



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS  
ERK1/2 Y ARC DURANTE LA FORMACIÓN  
DE LA MEMORIA GUSTATIVA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**JULIO CÉSAR CHÁVEZ  
HURTADO**



Tutor: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ERK1/2 Y ARC DURANTE LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA GUSTATIVA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Federico Bermúdez Rattoni en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Federico Bermúdez Rattoni	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. María De Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce el apoyo técnico en el laboratorio de la Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos, la Dra. Israela Balderas, la Q.F.B Perla Moreno Castilla y de Oreste Carbajal.

El proyecto fue apoyado económicamente por CONACYT (60478) y DGAPA-UNAM (IN216709). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Gohar Gevorgyan Markosain	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Rosalinda Guevara Guzmán	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	3
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>APRENDIZAJE Y MEMORIA</b> .....	8
<b>MEMORIA DE RECONOCIMIENTO GUSTATIVO</b> .....	9
<b>CORTEZA INSULAR Y AMÍGDALA</b> .....	12
<b>CONSOLIDACION DE LA MEMORIA</b> .....	16
<b>ERK Y MEMORIA</b> .....	17
<b>ARC Y MEMORIA</b> .....	20
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	23
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	24
<i>Animales.</i> .....	24
<i>Procedimiento conductual.</i> .....	24
<i>Extracción de estructuras cerebrales.</i> .....	25
<i>Western Blot.</i> .....	26
<i>Análisis estadístico.</i> .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	28
Activación de ERK1/2 en la corteza insular durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo pero no durante el CAS. ....	28
Expresión de Arc en la corteza insular durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS. ....	29
Activación de ERK1/2 en la amígdala durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS. ....	31
Expresión de Arc en amígdala durante el reconocimiento de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS. ....	32
<b>DISCUSIÓN</b> .....	34
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	45

## INTRODUCCIÓN

La memoria es esencial para muchos de los aspectos que utilizamos a diario, nos permite recordar cualquier evento que nos ha ocurrido. Si intentamos recordar lo que desayunamos hoy, cómo llegar al trabajo o a la casa, o cómo andar en bicicleta, hacemos uso de la memoria. Es decir, se trata de información que el cerebro recibe, procesa y almacena para después poder utilizarla cuando se necesite. Pensemos en el primer día de clases o en la fiesta de cumpleaños del año pasado, esos son algunos ejemplos de acontecimientos almacenados en nuestra memoria.

Desde hace mucho tiempo, filósofos y científicos se preguntaban en que parte del cuerpo humano se almacenan las experiencias, los hechos y las habilidades. Inicialmente, se pensó que las representaciones internas y las memorias eran atribuidas a órganos como el corazón o el riñón. No es hasta la época medieval cuando se comienza a apreciar que los procesos mentales, incluyendo la memoria, deben ser representados en el cerebro. Ya en el siglo XX, es Lashley quien adopta el término “engrama” para tratar de describir el lugar y el mecanismo de almacenamiento de la información en el sistema nervioso central. Con ello, se comienza a estudiar e identificar las bases de la memoria en el cerebro (Hubener y Bonhoeffer, 2010).

Tiempo después, diversos investigadores continuaron esta línea intentando encontrar y entender como se forma y almacena la memoria, Cajal fue el primero en proponer que los sitios de contacto entre neuronas (sinapsis) podrían jugar un papel importante en el almacenamiento de la memoria. Posteriormente, la propuesta específica de Donald Hebb ("sinapsis hebbiana") sobre un mecanismo sináptico que pudiera explicar como la información puede ser almacenada en el cerebro (Hebb, 1949) fue una de las más importantes contribuciones hechas al estudio de la memoria (Hubener y Bonhoeffer, 2010).

Tomando en cuenta estas ideas, más su estudio en modelos animales y en pacientes con lesiones cerebrales, permitieron identificar regiones cerebrales relevantes para los procesos de aprendizaje y memoria (Squire et al., 2001).

Durante el avance de la investigación sobre los mecanismos biológicos que subyacen el aprendizaje y la memoria, se han abierto algunas oportunidades para el descubrimiento de tratamientos farmacológicos útiles para desordenes o daños cognitivos (Roesler y Schroder, 2011). Al estudiar las bases neurobiológicas de la memoria se ha llegado a la identificación de diferentes candidatos moleculares y maquinarias celulares claves para la formación de la memoria que pueden ser utilizados como blanco para el tratamiento de distintas enfermedades cognitivas que van desde el retraso mental hasta la aparición de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Nelson y Turrigiano, 2008). Por lo tanto, el entender cómo se llevan a cabo los distintos procesos celulares y cómo son traducidos en cambios permanentes a largo plazo en la conectividad sináptica es uno de los más importantes retos que existe en la neurociencia básica.

## APRENDIZAJE Y MEMORIA

El aprendizaje es la adquisición de información acerca de un evento ocurrido que permite a los organismos interactuar con el medio de un modo más eficaz. Para que esta información pueda ser utilizada en cualquier momento, los organismos han desarrollado la habilidad de poder almacenar y mantener esta información a lo largo del tiempo, a este proceso se le ha llamado memoria (Kandel et al., 2000).

Para tratar de entender cómo se lleva a cabo el almacenamiento y formación de la memoria, su estudio se ha dividido en distintas fases, de esta manera se ha definido que en la fase de *adquisición* se realiza la entrada de información al sistema, y el estímulo ambiental es reconocido como nuevo o familiar, este proceso continúa con la *consolidación* durante la cual la información pasa a un código cerebral que la

almacenará y así podrá permanecer a largo plazo. Dudai ha definido ha esta fase como una estabilización progresiva post-adquisitiva de la información. Por último, tenemos la fase de recuperación o evocación de la información la cual consiste en emplear la información que fue adquirida (Dudai, 2004; Kandel et al., 2000).

## MEMORIA DE RECONOCIMIENTO GUSTATIVO

Existen diferentes categorías de memoria dependiendo del tipo de información que se esta codificando y almacenando. Una de estas categorías se refiere a la memoria de reconocimiento, que permite discriminar entre algo nuevo o familiar, o bien, permite percibir la familiaridad de las cosas que previamente se han experimentado. En el caso de la comida, una de las habilidades más importantes que los animales han desarrollado a lo largo del tiempo es la memoria de reconocimiento gustativo, ya que es esencial para distinguir recursos que aportan ciertos nutrientes o evitar los que pueden involucrar toxinas (Bermúdez-Rattoni, 2004).

