acetylcholine receptors activation in the insular cortex (IC) during the consumption of the taste and the initial processing of the TMT (Gutierrez et al., 2003a,b), or proteins synthesis in the same cortex (Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Rosenblum et al., 1993). However, these memory traces also differ in some other mechanisms, for example, it has been reported that the systemic injection of anaesthesia, or the blockade of muscarinic receptors in the IC after the consumption of a new taste impair only safe taste recognition memory formation, but have no effect on aversive taste learning (Buresova and Bures, 1980; Gutierrez et al., 2003a,b). After a novel taste presentation, depending of its visceral consequences, one of these TMTs, will

* Corresponding author.

E-mail address: fbermude@ifc.unam.mx (F. Bermúdez-Rattoni).

Abbreviations: TMT, taste memory trace; PKC, protein kinase C; CTA, conditioned taste aversion; AN, attenuation of neophobia

prevail upon the other (Bermudez-Rattoni, 2004; Buresova and Bures, 1980; Gutierrez et al., 2003a,b).

The IC is located in the temporal lobe of the brain, and it has been reported to be involved in taste learning (either safe or aversive) (Ferreira et al., 2002; Gutierrez et al., 2003a,b). There are reports showing activation of different intracellular events associated with taste consumption and related with taste learning, such as ERK1/II activation (Berman et al., 1998), histone acetylation (Swank and Sweatt, 2001) and the tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor (Rosenblum et al., 1997). These intracellular events are initiated by the consumption of a new taste, however, for most of them it is not clear whether they are needed for safe or aversive taste memory formation, or even for both learnings. In addition, it has been shown that the tyrosine phosphorylation of NR2B can be reproduced by intracortical infusion of carbachol, a cholinergic agonist (Rosenblum et al., 1996).

Protein kinase C (PKC) is a serine/threonine kinase that has been widely reported to be involved in plasticity processes (Van der Zee and Douma, 1997). It has been reported that this kinase is necessary for the establishment of memories and undergoes changes in its activity level after behavioral training or LTP induction (Krivanek, 1997; Sacchetti and Bielavska, 1998; Van der Zee and Douma, 1997; Van der Zee et al., 1997). This kinase can lead to CREB activation (Sweatt, 2001) inducing gene expression, which is an essential step in the formation of long-term memories (Jodar and Kaneto, 1995). In the case of taste learning, it has been reported that PKC is necessary in the IC, amygdala and parabrachial nucleus to form a taste aversive memory (Sacchetti and Bielavska, 1998; Yasoshima and Yamamoto, 1997). In this regard, it is known that the injection of PKC inhibitors into the IC, amygdala or parabrachial nucleus (PBN) impairs CTA memory formation (Bielavska and Krivanek, 1994; Yasoshima and Yamamoto, 1997). It has also been reported in the PBN an increase in PKC protein in the membrane fraction, considered the active form of PKC, after the injection of LiCl, and that PKC translocates for a longer period of time after the establishment of CTA memory (Krivanek, 1996, 1997). Additionally, the injection in the PBN of chelerythrine, a drug that inhibits PKC in a specific form, impairs CTA memory formation (Sacchetti et al., 2001).

Therefore, in this paper we assess the effects of PKC inhibition into the IC, by administration of chelerythrine, in the two types of taste learning. We found that PKC inhibition in the IC, but not in the parietal cortex, disrupts taste aversion learning, but has no effect on attenuation of neophobia. Our results suggest that this kinase is relevant only for aversive, but not for safe taste learning in the IC.

2. Results

2.1. Histology

Two animals were discarded of the group due to cannulae displacement. They are not considered in the analysis. Representative cannulae placements are shown in Fig. 1.

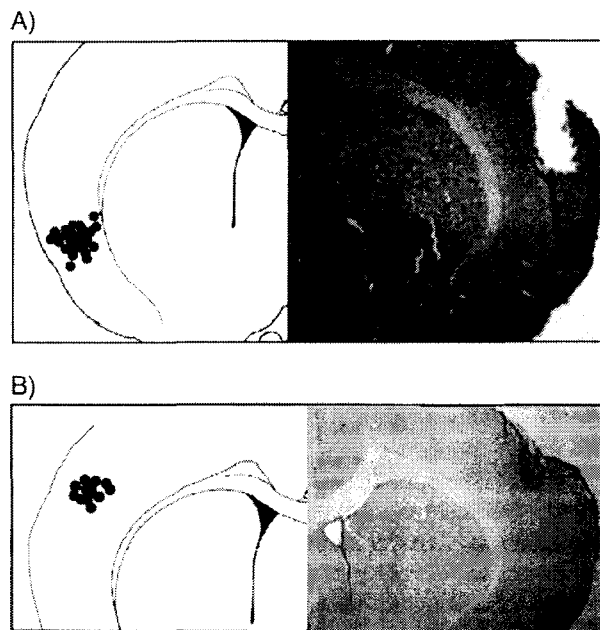


Fig. 1 – Representative pictures of the injection site in the IC (A) and PC (B). The dots on the left represent the injection sites.

2.2. PKC inhibition in the IC disrupts conditioned taste aversion learning

The injection of chelerythrine (10 mM) in the IC 20 min before taste presentation did not produce any visible effect on saccharin consumption during acquisition of CTA ($F_{2,22}=1.56$, $p=0.23$), being similar for the three groups (11.8 ml±0.6 for intact controls, and 13.5 ml±1 and 13.7 ml±0.9 for vehicle and chelerythrine injected animals respectively). However, PKC inhibition disrupted taste aversion learning, similarly to results reported previously (Yasoshima and Yamamoto, 1997) (Fig. 2A). The injection of chelerythrine produced a significant disruptive effect on taste aversion learning ($F_{2,20}=6.96$; $p=0.0051$), since the animals injected with chelerythrine showed a significantly higher saccharin consumption during retrieval (22.56±4.2%, 43.69±7.2% and 69.95±15.07% of the saccharin consumed during acquisition, for the intact group and for the vehicle and chelerythrine injected groups respectively). Fisher post hoc test revealed significant taste aversion impairment between the chelerythrine injected group and the vehicle injected ($p<0.05$) and unoperated controls ($p<0.01$).

When a lower concentration of chelerythrine (5 mM) was injected in the IC, no effects on CTA learning were observed (Fig. 2B). Saccharin consumption during retrieval as a percentage of acquisition was 33.75±7.304% for the intact, 41.77±12.76% for the vehicle and 36.87±7.99% for the chelerythrine injected groups.

2.3. PKC inhibition in the parietal cortex does not disrupt CTA memory formation

As can be seen in Fig. 3, the injection of chelerythrine in the parietal cortex adjacent to the IC does not disrupt taste aversion

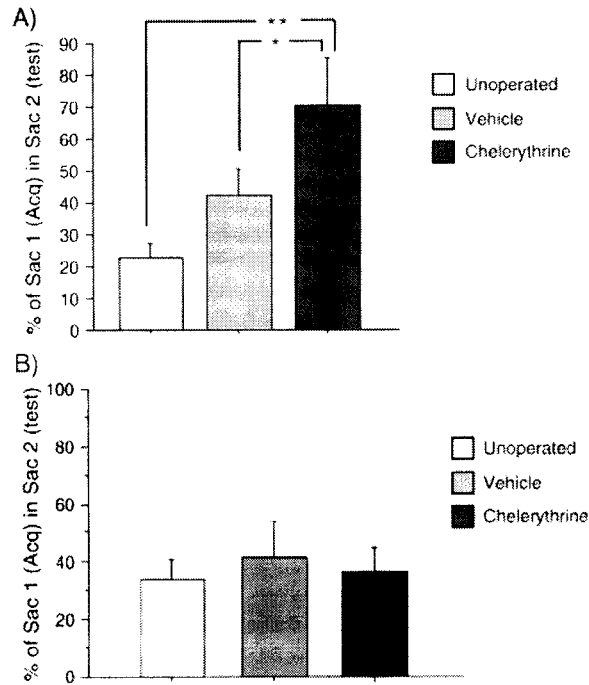


Fig. 2 – PKC inhibition in the IC disrupt CTA memory formation at a concentration of 10 mM (A) but not 5 mM (B). Consumption of saccharin in the second presentation (test) as a percentage of the saccharin consumed during the first presentation (acquisition). Sac1, saccharin 1; Sac2, saccharin 2; acq, acquisition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

learning, since there is no difference in the consumption of saccharin during retrieval between the chelerythrine and vehicle injected groups, saccharin consumption during retrieval was $54.93 \pm 6.16\%$ of the consumption during acquisition for the vehicle and $69.71 \pm 11.45\%$ for the chelerythrine injected group.

2.4. PKC inhibition in the IC does not impair attenuation of neophobia (AN)

The injection of chelerythrine in the IC 20 min before taste presentation did not impair the expression of taste neophobia,

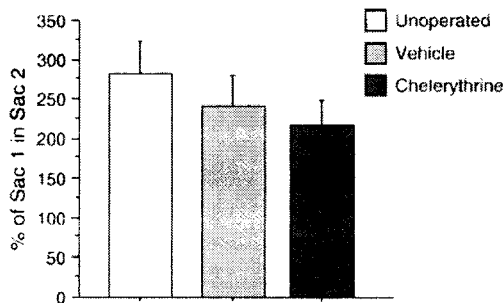


Fig. 3 – Inhibition of PKC in the IC does not disrupt attenuation of neophobia. Consumption of saccharin in the second presentation as a percentage of the saccharon consumed during the first presentation. Sac1, saccharin 1; Sac2, saccharin 2.

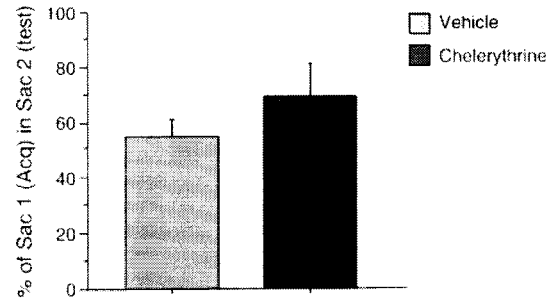


Fig. 4 – PKC inhibition in the parietal cortex does not impair CTA learning.

indicating that the animal perceived the taste properly so that the consumption of saccharin was similar for the three groups (4.1 ± 0.9 ml, 6.7 ± 0.6 ml and 6.3 ± 0.7 ml for the intact controls, vehicle and chelerythrine groups respectively, $F_{2,20} = 3.129$, $p = 0.066$). Moreover, the drug did not affect either attenuation of neophobia, since all three groups increased their consumption of saccharin in the second presentation in a very similar fashion, as can be seen in Fig. 4. The three groups presented a similar increase in saccharin consumption during the second presentation of the taste, when compared with their first saccharin consumption (unoperated, $282.57 \pm 40.54\%$; vehicle, $240.46 \pm 38.98\%$; chelerythrine, $215.87 \pm 31.43\%$; $F_{2,20} = 0.86$, $p = 0.44$).

3. Discussion

The results presented here demonstrate a differential participation of PKC in the IC for aversive, but not safe taste recognition memory formation. Importantly, chelerythrine injection affected taste consumption neither in acquisition of CTA nor in expression of neophobia, indicating that the animals perceived the taste correctly and were able to present the classical behavior of neophobia. The effect was observed only with the highest concentration of the drug (10 mM) but not with the lower one (5 mM) in a similar fashion to the results reported previously in PBN with the same drug (Sacchetti and Bielavska, 1998). Additionally, the effect observed was specific to the IC, since the injection of chelerythrine in the adjacent parietal cortex did not produce any effect on aversive taste learning.

PKC activity has been related with several tasks such as spatial learning and classic conditioning, since it has been reported that PKC inhibition produces severe deficits in those tasks (Van der Zee and Douma, 1997; Van der Zee et al., 1997). In addition, PKC has been associated with the memory enhancing effect of physical activity (Fordyce and Wehner, 1993a,b), or its decrease with the memory deficits observed in aged animals (Fordyce and Wehner, 1993a,b). Interestingly, its activity has been related with other cellular mechanisms associated with plasticity processes such as NMDA receptor phosphorylation (Grosshans and Browning, 2001) and trafficking (Grosshans et al., 2002). As mentioned above, PKC activity has also been reported to be necessary for taste aversion learning in the amygdala, IC and PBN (Krivanek, 1997;

Yasoshima and Yamamoto, 1997). In the particular case of the PBN, it has also been shown an increase in the amount of membranous PKC after the injection of malaise inducing agents such as LiCl and amphetamines, as well as after the induction of CTA (Krivanek, 1996, 1997).

PKC can be activated by metabotropic receptors coupled with $G_{q/11}$ proteins, such as the postsynaptic muscarinic ACh receptors, which might take the signal from the receptor to the nucleus (Felder, 1995) inducing gene expression which might subsequently lead to protein synthesis. The requirement of protein synthesis in the IC for both, taste aversion learning and attenuation of neophobia has already been reported (Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Rosenblum et al., 1993). Nevertheless, in the present work we show that PKC inhibition in the IC does not impair the establishment of safe taste recognition memory.

What would be the role of PKC in the IC in taste learning? One of the mechanisms through which PKC could be participating in taste aversion memory formation is by activation of src family kinases responsible for the tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor, which is carried out after the consumption of a new, but not a familiar taste (Rosenblum et al., 1997). It has been reported that inhibition of PKC with chelerythrine has a similar effect as the inhibition of Src kinases over tyrosine phosphorylation of NR2B (Grosshans and Browning, 2001). The participation of muscarinic receptors in the tyrosine phosphorylation of NR2B in the IC has also been suggested, since the injection of carbachol in the IC can reproduce this phosphorylation (Rosenblum et al., 1996). This is highly significant given that another consequence of novel taste consumption is an increase in the release of ACh in the IC, which is also dependent of taste novelty (Miranda et al., 2000). Thus, muscarinic ACh receptors seem to initiate the intracellular pathway leading to the tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the IC. PKC has been reported to be activated by muscarinic ACh receptors (Felder, 1995) and to lead to the phosphorylation of NR2B (Grosshans and Browning, 2001).