El sentido del gusto en humanos es principalmente usado para mejorar el placer hedónico de la comida, ya sea recordando el sabor amargo del café por la mañana o quizás el sabor salado de unas papas fritas en la comida. El sistema gustativo confiere a los animales la habilidad de poder detectar características químicas al contacto con los recursos, distinguir entre lo apetecible y lo no apetecible, y poder experimentar sabores agradables y evitar ciertas toxinas. Mientras que otros sistemas como el olfatorio y la visión participan en el reconocimiento de recursos nutritivos para el organismo, el sistema gustativo es quién al final acepta cierta comida o genera conductas que eviten la interacción con ciertas toxinas, permitiendo así la sobrevivencia del organismo (Scott, 2005).

La exposición a una sustancia comestible por primera vez puede afectar su subsecuente ingesta, es decir, al ingerir una pequeña cantidad de alimento por primera vez, su posterior ingesta puede aumentar o disminuir dependiendo de sus

consecuencias gástricas (Bermúdez-Rattoni, 2004). En condiciones de laboratorio, cuando a un animal se le presenta un sabor por primera vez, éste duda en ingerirlo mostrando un consumo reducido (a lo que llamamos neofobia). Ahora bien, si después de apreciar el sabor no se presentan consecuencias negativas, este estímulo gustativo será reconocido como seguro y en las subsecuentes presentaciones se incrementará su consumo, presentándose así un fenómeno de atenuación de la neofobia (AN) (Domjan, 1977; Bermúdez-Rattoni, 2004). Por el contrario, si el sabor presentado por primera vez es asociado a consecuencias negativas, por ejemplo malestar gástrico (inducido por la inyección intraperitoneal de LiCl), el estímulo será reconocido como aversivo y en una segunda presentación del sabor el animal lo rechazará mostrando una aversión prolongada hacia él. Esta forma de memoria de reconocimiento es conocida como condicionamiento de aversión al sabor (CAS), en el cual el sabor es el estímulo condicionado (EC) y la inducción del malestar gástrico el estímulo incondicionado (EI) (García et al., 1955; Bermúdez-Rattoni, 2004, ver figura 1).

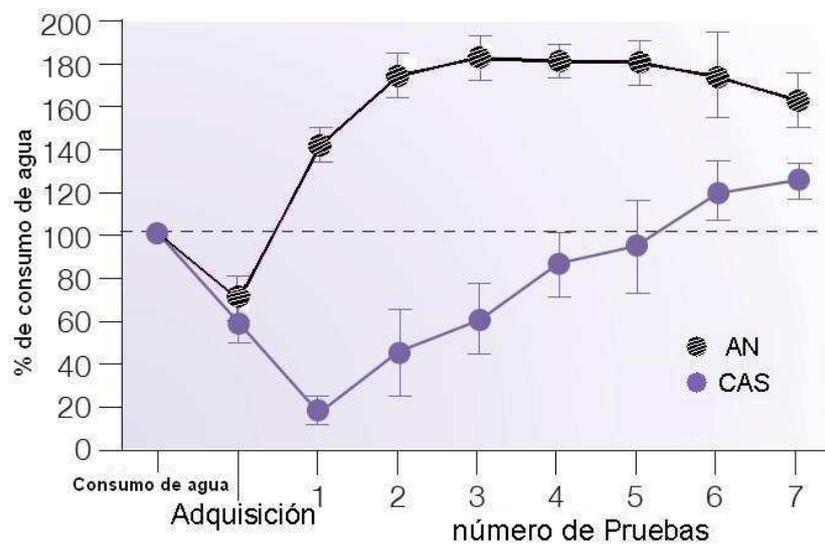


Fig. 1. Dos distintos tipos de memoria, el consumo de agua se representa como el 100% de consumo, la AN representa el aprendizaje de un estímulo gustativo seguro (línea negra) y el CAS representa el aprendizaje de un estímulo gustativo asociada a aversión (línea gris). La primera vez que se presenta el sabor representa la adquisición del estímulo y sus subsecuentes presentaciones (pruebas) representan la formación de una memoria segura o asociada a aversión dependiendo de las consecuencias gástricas (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

El reconocimiento del sabor comienza en la lengua, donde las células gustativas (papilas) detectan las características químicas (Lindemann, 1996; Margolskee, 2002). Las células gustativas en mamíferos no son neuronas y no envían proyecciones axonales al cerebro. En cambio, ellas generan potenciales de acción y liberación de neurotransmisores en respuesta a las características químicas del sabor, y su actividad es transmitida hacia las neuronas que inervan las papilas gustativas. La inervación de las papilas gustativas se lleva a cabo por las fibras sensoriales de tres nervios craneales que son, facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X) (Scott, 2005). Los tres nervios envían la información gustativa hacia la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NTS). A partir del NTS sus neuronas proyectan hacia el núcleo parabraquial posteromedial (PBN) en su subnúcleo dorsolateral, desde ahí hacia el hipotálamo lateral, a la amígdala central (CEA) y basolateral (BLA) y a la parte parvocelular del núcleo posteromedial ventral del tálamo (VPM), y del VPM hacia la corteza insular gustativa (CI), particularmente en su región agranular (Bermúdez-Rattoni, 2004). En el caso de que un estímulo incondicionado o visceral sea asociado, su procesamiento inicia en la parte caudal del NTS al recibir proyecciones tanto de las ramas hepáticas del nervio vago, que son sensibles a irritación gástrica, como del área postrema que es sensible a toxinas que pueden estar presentes en la sangre. Las proyecciones del NTS llegan a la parte lateral del núcleo parabraquial, a la CEA y al núcleo hipotalámico paraventricular, también de la porción lateral del núcleo parabraquial surgen proyecciones a la parte ventral posterolateral del tálamo (VPL), que junto con la CEA presenta eferencias hacia la CI en su porción caudodorsal (Bermúdez-Rattoni, 2004; Scott, 2005, ver figura 2).

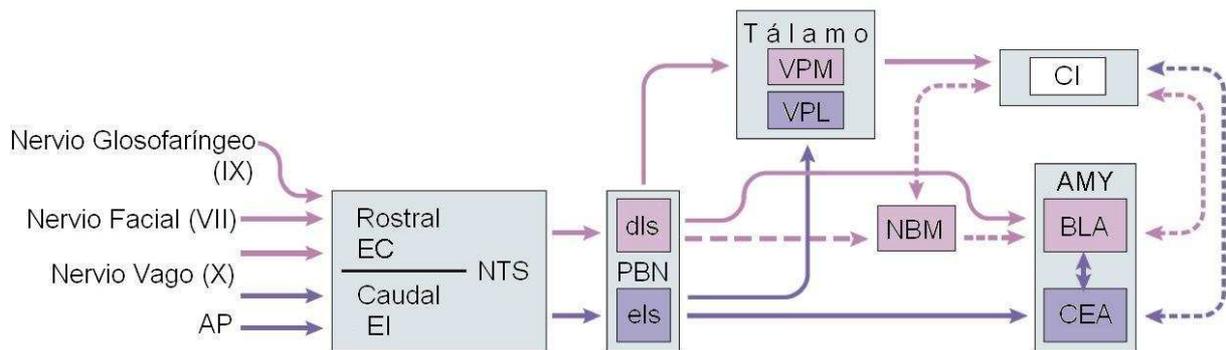


Fig. 2. Esquema de las principales vías cerebrales que procesan el estímulo visceral y el estímulo gustativo. Amígdala (AMY); área postrema (AP); amígdala basolateral (BLA); amígdala central (CEA); estímulo condicionado (EC); estímulo incondicionado (EI); subnúcleo dorsolateral (dls); subnúcleo extrolateral (els); corteza insular (CI); núcleo basal magnocelular (NBM); núcleo del tracto solitario (NTS); núcleo parabraquial (PBN); núcleo posterolateral ventral del tálamo (VPL); núcleo posteromedial ventral del tálamo (VPM). Las líneas continuas representan proyecciones que se conoce llevan la información gustativa o visceral. Las líneas punteadas representan proyecciones que se sabe están involucradas en el CAS pero la naturaleza de la información sensorial es desconocida (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

## CORTEZA INSULAR Y AMÍGDALA

Durante décadas de investigación se ha llegado a la idea de que diferentes tipos de memoria requieren de diferentes áreas cerebrales para su codificación y almacenamiento. Por ejemplo, es ampliamente aceptado que la CI es requerida para memorias de reconocimiento gustativo (Yamamoto et al., 1994; Accolla et al., 2007), el hipocampo es clave para el almacenamiento de información contextual (Best et al., 2001), mientras que la amígdala (AMY) se requiere para memorias que contienen componentes emocionales, tales como el condicionamiento al miedo (Phelps y LeDoux, 2005).

En el caso de la CI, esta es un área multimodal que responde tanto a estímulos gustativos como a estímulos mecánicos, térmicos, viscerales y nociceptivos (Hanamori et al., 1998). Esta estructura se ha diferenciado citoarquitectónicamente en tres áreas: granular, disgranular y agranular (Ogawa et al., 1990). Dentro de la

CI se localiza la corteza gustativa, específicamente en el área disgranular (Ogawa et al., 1990; Kosar et al., 1986). Esta región cortical es la encargada de responder a estímulos gustativos, se localiza dorsalmente al surco rinal, aproximadamente en la intersección de la vena rinal (rhv) con la arteria cerebral media (mca) (Kosar et al., 1986, ver figura 3).

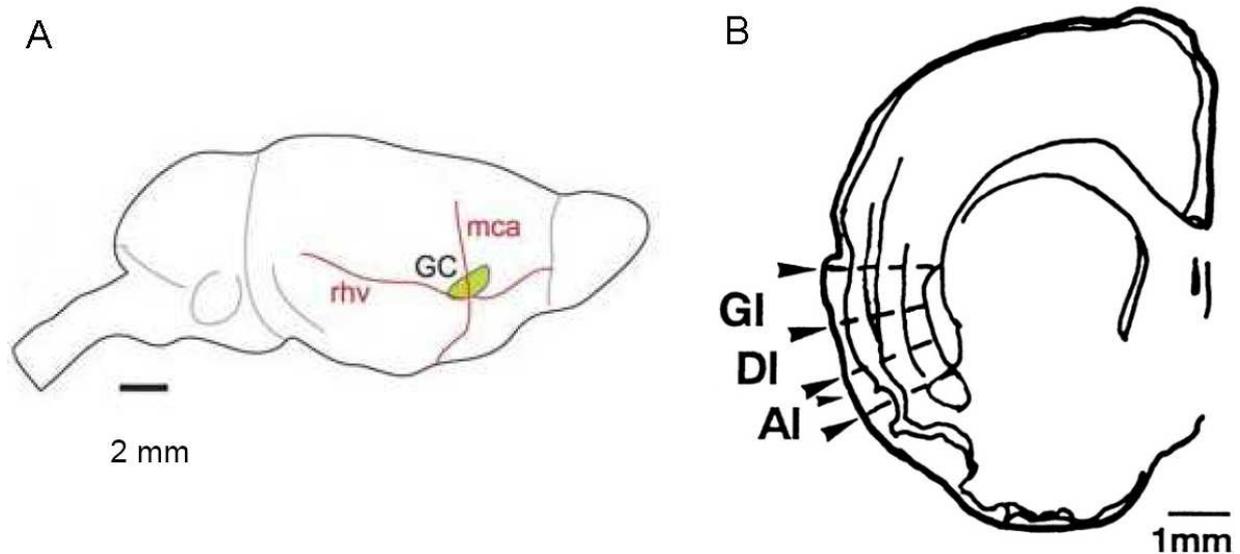


Fig. 3. (A) Localización de la corteza gustativa (GC) dentro de la corteza insular de rata en la intersección de la vena rinal (rhv) y la arteria cerebral media (mca) (Modificado de Accolla et al., 2007). (B) Corte coronal indicando las distintas regiones de la corteza insular, región granular (GI), disgranular (DI) y agranular (AI) (Modificado de Ogawa et al., 2000).

La corteza gustativa ha sido implicada en la adquisición, consolidación y retención de la memoria gustativa (Rosenblum et al. 1995; Yamamoto et al. 1994). Se ha reportado en ratas que mediante la exposición a un sabor nuevo, se liberan diferentes neurotransmisores y se activan diversas cascadas de señalización intracelular en esta corteza gustativa, siendo necesarios estos eventos para la codificación y almacenamiento de la memoria gustativa a largo plazo (Berman et al. 2000; Ferreira et al. 2002; Gutiérrez et al. 1999; Rosenblum et al. 1997). Además, se ha observado que ablaciones (Braun et al., 1972), lesiones excitotóxicas (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991), inactivación temporal (Buresova y Bures, 1973; Gallo et al., 1992), e inhibición de la síntesis de proteínas en esta estructura (Naor y Dudai,

1996; Rodríguez-Ortiz et al., 2005) bloquean el aprendizaje del CAS e impiden que la memoria pueda almacenarse. La corteza gustativa presenta densas fibras que se conectan con estructuras subcorticales. Una de ellas es la AMY, la cual recibe aferencias de esta corteza (Yamamoto et al., 1984). Estas conexiones corticales que llegan a neuronas que responden al estímulo gustativo en la AMY pueden procesar la información junto con la corteza gustativa para poder almacenar la memoria (Yamamoto, 1984).