Among the differences between safe and aversive taste memory formation is the participation of NMDA receptors in the IC, which are needed for aversive, but not for safe taste memory formation (Gutierrez et al., 2003a,b). Thus, NMDA receptor phosphorylation could play a role in taste aversion memory formation, supporting the hypothesis that among the mechanisms for PKC participation in taste aversion learning could be the phosphorylation of NR2B subunit of the NMDA receptor.

Behavioral data seem to support this view. The phosphorylation of NR2B enhances receptor function in response to agonist binding (Kohr and Seeburg, 1996; Levine et al., 1998; Lin et al., 1998). Nevertheless, since NMDA receptors in the IC are not necessary for safe taste learning (Gutierrez et al., 2003a,b) but are needed for aversive taste learning (Berman et al., 2000; Ferreira et al., 2002; Gutierrez et al., 1999), it is highly possible that this phosphorylation is necessary for aversive taste memory formation. Additionally, it has been reported that the injection of LiCl produces an increase in glutamate release in the IC (Miranda et al., 2002), further supporting the role of glutamate in this cortex in the processing of the malaise inducing agent in

CTA. Thus, the necessity of PKC activity in the IC for aversive, but not safe taste memory formation is congruent with the hypothesis that the participation of PKC in taste learning in the IC could include the activation of an intracellular pathway leading to the tyrosine phosphorylation of NR2B, although this possibility still needs to be explored experimentally.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

46 Wistar rats from the vivarium of the Instituto de Fisiología Celular of the UNAM, weighing between 280 and 300 g at the beginning of the experiment were used. The rats were kept in individual cages in a 12 h light–12 h dark cycle. All behavioral manipulations were performed during the light phase. The rats had water and food *ad libitum* except when otherwise indicated (see below).

4.2. Surgery and injection

The animals were implanted under deep anesthesia (Ketamine 84 mg/kg and Xylazine, 0.4 mg/kg, i.p.) with bilateral cannulae aimed either 2.5 mm above the IC according to the following coordinates of AP 1.2 mm, L \pm 5 mm, DV –3 mm; or 0.5 mm above parietal cortex with the coordinates AP 1.2 mm, L \pm 5 mm, DV –2.5 mm (Paxinos and Watson, 1982). Twenty minutes before the first presentation of the taste, 1 μ l of either distilled water or chelerythrine chloride (5 mM or 10 mM in distilled water, SIGMA St. Louis MO) were infused in the IC or the parietal cortex at a rate of 0.5 μ l per minute through a dental needle, connected to a microinfusion pump through a polyethylene tube, the needle was left in the cannulae for 2 additional minutes to allow the diffusion of the fluid.

4.3. Behavioral procedures

4.3.1. Conditioned taste aversion

The animals were water deprived 24 h before the beginning of behavioral procedures and given water for 15 min each day for 3 days to establish a water base-line consumption. The fourth day the rats were presented with a solution of 0.1% of saccharin (Sigma, St. Louis MO) instead of water, and 15 min after the end of the fluid consumption period, the rats were injected with LiCl 0.4 M (7.5 ml/kg). On days 5 and 6 the animals were given water as in previous days and on day 7 were presented again with 0.1% saccharin to test taste aversion. In order to test the specificity of PKC need for taste aversion memory formation, five groups of animals were used; animals infused in the IC with either 10 mM chelerythrine ($n=6$) or vehicle ($n=8$), in one experiment, or chelerythrine 5 mM ($n=8$), vehicle ($n=6$) or intact control ($n=6$) in another. As a control of structure specificity we performed injections into the parietal cortex of either chelerythrine ($n=6$) or vehicle ($n=8$), 20 min before presentation of the taste, and unoperated controls ($n=9$).

4.3.2. Attenuation of neophobia

The animals were water deprived and given water for 15 min each day for 3 days to establish a water base-line consump-

tion. On day 4, the animals were presented with a solution of 0.25% of saccharin during 15 min and then followed by a 15 min presentation of water to avoid dehydration given the low saccharin consumption at that concentration. For better results with attenuation of Neophobia we increased the saccharin concentration to 0.25%, since it has been reported that taste learning does not change with an even larger variation in taste concentration (0.5% of saccharin instead of 0.1% for aversive taste memory formation (Gutierrez et al., 2003a)). On days 5 and 6 the rats were presented again with saccharin to test AN followed by water to avoid dehydration. Three groups of animals were used, animals infused with either 10 mM chelerythrine ($n=9$) or vehicle ($n=7$) into the IC 20 min before presentation of the taste, and unoperated controls ($n=7$).

4.4. Histological analysis

At the end of the experiment the animals were injected with an overdose of sodium pentobarbital and perfused transcardially with NaCl 0.15 M followed by 0.4% paraphormaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The brains were then removed and left in paraphormaldehyde 24 h, and then the paraphormaldehyde was replaced with 30% sucrose where the brains were left until they sank. Afterwards, 40 μ m thick coronal brain slices were obtained in a cryostat and stained with cresyl violet to observe under the microscope and determine the site of injection.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT 42657Q and DGAPA-UNAM 220706-03. We acknowledge the technical assistance of Federico Jandete, Oreste Carbajal, Francisco Pérez Eugenio and to Yahan B.A. for the text review of this manuscript.

REFERENCES

- Berman, D.E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., Dudai, Y., 1998. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J. Neurosci.* 18, 10037–10044.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Neduva, V., Dudai, Y., 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1–2 and formation of a memory trace. *J. Neurosci.* 20, 7017–7023.
- Bermudez-Rattoni, F., 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev., Neurosci.* 5, 209–217.
- Bielavska, E., Krivanek, J., 1994. Intracerebral injection of polymyxin B blocks the acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Neurosci. Lett.* 182, 239–242.
- Buresova, O., Bures, J., 1980. Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats. *Behav. Brain Res.* 1, 299–312.
- Felder, C.C., 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9, 619–625.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V., Bermudez-Rattoni, F., 2002. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1139–1145.
- Fordyce, D.E., Wehner, J.M., 1993a. Effects of aging on spatial learning and hippocampal protein kinase C in mice. *Neurobiol. Aging* 14, 309–317.
- Fordyce, D.E., Wehner, J.M., 1993b. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res.* 619, 111–119.
- Grosshans, D.R., Browning, M.D., 2001. Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J. Neurochem.* 76, 737–744.
- Grosshans, D.R., Clayton, D.A., Coultrap, S.J., Browning, M.D., 2002. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat. Neurosci.* 5, 27–33.
- Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., Ramirez-Amaya, V., Bermudez-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.
- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C.J., De La Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L., Bermudez-Rattoni, F., 2003a. Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80, 323–331.
- Gutierrez, R., Tellez, L.A., Bermudez-Rattoni, F., 2003b. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1556–1562.
- Jodar, L., Kaneto, H., 1995. Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn. J. Pharmacol.* 68, 359–387.
- Kohr, G., Seeburg, P.H., 1996. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J. Physiol.* 492 (Pt. 2), 445–452.
- Krivanek, J., 1996. Conditioned taste aversion and protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65, 154–162.
- Krivanek, J., 1997. Protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion induced by amphetamine. *Neurosci. Lett.* 236, 17–20.
- Levine, E.S., Crozier, R.A., Black, I.B., Plummer, M.R., 1998. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10235–10239.
- Lin, S.Y., Wu, K., Levine, E.S., Mount, H.T., Suen, P.C., Black, I.B., 1998. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55, 20–27.
- Miranda, M.I., Ramirez-Lugo, L., Bermudez-Rattoni, F., 2000. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res.* 882, 230–235.
- Miranda, M.I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L., Bermudez-Rattoni, F., 2002. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11417–11422.
- Paxinos, G., Watson, C., 1982. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutierrez, R., Bermudez-Rattoni, F., 2005. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn. Mem.* 12, 533–537.
- Rosenblum, K., Meiri, N., Dudai, Y., 1993. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav. Neural Biol.* 59, 49–56.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, S., Dudai, Y., 1996. Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *NeuroReport* 7, 1401–1404.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, S., Lamprecht, R., Dudai, Y., 1997. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J. Neurosci.* 17, 5129–5135.