Ahora bien, la AMY forma parte del lóbulo temporal medial y es anatómicamente compleja (Price, 2003) ya que consiste de 13 núcleos que a su vez se subdividen en dos o más subnúcleos (McDonald, 1997; Sah et al., 2003). Estos núcleos y subnúcleos se distinguen en base a las conexiones que realizan entre ellos, a su histoquímica y citoarquitectura. Comúnmente se dividen en 3 grupos: el grupo basolateral, el grupo tipo-cortical y el grupo centromedial (Sah et al., 2003) como se puede observar en la figura 4. El significado funcional de cada grupo ha sido evaluado mediante protocolos que inducen déficit en distintas tareas conductuales (Yamamoto et al., 1994). Por ejemplo, el núcleo central de la amígdala (CEA) es importante en el condicionamiento de tareas de prevención pasiva (Rassouli et al., 2010) y necesario para que se forme el CAS (De la Cruz et al., 2008; García-De la Torre et al., 2009); mientras que el núcleo basolateral (BLA) participa en la adquisición y retención del CAS (Ferreira et al., 2005). Tomando en cuenta estos estudios, es claro que la AMY juega un papel clave en la formación de la memoria gustativa.

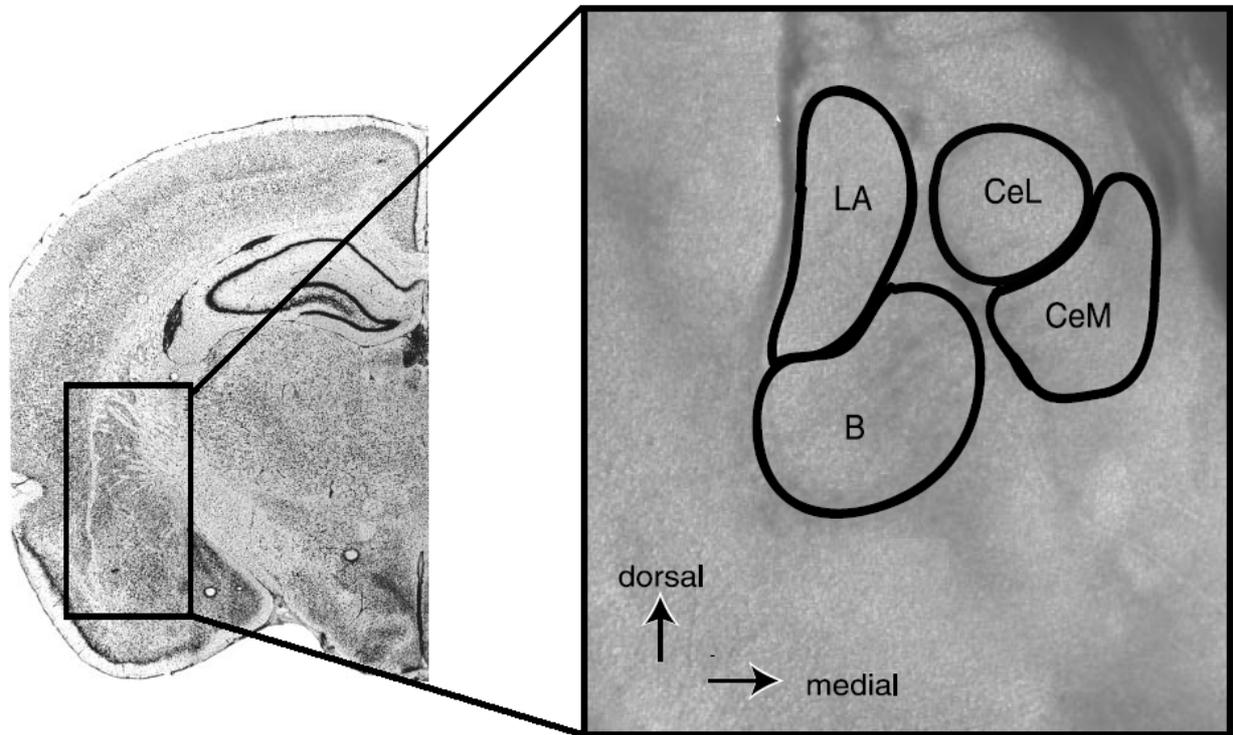


Fig. 4. Sección coronal donde se muestra la localización aproximada de los núcleos del complejo amigdalino en el cerebro de rata. Las áreas delineadas componen al núcleo basolateral (BLA) formado por los subnúcleos lateral (LA) y basal (B). En el caso del núcleo central (CEA) este se forma por los subnúcleos lateral (CeL) y medial (CeM) (Modificado de Sah et al., 2003).

Por otro lado, lesiones combinadas de la corteza gustativa y la AMY bloquean completamente la adquisición del CAS (Yamamoto et al., 1994) demostrando una necesidad de ambas estructuras para este tipo de memoria. Estudios que utilizan modelos de potenciación a largo plazo (LTP, modelo experimental de memoria), han demostrado que estimulando la proyección que existen entre la AMY y la CI antes de la adquisición del CAS, favorece la retención de esta tarea (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Bermúdez-Rattoni, 2004). Por ello, tanto a la CI como a la AMY se les ha considerado estructuras claves para la consolidación de la memoria gustativa, además de existir una relación importante entre ambas estructuras. Actualmente, los estudios sobre los sustratos neuronales que llevan a cabo la codificación y almacenamiento de la memoria han avanzado notablemente. Hasta aquí es claro

qué estructuras pueden estar llevando a cabo el procesamiento, pero hoy en día aún no se entiende completamente como se lleva a cabo dicho procesamiento.

## CONSOLIDACION DE LA MEMORIA

Particularmente se ha enfatizado el estudio de la memoria en la fase de consolidación o formación, ya que esta fase es la que inicia el almacenamiento de la información y permite que se pueda mantener a lo largo del tiempo. La hipótesis de la consolidación de la memoria —la cual postula que la formación de nuevas memorias se produce en diversas etapas y que estas memorias se van estabilizando y reforzando con el paso del tiempo— ha guiado la investigación actual respecto a las bases neurobiológicas del aprendizaje y la memoria (Lechner et al., 1999). A partir del estudio de la consolidación se descubrió que existen dos formas de almacenamiento de la memoria: memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP), ya que se observó que los inhibidores de la síntesis de proteínas no impiden la adquisición del aprendizaje, sino que bloquean la fase de consolidación de la memoria (Rosenblum y Dudai, 1993), afectando solo el almacenamiento de la MLP y no el de la MCP (Davis y Squire, 1984; McGaugh, 1966). A partir de estos estudios, se han enfocado distintas investigaciones en la identificación y entendimiento de los mecanismos moleculares que pueden estar ocurriendo durante esta fase de consolidación (McGaugh, 2000).