- Sacchetti, B., Bielavska, E., 1998. Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat. *Brain Res.* 799, 84–90.
- Sacchetti, B., Baldi, E., Tassoni, G., Bielavska, E., 2001. CAMKII inhibition in the parabrachial nuclei elicits conditioned taste aversion in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 75, 253–261.
- Swank, M.W., Sweatt, J.D., 2001. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J. Neurosci.* 21, 3383–3391.
- Sweatt, J.D., 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76, 1–10.
- Van der Zee, E.A., Douma, B.R., 1997. Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21, 379–406.
- Van der Zee, E.A., Luiten, P.G., Disterhoft, J.F., 1997. Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21, 531–572.
- Yasoshima, Y., Yamamoto, T., 1997. Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. *Neuroreport* 8, 1363–1367.

Taste novelty induces intracellular redistribution of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor in the insular cortex

Luis Núñez-Jaramillo, Beatriz Jimenez, Nadia Ramirez-Munguía, Ilse Delint-Ramírez, Claudio Luna-Illades , Ricardo Tapia and Federico Bermúdez-Rattoni*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253 México D.F., 04510, México

Correspondence should be addressed to Dr. Federico Bermudez-Rattoni, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253 México D.F., 04510, México. E-mail: fbermude@ifc.unam.mx

Abbreviations:

DRM: Detergent Resistant Membrane

mAChR: muscarinic Acetylcholine Receptor

NMDA: N-Methyl-dAspartate

Abstract.

Taste recognition memory is a process by which animals associate a taste previously experienced with its gastric consequences. Novel taste presentation induces in the insular cortex biochemical modifications that decrease after the taste becomes familiar. Here we show that, in this cortex, consumption of a novel taste produces an increase of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor in the detergent resistant membrane (DRM) fraction. This increase did not occur in the adjacent parietal cortex, was not due to a change in the total amount of protein, and is related with the novelty of the stimulus since it was reduced after the taste became familiar. Furthermore, NR2A and NR2B subunits increase in the DRM was blocked by the injection of a muscarinic acetylcholine receptor antagonist. These results suggest that modulation of NMDA receptors in the insular cortex through the increase of its NR2A and NR2B subunits in the DRM is involved in novel taste recognition via a cholinergic process.

Keywords: taste recognition memory, detergent resistant membranes

INTRODUCTION

Taste recognition memory is the ability to remember a taste previously experienced and its gastric consequences. The process leading to the formation of a taste recognition memory begins with the consumption of a novel taste and the formation of a taste memory trace (TMT), which is the neural representation of the taste before the consequences of its consumption have been established (Bermudez-Rattoni, 2004). It has been suggested that taste consumption generates two different TMT, safe and aversive (Gutierrez et al., 2003a, Bermudez-Rattoni, 2004), and that one of them will prevail once the postingestional consequences of the taste have occurred. These two components of the TMT share some common mechanisms, such as the dependence on muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) activation in the insular cortex (IC) during the early stages of taste processing (Gutierrez et al., 2003a). However, these two memory traces differ in other mechanisms. For example, the aversive TMT, studied with conditioned taste aversion, can be disrupted by both the ip injection of pentobarbital and the blockade of mAChR in the IC after taste consumption, while safe TMT, observed by attenuation of neophobia, is not affected by these treatments. (Buresova and Bures, 1980, Gutierrez et al., 2003a).

Several biochemical signals in the IC have been related to taste novelty, such as a significant stimulation of ACh release (Miranda et al., 2000), tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptors (Rosenblum et al., 1997), and activation of extracellular regulated kinase I/II (ERK I/II) (Berman et al., 1998). All of these biochemical changes were reduced when the taste became familiar.

NMDA receptors are calcium permeable ionotropic glutamate receptors, composed by at least two of three types of subunits, NR1 and NR2 and/or NR3. For NR1 there are 10 variables generated by alternative splicing; this subunit is absolutely necessary for receptor function. For NR2 there are 4 different isoforms: A, B, C and D (Pláteník et al., 2000), of which NR2C and NR2D are mainly embryonic, although are still expressed in low levels in adult cortex (Goebel and Poosch, 1999). In the case of NR3 (A and B), they are also mainly embryonic, and its presence in the receptor reduces calcium permeability (Sasaki et al., 2002, Matsuda et al., 2003). In the adult cortex and hippocampus, the majority of NMDA receptors are composed by NR1/NR2A/NR2B subunits (Luo et al., 1997).

NMDA receptor activity can be regulated by different mechanisms, such as the phosphorylation of its subunits (Kohr and Seeburg, 1996, Leonard and Hell, 1997, Levine et al., 1998, Lin et al., 1998, Li et al., 2001, Liao et al., 2001) and its transfer to different locations within the neuron. NMDA receptors can be found in different membrane sites, such as the extrasynaptic zone (Hardingham et al., 2002), the postsynaptic membrane, either assembled or not assembled in rafts (Besshoh et al., 2005), and recently it has also been located in the presynaptic membrane (Woodhall et al., 2001, Garcia-Junco-Clemente et al., 2005).

Calcium entering through NMDA receptor initiates a number of intracellular signaling mechanisms leading to kinases regulation and gene expression (Pláteník et al., 2000),

events related with the establishment of long term memories (Jodar and Kaneto, 1995). In this regard, the blockade of NMDA receptor impairs the formation of a long term memory for a different number of tasks, including conditioned taste aversion (CTA) (Bannerman et al., 1995, Gutierrez et al., 1999, Tsien, 2000, Escobar et al., 2002). The movement of NMDA subunits has been observed after the induction of LTP (Grosshans et al., 2002), the training in fear conditioning (Cammarota et al., 2000), and the induction of ischemia (Besshoh et al., 2005). Thus, it is important to know whether NMDA receptor location in the neuron is modified as a consequence of changes in its neuronal activity during taste recognition memory formation. The purpose of this work is to address this issue.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Eighty-seven male Wistar rats from the vivarium of the Instituto de Fisiología Celular weighing 270-290 g at the beginning of the experiment were used. The rats were individually caged and placed in a 12 h light, 12 h dark cycle with food and water *ad libitum*, except during the experiment, as indicated. All manipulations were performed in the light cycle. Animals were handled according to the Rules for Research in Health Matters (México) with approval of the local Animal Care Committee.

Behavioral protocol

Twenty-four h before the beginning of the behavioral protocol the animals were water deprived and then began a drinking daily regime of 15 min of drinking for three days to

establish a basal water consumption. On the fourth day water was replaced with 0.1% or 0.25% saccharin for three days. The animals used for biochemical analysis were sacrificed 15 minutes after the consumption of water, or after the first, second or third presentation of saccharin.

Surgery and microinjection

For the purpose of determining the effects of mAChR blockade on the task studied and on the increase in NMDA subunits in detergent resistant membrane fraction (DRM), a group of animals was implanted with cannulae aimed 2.5 mm above the insular cortex (AP=+1.2, L=±5, V=-3) (Paxinos and Watson, 1982), under pentobarbital anesthesia (40 mg/kg). Two screws were fixed into the skull in order to hold the cannulae with dental acrylic, and stylets were placed inside the cannulae to avoid clogging.

On the day of injection the stylets were removed and the animals received 1 µl of either vehicle (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 19 mM NaHCO₃ and 3.3 mM glucosa, pH 7.4) or scopolamine (136 mM, SIGMA, St. Louis Missouri) through an injection needle which protruded 2.5 mm from the guide cannula tip to reach the insular cortex. The volume was perfused at a rate of 0.5 µl per minute and the needle was left in place one additional minute before withdrawal.

Tissue extraction and isolation of DRM

Fifteen min after the end of the corresponding drinking period the animals were sacrificed by decapitation and the insular cortex was dissected out on ice cold filter paper

in less than one minute. In some cases the adjacent parietal cortex was also dissected. The tissue was homogenized in 100 μ l of buffer A (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p40, 0.5% sodium deoxicholate, 10 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride and a protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany)). Samples were then frozen at -80 C until used.

The protein concentration in the homogenate was determined with the Lowry method and 1 mg of protein was used for the analysis. Buffer A was added to reach 500 μ l and then shaken overnight at 4 C. The samples were then centrifuged at 12,500 g for 2 min. The pellet was resuspended in lysis bufer, shaken during 15 min and centrifuged again. The pellet was resuspended in buffer B (50 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% nonidet P40 and 0.05% sodium deoxicholate) and washed and centrifuged three times in the same way. After the third wash the pellet was resuspended in buffer C (10 mM Tris pH 7.5, 0.1% nonidet P40 and 0.05% sodium deoxicholate) and washed once. The final pellet was resuspended in 25 μ l of loading laemmli buffer (Bio-Rad, Cal USA) containing 5% β -mercaptoethanol and boiled for 3 min.

SDS-PAGE and immunodetection

Twenty μ l of the sample were loaded on each lane of a 7.5% polyacrilamide gel and subjected to SDS-PAGE at 120 V for 90 min. For the total cortical homogenates, 40 μ g of protein where loaded in each gel lane. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (BIO-RAD, Cal USA) and blocked overnight with 5% bovine serum albumin (BSA) in tris buffered saline with tween (TBS-T) (10 mM Tris, 150 mM NaCl and 1%

tween-20). Membranes were then incubated overnight with an antibody for the NR2B subunit of the NMDA receptor (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 in 5%BSA in TBS-T), washed three times with TBS-T and then incubated for 1 h with a goat secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, 1:7000 in 5% BSA in TBS-T). After three washes with TBS-T and one with TBS (10mM Tris and 150mM NaCl), the membranes were incubated with chemiluminiscent reactive (PIERCE) and then the signal was revealed with photographic paper (KODAK) and analyzed with the program Image J (NIH, USA). The membranes were then eluted with two twenty-min washes in TBS-T the membranes were reincubated with an antibody to detect the NR2A subunit of the NMDA receptor (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 in 5%BSA in TBS-T). The whole process was repeated for this antibody using the same secondary antibody.

Histological analysis

The animals used for behavioral analysis were transcardially perfused with NaCl 150 mM and then with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1M. Brains were left in paraformaldehyde for 24 hrs and then left in sucrose 30% in phosphate buffer until sinking. Coronal sections 40 μ m thick were obtained in a cryostat and stained with cresyl violet to determine cannulae placement.

RESULTS

When presented with novel saccharin 0.1% (Fig 1A) (n=13), consumption dropped to $63.3\% \pm 5.94\%$ of the basal water intake, showing a clear neophobic response. It increased to $98.4\% \pm 7.94\%$, and $111.3\% \pm 6.53\%$ of the basal consumption in the second

(n=13) and third (n=13) presentations respectively, displaying a good attenuation of neophobia. One way ANOVA showed significant differences in saccharin consumption as an effect of familiarity ($F_{2,36}=13.171$, $p<0.0001$). Fisher's post hoc analysis showed differences between the first and second presentation ($p<0.01$), as well as between the first and third saccharin presentation ($p<0.0001$).

When the saccharin concentration was increased to 0.25% (Fig 1B), during the first consumption of the taste animals (n=16) drank $40.7\% \pm 4.6\%$ of the basal water consumption. The consumption increased as the taste became familiar to $73.2\% \pm 6.42\%$ and $104.9\% \pm 5.71\%$ in the second (n=16) and third (n=16) presentations. One way ANOVA showed an effect of familiarity on saccharin intake ($F_{2,45}=32.598$, $p<0.0001$). Fisher's post hoc analysis showed differences between the first and third saccharin presentation groups ($p<0.0001$).

Increase of NR2A and NR2B subunits in the DRM fraction of the membrane

As shown in fig 1A, consumption of a new taste (saccharin, 0.1%) produced an increase of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor to the DRM fraction of the membrane in the IC, and it decreased when the taste became familiar after 2 or 3 saccharin presentations. After the first consumption of saccharin the level of NR2A detected in the DRM fraction raised to $176\% \pm 9.06\%$ (n=4) when compared to the control animals that drank only water, and decreased to $156.7\% \pm 16.65\%$ (n=4) and $91\% \pm 16.55\%$ of control (n=4) during the second and third presentation, respectively. A

simple ANOVA test revealed a significant effect of treatment on the level of NR2A protein in the DRM fraction ($F_{2,9}=9.411$, $p<0.01$). Fisher's *post hoc* analysis showed differences between the groups S1 and S3 ($p<0.01$), as well as between the S2 and S3 ($p<0.05$).

Similar results were found when the presence of NR2B in DRM fraction was analyzed. When animals tasted 0.1% saccharin for the first time NR2B in DRM increased to $193.7\% \pm 8.71\%$ ($n=4$) when compared to controls, and decreased to $97.2\% \pm 20.1\%$ ($n=4$) and $44.5\% \pm 10.6\%$ ($n=4$) when the taste became familiar after two or three presentations, respectively (Fig 1A). An ANOVA test revealed a significant effect of saccharin familiarity on the presence of NR2B in the DRM fraction ($F_{2,9}=29.011$, $p=0.0001$) and a Fisher *post hoc* test showed differences between the groups S1 and S2 ($p<0.01$), S1 and S3 ($p<0.0001$), and between the groups S2 and S3 ($p<0.05$).