Se ha propuesto que dentro de estos mecanismos de consolidación se requieren cambios rápidos pero persistentes en los circuitos cerebrales que permitirían el almacenamiento de la información (Bailey y Kandel, 1993). Esta propuesta parte de los postulados de Hebb, en los cuales, propone a grandes rasgos que cuando un axón de la célula A está lo suficientemente cerca para excitar a la célula B, y repetida o persistentemente provoca su activación, algún proceso o cambio metabólico ocurrirá en una o ambas células provocando que se incremente la eficiencia de la célula A para excitar a la célula B (Hebb, 1949). Así, la consolidación de la información se basaría en la actividad neuronal que estaría dependiendo de los cambios bioquímicos

y fuerza en las conexiones sinápticas que ocurren entre las neuronas que están siendo activadas (Adams y Sweatt, 2002).

Partiendo de esta idea, las vías de transducción de señales, así como la expresión génica y la consecuente síntesis de proteínas que son componentes integrales de la maquinaria de procesamiento de la información neuronal son candidatos importantes en el estudio de la consolidación de la memoria.

## ERK Y MEMORIA

A nivel bioquímico, el aprendizaje gustativo ha sido relacionado con cambios que ocurren en distintas cascadas de señalización intracelular (Dudai, 2004). Dentro de estas cascadas de señalización una de las más estudiadas actualmente es la vía de ERK (Peng et al., 2010).

ERK pertenece a la superfamilia de MAPK, la cual es una familia altamente conservada de enzimas asociada a receptores de membrana celular y reguladora de diversos blancos intracelulares (Sweatt, 2004). ERK es activada por distintos factores de crecimiento, sustancias que promueven la actividad mitótica y señales extracelulares que van de la superficie celular al núcleo, por lo cual es clave en procesos de proliferación y diferenciación (Peng et al., 2010). Además, por medio de la estimulación farmacológica, se ha observado que la activación de ERK puede ocurrir en respuesta a la estimulación de receptores NMDA por glutamato (Glu) (Fiore et al., 1993), receptores muscarínicos de Ach (acetilcolina) (Scheiderer et al., 2008) y receptores metabotrópicos de dopamina (Nagai et al., 2007).

Las proteínas ERK son cinasas de serinas/treoninas, existen distintas isoformas, pero las más estudiadas y relacionadas con aprendizaje y memoria son dos, ERK1 (44kD) y ERK2 (42kD), ambas isoformas son idénticas en un 84% y comparten muchas funciones (Lloyd, 2006), por esta razón se les ha designado como ERK1/2 de

manera general. Sus funciones tanto a nivel celular como fisiológico son diversas, ya que modulan el ciclo celular, proliferación, transcripción, diferenciación y muerte celular entre otras (Ramos, 2008). De manera general, la activación de ERK puede ocurrir por medio de varias vías: (1) activación de Ras por medio de la estimulación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK): factor de crecimiento → RTK → Ras → Raf-1 → MEK → ERK; (2) activación de Ras por entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ; (3) activación de ERK por la cinasa PKC; y (4) activación de ERK por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Peng et al., 2010).

La señalización de ERK se distingue por una vía característica de 3 cinasas que es activada vía receptores de superficie celular en respuesta a estímulos extracelulares. Una vez que la estimulación de receptores ocurre, el intermediario que conecta la cascada de señalización con la vía de ERK es Ras. Ésta es una GTPasa pequeña que es activada al favorecerse el intercambio de GDP por GTP promoviéndose su forma activa Ras-GTP. Ya en la vía de ERK, la primer cinasa que se activa es Raf-1 por medio de Ras-GTP, una vez que Raf-1 es activada ésta puede inducir la fosforilación de la segunda cinasa, MEK, la cual es activada por una doble fosforilación en serina/treonina. Esta cinasa dual por último activará a ERK1/2 también por una fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina (Sweatt, 2001). Una vez activada, ERK1/2 puede ejercer algunos efectos río abajo, ya que puede activar la transcripción de diferentes proteínas del citoesqueleto tales como MAP2 y sinapsina (Yoon y Seger, 2006); puede translocarse al núcleo (Horgan y Stork, 2003; Patterson et al., 2001) y activar distintos factores de transcripción, tales como Elk-1 (del inglés Ets-like transcription factor) y CREB (proteína de unión a CRE) (Davis et al., 2000); o puede modular la traducción de proteínas al regular el factor de inicio de la traducción eIF4E (Kelleher et al., 2004). Estos efectos desencadenarían cambios en la expresión génica, activando por ejemplo genes de expresión temprana (Waltereit et al., 2001), que provocarían los cambios estructurales necesarios para mantener la información almacenada. Dadas estas características, se le ha considerado ser una

vía de señalización importante durante los mecanismos celulares necesarios para que la formación de la memoria ocurra.

Los primeros trabajos que relacionan a ERK con procesos de aprendizaje y memoria parten de los trabajos en los que se demuestra que la vía de ERK es necesaria para procesos de división celular y proliferación. Dada la posibilidad de que estos procesos pudieran estar ocurriendo en el sistema nervioso central, y el hecho de se habían observado componentes de esta vía de señalización en cuerpos celulares neuronales y dendritas en neocorteza e hipocampo de cerebro de rata (Fiore et al., 1993), surge la idea de que esta vía pudiera estar participando en presencia de actividad neuronal. Posteriormente, en 1997 English y Sweatt demuestran que ERK es activado durante la inducción de LTP en el hipocampo y que la inhibición de esta vía bloquea su formación. Con el paso del tiempo, diversos estudios han demostrado que la cascada de ERK es una vía clave en aprendizaje y memoria (Adams y Sweatt, 2002; Peng et al., 2010). Además, está implicada tanto en plasticidad sináptica (English y Sweatt, 1997; Impey et al., 1998; Sweatt, 2004), como en la consolidación de diferentes tipos de memoria (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 1999), incluyendo memorias gustativas (Berman et al., 1998).

Particularmente, una activación significativa de ERK1/2 ha sido observada en la CI después de la presentación de un estímulo gustativo nuevo, incluso se ha demostrado que la inhibición de ERK1/2 en esta estructura impide la formación del CAS cuando se hace una prueba de memoria 120 horas después del entrenamiento (Berman et al., 1998; Belevsky, 2005). También, se ha observado que esta proteína se activa transitoriamente en la AMY lateral 60 min después de la adquisición de un condicionamiento al miedo (Schafe et al., 2000). Incluso durante la consolidación de este condicionamiento se ha observado un aumento en la expresión de la proteína Arc que depende de la activación de ERK1/2 y que ésta se requiere en la formación de la memoria largo plazo (Ploski et al., 2008).

## ARC Y MEMORIA

Dentro de los mecanismos moleculares que ocurren para que la memoria sea mantenida a lo largo del tiempo, es necesario que ocurran modificaciones persistentes de la sinapsis. Comúnmente, algunos de los cambios que mantienen esta persistencia dependen de la rápida inducción de la transcripción génica y la subsecuente síntesis de proteínas. Por ello, varios estudios se han enfocado en la descripción de los mecanismos moleculares inmediatos que median el fortalecimiento de los estímulos aprendidos. Además de tratar de entender los cambios post-adquisición dependientes de la transcripción génica necesarios para la formación de la memoria.