When a higher concentration of saccharin was used (0.25% saccharin), similar results were found for both subunits (Fig 1B). When the rats drank saccharin 0.25% for the first time the increase of NR2A and NR2B in the DRM fraction in the IC was of $185.6\% \pm 21.96\%$ ($n=6$) and $224.76 \pm 33.34\%$ ($n=5$) of controls, respectively. For the second presentation of saccharin it decreased to $135.8\% \pm 11.36\%$ ($n=6$) for NR2A and to $157.2 \pm 38.23\%$ ($n=5$) for NR2B. After the third presentation of 0.25% saccharin the value decreased to $77.5 \pm 16.32\%$ ($n=6$) for NR2A and to $95 \pm 17.66\%$ ($n=5$) for NR2B. An ANOVA test revealed an effect of treatment on the amount of NR2A protein in the DRM fraction ($F_{2,15}=10.007$, $p<0.01$). Fisher's *post hot* analysis showed a difference between

the S1 and S3 groups ($p < 0.01$), as well as between the S2 and S3 groups ($p < 0.05$). For NR2B subunit the ANOVA revealed an effect of familiarity on NR2B localization ($F_{2,12} = 4.378$, $p < 0.05$), and the Fisher's *post hoc* test showed a difference between the groups S1 and S3 ($p < 0.05$).

The increase of NR2A and NR2B in DRM fraction is not due to changes in the total amount of protein

As shown in fig 2, the total amount of NR2A and NR2B proteins in the IC did not change as a consequence of the novelty-familiarity of the taste consumed. Thus, the increase in the amount of NR2A and NR2B described above is not the result of variations in the amount of protein.

The presence of NR2B subunits in DRMs is much lower in the parietal cortex adjacent to the IC

In contrast to the change observed in the IC, a lower amount of NR2B in DRM is observed in the adjacent parietal cortex (Fig 3). In a group of four rats (four rats for the water and four for the saccharin group) we found that while in the IC there was an increase of the amount of NR2B protein in the DRM fraction after novel saccharin consumption to $290.5\% \pm 53.41\%$ ($n=4$), the adjacent parietal cortex reached an average of $138.7\% \pm 28.09\%$ ($n=4$). An unpaired t-test revealed a significant difference ($p < 0.05$) in the amount of NR2B detected in the DRM fraction in the insular and parietal cortices after consumption of a novel taste.

mAChR blockade by scopolamine in the IC impairs the attenuation of neophobia and the increase in NR2A and NR2B subunits in DRM fraction

As previously reported (Gutierrez et al., 2003a), the injection of scopolamine in the IC 20 min before the presentation of novel saccharin impairs attenuation of neophobia (Fig 4A). During the second presentation of the taste, the vehicle injected animals increased their saccharin consumption by $6.12\text{ml} \pm 1.59$ (n=8), and the intact animals by $7.62\text{ml} \pm 3.66$ (n=8), showing a clear attenuation of neophobia. In contrast, the scopolamine injected animals did not show attenuation of neophobia, since they consumed only $0.71\text{ml} \pm 1.29$ more than in their first presentation of saccharin (n=7). An ANOVA test revealed a significant difference among groups during the second presentation of saccharin ($F_{2,20}=7.64$, $p<0.01$), and a Fisher *post hoc* test showed a significant difference between the scopolamine injected group and the vehicle ($p<0.01$) and intact ($p<0.01$) controls.

The blockade of muscarinic ACh receptors with scopolamine also impaired the increase of NR2A and NR2B in DRM observed in the IC (Fig 4B). The injection of scopolamine reduced the level of NR2A protein in the DRM fraction to $50.9\% \pm 18.9\%$ (n=5) of the values detected in the control animals injected with vehicle. In the case of NR2B subunit, the injection of the mAChR antagonist decreased the presence of this subunit in DRM to $44.3\% \pm 19.39$ (n=5) of controls.

DISCUSSION

In the present study we describe the increase of NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptors in the DRM fraction of the IC after consumption of a novel taste. This increase in DRM is closely related with the level of familiarity of the taste, since it decreases as the taste becomes familiar (attenuation of neophobia), and seems to be dependent on the activation of muscarinic ACh receptors, because it is blocked by cortical scopolamine application.

What role could NR2A and NR2B increase in the IC in DRM play in taste learning? NMDA receptor activity in the IC is not needed for attenuation of neophobia, so that NMDA receptor regulation probably is not needed for this process (Gutierrez et al., 2003b). However, one possible role of the regulation of NMDA receptor in taste learning in the IC could be to participate in the association of the TMT with the trace of the malaise inducing agent used to form an aversive memory of that taste. This hypothesis is supported by the fact that taste aversion memory, differently from safe taste memory, is dependent on NMDA receptor activation in the IC (Gutierrez et al., 1999, Gutierrez et al., 2003b). In fact, it has been suggested that it is through NMDA receptors that the IC receives the information about the toxic stimulus and is then able to associate it with the TMT (Ferreira et al., 2002, Bermudez-Rattoni, 2004). Then, the increase in NMDA receptors in the DRM fraction of the membrane after the consumption of a novel taste would modify synaptic responsiveness to properly associate the stimuli producing an aversive taste memory. In support of this hypothesis, the familiarity of a taste reduces significantly the efficiency of its association with the toxicity signal, and thus, the

formation of an aversive taste memory (Siegel, 1974, Berman et al., 2000). Similarly to the reduction of NR2A and NR2B in the DRM fraction in the IC, regulation of NMDA receptor by taste novelty-familiarity has already been reported by Rosenblum and coworkers, who found an increase in the tyrosine phosphorylation of NR2B in the IC after the consumption of a novel, but not a familiar taste (Rosenblum et al., 1997). Interestingly, this phosphorylation could be mimicked by the injection of an agonist of mAChR (Rosenblum et al., 1996).

mAChR in the IC have been reported to be a key component in the initial formation of both safe and aversive TMT, since their blockade impairs both forms of taste learning (Gutierrez et al., 2003a). The activation of mAChR can trigger several intracellular signals (Felder, 1995). In the IC, as a consequence of the consumption of a novel taste, both an increase in ERK1/II activity and the phosphorylation of NR2B, have been related to mAChR activation (Rosenblum et al., 1996, Berman et al., 2000). Thus, the above mentioned mechanisms started in the IC by novel taste and dependent on mAChR activation could be involved in the formation of either TMT (safe or aversive).

Relocalization of the NR1 and NR2A subunits of the NMDA receptors has also been reported as a consequence of the changes in synaptic activity during LTP induction. Both subunits decrease in the intracellular fraction and increase in the membrane in a process dependent on the activation of both protein kinase C (PKC) and src kinases (Grosshans et al., 2002). Moreover, and in agreement with the present results, during fear conditioning the NMDA receptor subunits are transferred to the synaptic membrane in the

hippocampus. The increase in synaptic NMDA receptors was transitory, since it was not observed 2 h after training (Cammara et al., 2000). Altogether, these reports and our results support a role of NMDA receptor relocalization in learning.

Regarding other models, a movement of NR2B to DRM has already been reported in a cellular model of ischemia where neurons in culture were deprived of oxygen and glucose (Abulrob et al., 2005). This deprivation induced an increase in NR2B in DRMs, and this increase could be impaired by the addition of cholesterol-extracting cyclodextrins in the media. Interestingly, impairing the movement of NR2B also prevented the lethal effect of NMDA addition to the medium, which normally induces cell death in the culture, but not when the cholesterol was extracted. Interestingly, the calcium permeability of the NMDA receptor did not change (Abulrob et al., 2005). This argues in favor of a differential effect the calcium entering the NMDA receptor when it is located in DRMs. However, this level of approximation has not been yet reported in learning.

In summary, the results presented here suggest that the increase in NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor in DRMs in the IC may be a mechanism of regulation of receptor signaling which could be implicated in the processing of TMT and the formation of taste memory.

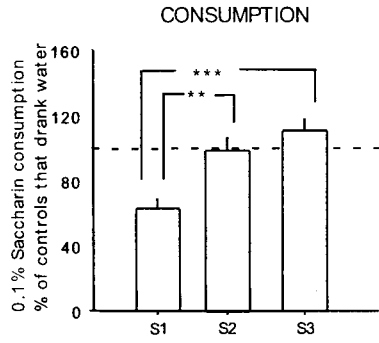
REFERENCES.

- Abulrob, A., Tauskela, J. S., Mealing, G., Brunette, E., Faid, K. and Stanimirovic, D., 2005. Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem.* 92, 1477-1486.
- Bannerman, D. M., Good, M. A., Butcher, S. P., Ramsay, M. and Morris, R. G., 1995. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature.* 378, 182-186.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V. and Dudai, Y., 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci.* 20, 7017-7023.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. and Dudai, Y., 1998. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci.* 18, 10037-10044.
- Bermudez-Rattoni, F., 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci.* 5, 209-217.
- Besshoh, S., Bawa, D., Teves, L., Wallace, M. C. and Gurd, J. W., 2005. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem.* 93, 186-194.
- Buresova, O. and Bures, J., 1980. Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats. *Behav Brain Res.* 1, 299-312.
- Cammarota, M., de Stein, M. L., Paratcha, G., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I. and Medina, J. H., 2000. Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. *Neurochem Res.* 25, 567-572.
- Escobar, M. L., Alcocer, I. and Bermudez-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. *Behav Brain Res.* 129, 101-106.
- Felder, C. C., 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J.* 9, 619-625.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V. and Bermudez-Rattoni, F., 2002. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci.* 16, 1139-1145.
- Garcia-Junco-Clemente, P., Linares-Clemente, P. and Fernandez-Chacon, R., 2005. Active zones for presynaptic plasticity in the brain. *Mol Psychiatry.* 10, 185-200; image 131.
- Goebel, D. J. and Pooch, M. S., 1999. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res.* 69, 164-170.
- Grosshans, D. R., Clayton, D. A., Coultrap, S. J. and Browning, M. D., 2002. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat Neurosci.* 5, 27-33.

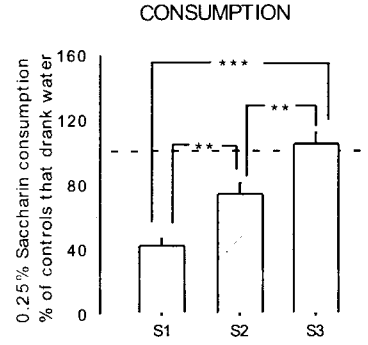
- Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., Ramirez-Amaya, V. and Bermudez-Rattoni, F., 1999. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*. 89, 751-758.
- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C. J., De La Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L. and Bermudez-Rattoni, F., 2003a. Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem*. 80, 323-331.
- Gutierrez, R., Tellez, L. A. and Bermudez-Rattoni, F., 2003b. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci*. 17, 1556-1562.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. and Bading, H., 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 5, 405-414.
- Jodar, L. and Kaneto, H., 1995. Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn J Pharmacol*. 68, 359-387.
- Kohr, G. and Seeburg, P. H., 1996. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol*. 492 (Pt 2), 445-452.
- Leonard, A. S. and Hell, J. W., 1997. Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem*. 272, 12107-12115.
- Levine, E. S., Crozier, R. A., Black, I. B. and Plummer, M. R., 1998. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 10235-10239.
- Li, B. S., Sun, M. K., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Vinade, L., Kulkarni, A. B., Brady, R. O. and Pant, H. C., 2001. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 12742-12747.
- Liao, G. Y., Wagner, D. A., Hsu, M. H. and Leonard, J. P., 2001. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol*. 59, 960-964.
- Lin, S. Y., Wu, K., Levine, E. S., Mount, H. T., Suen, P. C. and Black, I. B., 1998. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res*. 55, 20-27.
- Luo, J., Wang, Y., Yasuda, R. P., Dunah, A. W. and Wolfe, B. B., 1997. The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol*. 51, 79-86.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y. and Yuzaki, M., 2003. Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci*. 23, 10064-10073.
- Miranda, M. I., Ramirez-Lugo, L. and Bermudez-Rattoni, F., 2000. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res*. 882, 230-235.
- Paxinos, G. and Watson, C., 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.

- Pláteník, J., Kuramoto, N. and Yoneda, Y., 2000. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* 67, 335-364.
- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S. and Dudai, Y., 1996. Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *Neuroreport.* 7, 1401-1404.
- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S., Lamprecht, R. and Dudai, Y., 1997. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci.* 17, 5129-5135.
- Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Das, S., Cui, J., Talantova, M. V., Wong, H. K., Gong, X., Chan, S. F., Zhang, D., Nakanishi, N., Sucher, N. J. and Lipton, S. A., 2002. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol.* 87, 2052-2063.
- Siegel, S., 1974. Flavor preexposure and "learned safety". *J Comp Physiol Psychol.* 87, 1073-1082.
- Tsien, J. Z., 2000. Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Curr Opin Neurobiol.* 10, 266-273.
- Woodhall, G., Evans, D. I., Cunningham, M. O. and Jones, R. S., 2001. NR2B-containing NMDA autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. *J Neurophysiol.* 86, 1644-1651.

A)



B)