Las primeras evidencias respecto a la relación entre una intensa actividad sináptica y una rápida y transitoria expresión génica vienen de los estudios que involucran genes de expresión temprana (IEG) tales como *c-fos* (Morgan et al., 1987). Por ejemplo, se demostró que en respuesta a la activación de receptores colinérgicos, el flujo de calcio induce una rápida transcripción de IEG tales como *c-fos*, lo cual sugirió un mecanismo capaz de relacionar la actividad eléctrica con la regulación génica (Greenberg et al., 1986). Poco después, se observó que más IEG eran inducidos por actividad, en particular, por la estimulación inducida por LTP (Cole et al., 1989). Un IEG se define como un gen activado de manera rápida y transitoria a nivel transcripcional debido a algún tipo de estimulación como sináptica, de neurotransmisión o por la señal de algún factor de crecimiento, que no requiere de síntesis de nuevas proteínas o una activación previa de otros genes (Miyashita et al., 2008; Sheng y Greenberg, 1990). Cuando estos IEG codifican para ciertos factores de transcripción se les llama IEG "reguladores", y cuando codifican para un rango diverso de proteínas tales como factores de crecimiento (BDNF), moléculas de transducción de señales (Rheb), ó proteínas de superficie celular (Arcadlina), se les llama IEG "efectores" (Guzowski et al., 2002). Esto sugiere que dichos IEG pueden dirigir la expresión génica (IEG reguladores) o tener un papel directo en el

fortalecimiento sináptico (IEG efectores) que es necesario para que la información se mantenga a lo largo del tiempo (Tzingounis y Nicoll, 2006). A partir de esta idea, la investigación se centró en la identificación de IEG que pudieran tener un papel importante en la formación de la memoria. En 1998 Worley y colaboradores, usando técnicas de hibridación sustractiva, identificaron ciertos IEG después de la estimulación eléctrica en el hipocampo (Guzowski, 2002), dentro de estos IEG se encontró el gen *arc* (Lyford et al., 1995).

El gen *arc* (del inglés activity-regulated cytoskeletal associated), es un IEG efector, del cual la expresión de su RNA y proteína se observan tanto en soma como en dendritas de neuronas (Lyford et al., 1995). El mRNA de *arc* es rápidamente inducido por patrones de actividad sináptica, incluyendo estímulos ambientales, LTP, convulsiones y paradigmas conductuales relacionados con aprendizaje y memoria (Guzowski, 2002). Particularmente, el mRNA de *arc* se transporta a dendritas donde se localizan las sinapsis que fueron recientemente activadas por algún estímulo, ya en estas dendritas una vez que ocurre la traducción del mRNA, la proteína Arc puede interactuar con proteínas del citoesqueleto así como con proteínas involucradas en plasticidad sináptica (Bramham et al., 2010; Steward et al., 1998; Steward y Worley, 2001). Además, se ha observado que los niveles de mRNA de *arc* aumentan durante condiciones que inducen plasticidad sináptica a largo plazo (Steward et al., 1998; Moga et al., 2004), y la inhibición del mRNA de *arc* por medio de la microinyección de oligonucleótidos antisentido en el hipocampo impide la consolidación de la memoria y la plasticidad sináptica en el giro dentado (Guzowski, 2002). Por ello, se piensa que *arc* es importante para la plasticidad que ocurre específicamente en la sinapsis y puede ayudar a explicar como la transcripción de genes en el núcleo conduce a alteraciones a largo plazo en sitios específicos de sinapsis activas (Steward y Worley, 2002).

Como hemos mencionado, el mRNA de *arc* se expresa rápidamente en neuronas que se activan después de alguna estimulación, ya sea por un aprendizaje, por

estimulación tetánica o por factores de crecimiento como BDNF (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward et al., 1998; Waltereit et al., 2001; Ying et al., 2002; Kubik et al., 2007). Sin embargo, es importante hacer notar que las cascadas de transducción de señales que conectan la actividad sináptica con la rápida transcripción de IEG (como *arc*) en el núcleo después de un aprendizaje no están descritas completamente. Se ha observado que la activación de receptores NMDA y de la cinasa ERK son necesarios para que la transcripción de *arc* ocurra después de la inducción de LTP (Steward et al., 1998; Steward y Worley 2001; Panja et al., 2009). Además, ERK1/2 parece tener una función coordinada con Arc, ya que es necesaria su activación para que pueda llevarse a cabo la transcripción de *arc* después del aprendizaje de una tarea (Waltereit et al., 2001). Por ello, es importante investigar la relación que puede estar ocurriendo entre la activación de ERK1/2 y la expresión de Arc después de la estimulación sináptica inducida por el aprendizaje.

## RESUMEN

La corteza insular y la amígdala son dos áreas cerebrales importantes involucradas en la formación de la memoria gustativa. Este aprendizaje es un fenómeno que ocurre de manera rápida y robusta, debido al hecho de que la sobrevivencia del organismo depende de lo que ingiere día a día. Distintos estudios han descrito la importancia de ciertos genes de expresión temprana así como vías de señalización que intervienen en los mecanismos celulares necesarios para la formación de la memoria gustativa. En particular, la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) junto con la proteína cinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2) han sido implicadas en diferentes procesos de plasticidad sináptica, tales como potenciación a largo plazo, aprendizaje y memoria. Sin embargo, el papel detallado de estas proteínas durante los procesos que se llevan a cabo en la formación de la memoria gustativa aún no se entiende completamente. En este trabajo, investigamos la participación específica de Arc y ERK1/2 en la amígdala y la corteza insular, por medio de su inmunodetección utilizando la técnica de Western Blot, durante la formación de la memoria gustativa. Los resultados muestran cambios región-específicos en la expresión de Arc y en la activación de ERK1/2 durante el aprendizaje gustativo. La presentación de un estímulo gustativo nuevo induce un incremento en la expresión de Arc y la activación de ERK1/2 en la corteza insular y no en la amígdala. Interesantemente, cuando el estímulo gustativo nuevo es asociado a aversión ocurre lo contrario, observamos un incremento en la expresión de Arc en la amígdala pero no en la corteza insular. En el caso de ERK1/2, su activación no ocurre e incluso sus niveles basales de fosforilación disminuyen en la corteza insular. Estos resultados sugieren que en las diferentes estructuras cerebrales dependiendo del contenido de información que se este almacenando, ya sea de un estímulo gustativo nuevo o asociado a aversión, ocurren cambios temporales específicos en la expresión de Arc y en la fosforilación de ERK1/2 durante la formación de la memoria gustativa.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que diferentes tipos de memoria requieren distintas áreas cerebrales para su consolidación. La CI y la AMY son estructuras que han sido ampliamente relacionadas con la codificación y almacenamiento del CAS. Además, los mecanismos moleculares y bioquímicos a nivel celular son elementos importantes durante eventos de plasticidad sináptica como la consolidación de la memoria. La modulación de las proteínas ERK1/2 y Arc puede ocurrir durante dichos mecanismos, llevando a cabo cambios necesarios para el fortalecimiento de la memoria. Poco se ha estudiado sobre estas proteínas durante la consolidación de la memoria en regiones como la AMY e incluso su estudio ha sido sólo en tareas conductuales de condicionamiento al miedo (Schafe et al., 2000; Ploski, 2008). Por lo tanto, el estudio de la actividad de ERK1/2 y la expresión de la proteína Arc durante la consolidación de memorias de reconocimiento gustativo sería una de las primeras aproximaciones para conocer la contribución de estas proteínas en los cambios plásticos que ocurren para la formación de la memoria.

Así, el presente estudio examina los cambios que pueden ocurrir en la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de Arc en la AMY y en la CI durante la consolidación de la memoria gustativa segura y aversiva.

## **HIPÓTESIS**

- En la CI y la AMY habrá cambios en la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de Arc durante la formación de memorias gustativas, estos cambios de ambas proteínas se observarán en la AMY únicamente durante la formación de una memoria gustativa de aversión y en la CI tanto en la formación de una memoria gustativa segura como en una memoria de aversión.

## **OBJETIVOS**

- Evaluar la actividad de ERK1/2 en la CI y en la AMY durante el aprendizaje de un estímulo gustativo aversivo y uno seguro.
- Evaluar la expresión de Arc en la CI y en la AMY durante el reconocimiento de un estímulo gustativo aversivo y uno seguro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales.*

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, con un peso entre 280 - 300g, fueron colocadas en cajas individualmente, con condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) y humedad ( $55 \pm 1\%$ ), bajo un ciclo de luz/obscuridad 12h/12h. La comida estuvo disponible *ad libitum*. Todos los animales fueron sometidos a una privación de agua 24 h antes de comenzar los experimentos conductuales.

### *Procedimiento conductual.*

Los animales fueron habituados por la mañana (11:00hrs) a un régimen de consumo restringido, el cual consistió de 5 ml de agua durante 15 min; y por la tarde (17:00 hrs) recibieron un consumo *ad libitum* de agua durante 15 min para evitar que se deshidrataran, esto se realizó cada 24 h durante 6 días consecutivos a la misma hora del día, para así obtener un consumo estable denominado línea base. En el día 7 los animales fueron separados aleatoriamente y clasificados en su grupo correspondiente de acuerdo al tiempo de sacrificio. Para el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo, se realizó la presentación del estímulo (sacarina 0.5% por 15 min) y después los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos (0, 20 30, 60 min; Berman et al., 1998; Belelovsky et al., 2002; Schafe et al., 2008). Para el caso del CAS, el día 7 se presentó el estímulo condicionado (sacarina 0.5 % por 15 min) y 15 min después se inyectó intraperitonealmente un inductor de malestar gástrico (LiCl, 0.15 M; 10 ml/kg) como estímulo incondicionado, después de esta inyección los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos (0, 20, 30, 60 min; ver figura 5).

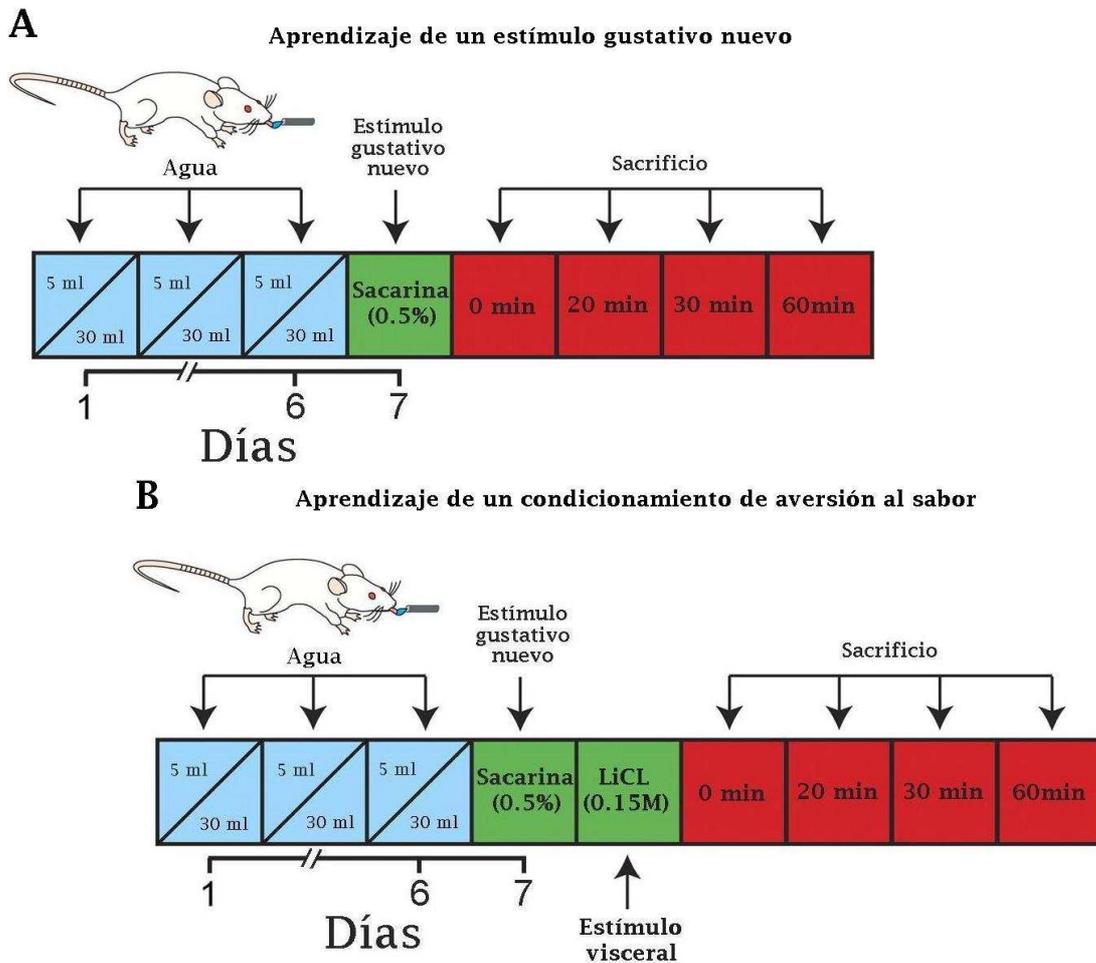


Figura 5. Esquema de cada paradigma conductual. (A) Aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo. Los animales fueron privados de agua 24 h antes del comienzo del paradigma conductual, después fueron sometidos a un régimen de consumo de agua durante 6 días, tomando por la mañana y tarde 5 y 30 ml de agua respectivamente. El día 7 se les presentó 5 ml del estímulo gustativo nuevo (sacarina 0.5%) y posteriormente los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos. (B) Aprendizaje de un condicionamiento de aversión al sabor. Los animales fueron sometidos de la misma manera que en el paradigma anterior hasta el día 6. El día 7 se les presentó 5 ml del estímulo gustativo nuevo (sacarina 0.5%), 15 min después se inyectó intraperitonealmente el estímulo visceral (LiCl 0.15M), posteriormente los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos.