NR2A

n=4

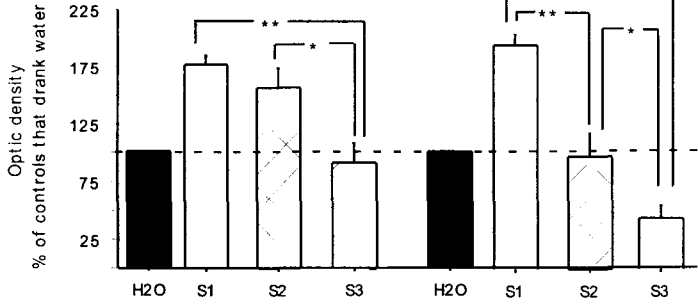
H2O S1 S2 S3

NR2B

n=4

H2O S1 S2 S3

180kd 180kd



NR2A

n=6

H2O S1 S2 S3

NR2B

n=5

H2O S1 S2 S3

180kd 180kd

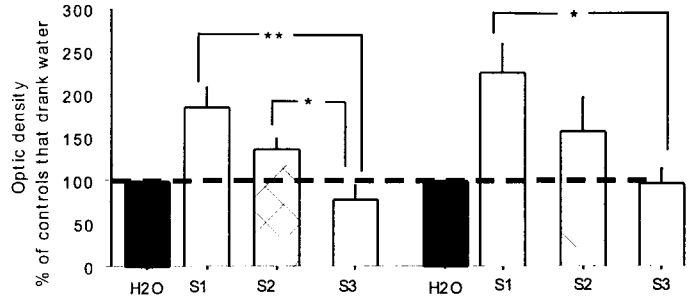


FIGURE 1

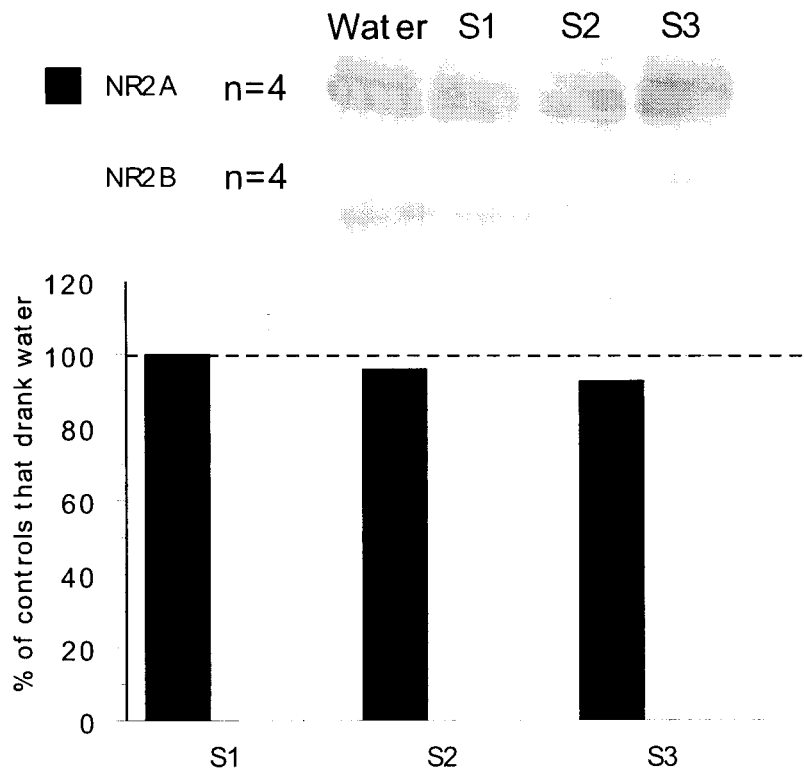


FIGURE 2

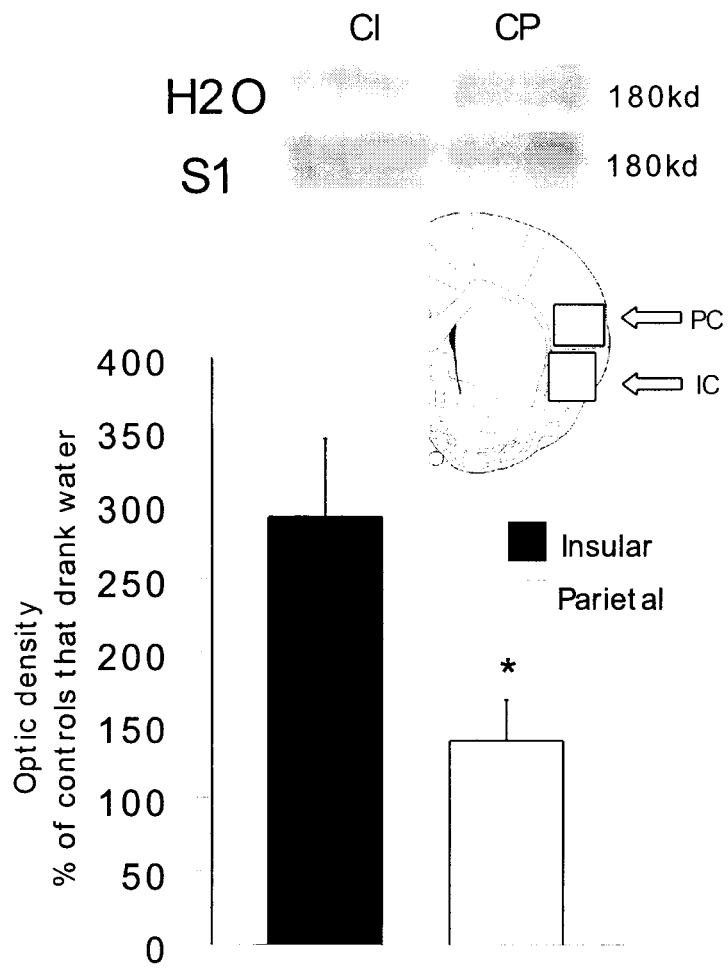


FIGURE 3

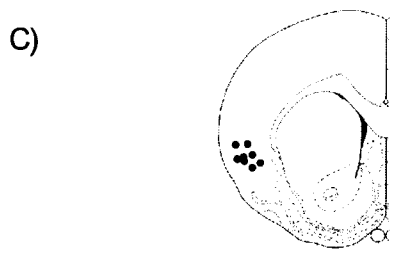
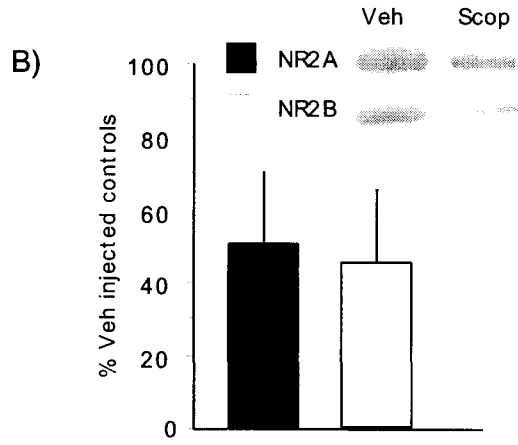
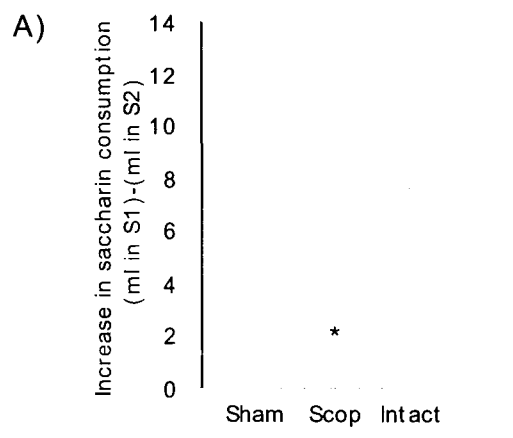


FIGURE 4

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Taste novelty induces neophobia and increases the presence of NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor in the DRM fraction in a familiarity dependent manner after consumption of 0.1% (A) or 0.25% (B) saccharin. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$. For this figure and the following figures S1, S2 and S3, are the first, second and third taste presentations (see methods).

Figure 2. The total amount of NR2A and NR2B protein in the IC is not affected by the level of taste familiarity.

Figure 3. The presence of NR2B in DRM after consumption of novel 0.1% saccharin (S1) is lower the parietal cortex (PC) adjacent to the IC, than in the IC. * $p < 0.05$

Figure 4. A) Scopolamine injection in the IC blocks attenuation of neophobia. The graphs show the difference in saccharin consumption between the first and the second presentation of the taste. Scopolamine injected animals did not increase their saccharin consumption in S2 B) Scopolamine injection in the IC impairs the increase in NR2A and NR2B in DRM C) The dots stand for representative cannulae placement.