*Extracción de estructuras cerebrales.*

Los animales fueron sacrificados por decapitación a los diferentes tiempos mencionados, después de la presentación de un estímulo gustativo nuevo o después de la asociación de estímulos en el CAS. Los cerebros fueron removidos

inmediatamente y colocados en una solución de NaCl 0.9% a 4 °C. Tanto la AMY como la CI fueron disecadas para después ser homogenizadas en 150 µl de buffer de lisis (Tritón-X100 al 1%, NaCl 150 mM, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaF, 10 mM NaP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, tableta de inhibidores de proteasas (aprotinina 0.1 mg/ml, bestatina 0.1 mg/ml, calpaina 0.1 mg/ml, leupeptina 0.1 mg/ml, pepstatina 0.1 mg/ml) Roche, la cual fue disuelta en 50 ml de H<sub>2</sub>O). Los homogenizados fueron centrifugados a 2000 x g por 10 min para retirar núcleos y restos celulares. Se extrajo el sobrenadante y las muestras se congelaron a -70 °C para su posterior análisis.

#### *Western Blot.*

Las muestras centrifugadas fueron descongeladas y todos los procedimientos se realizaron a 4 °C. Se estimó la concentración de proteínas mediante ensayos de Lowry (Bio-Rad Dc Protein Assay). Una vez determinada la cantidad de proteína (µg) para las muestras, estas fueron mezcladas con buffer Laemmli 1:1 y hervidas durante 5 min. Posteriormente, se cargaron 10 µg de cada muestra en un gel 10% SDS-poliacrilamida y la electroforesis se llevo a cabo a 120 V durante 90 min. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) a 25 V durante 45 min. La membrana resultante de la transferencia se incubó por 1 h en buffer TBS-T (Tris 10mM, NaCl 0.9%, Tween 20 al 0.1%, pH 7.5) con 5% de BSA (albumina de suero bovino, del inglés bovine serum albumin).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-phospho-44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (1:2000; Cell Signaling) para detectar ERK1/2 fosforilado (p-ERK); anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:5000; Cell Signaling) para detectar ERK1/2 total (t-ERK); anti-Arc (1:1000; Synaptic Systems) para detectar Arc; y anti-GAPDH (1:10000; Millipore) para detectar GAPDH. Para detectar la actividad de ERK1/2 las membranas de PVDF fueron incubadas por 2 h a 4 °C con anticuerpo primario anti p-ERK. Posteriormente, para detectar la expresión de Arc las membranas se incubaron de la misma manera pero con anticuerpo primario anti-Arc. Por último, se

utilizaron anti-GAPDH y anti t-ERK como controles de carga. Las membranas se lavaron 4 veces de 7 min cada una con TBS-T, y se incubaron por 1 h con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (dependiendo de la especie donde estaba producido el anticuerpo primario se utilizó el correspondiente anticuerpo secundario). Las membranas nuevamente se lavaron 4 veces de 7 min cada una con TBS-T. Después la membrana se incubó con sustrato quimioluminiscente HRP (Immobilon™ Wester, Millipore) y se expuso en placas radiográficas. La inmunoreactividad se cuantificó densitométricamente con el software ImageJ versión 1.31, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.

#### *Análisis estadístico.*

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA factorial junto con la prueba post-hoc de Fisher; un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Para determinar cambios en la activación de ERK1/2 o en la expresión de Arc, los niveles de p-ERK fueron normalizados con los niveles de t-ERK, y los niveles de Arc fueron normalizadas con los niveles de GAPDH; para determinar si existían cambios en los niveles t-ERK, estos fueron normalizados con los niveles de GAPDH. Los niveles normalizados de p-ERK y Arc en los grupos 20, 30 y 60 min fueron expresados por separado como un porcentaje de inmunorreactividad respecto al grupo de 0 min (como 100%).

## RESULTADOS

### **Activación de ERK1/2 en la corteza insular durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo pero no durante el CAS.**

Para investigar cambios en la actividad de ERK1/2 durante la formación de una memoria gustativa segura se examinó la fosforilación de ERK1/2 a diferentes tiempos en la CI después de la presentación de un estímulo gustativo nuevo. Como se muestra en la figura 6A, los niveles de ERK1/2 fosforilado (p-ERK) en la CI aumentan significativamente a los 20 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.0008$ ), y a partir de los 30 min regresan a niveles basales (grupo 0 min) (ANOVA:  $F_{3,25}=4.93$ ,  $p<0.05$ ). Además de observarse diferencias significativas en los grupos 20 vs 60 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.045$ ). Estos datos coinciden con lo previamente reportado en la literatura (Berman et al., 2005; Belelovsky et al., 2005). Esto sugiere que después de la adquisición del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo hay una activación de ERK1/2 dependiente de actividad en la CI. Sin embargo, cuando este estímulo gustativo comienza a asociarse con un estímulo incondicionado (LiCl) no ocurre dicha fosforilación de ERK1/2, por el contrario, al realizarse la asociación de estímulos durante el aprendizaje del CAS la fosforilación de ERK1/2 disminuye significativamente (ANOVA:  $F_{3,25}=5.15$ ,  $p<0.05$ ) por debajo de los niveles basales (figura 6B). Estos niveles de ERK1/2 mostraron cambios significativos entre los grupos de 0 vs 60 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.0007$ ), 20 vs 60 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.020$ ), y 30 vs 60 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.020$ ) después de la adquisición del CAS. Por último, no se observaron diferencias significativas en los niveles totales de ERK1/2 (t-ERK) entre los distintos grupos durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo (ANOVA:  $F_{3,24}=0.87$ ,  $p=0.46$ ) ni durante el aprendizaje del CAS (ANOVA:  $F_{3,25}=0.76$ ,  $p=0.39$ ). Estos resultados nos sugieren que existen cambios temporales en la fosforilación de ERK1/2 específicos del tipo de información que se esté procesando.

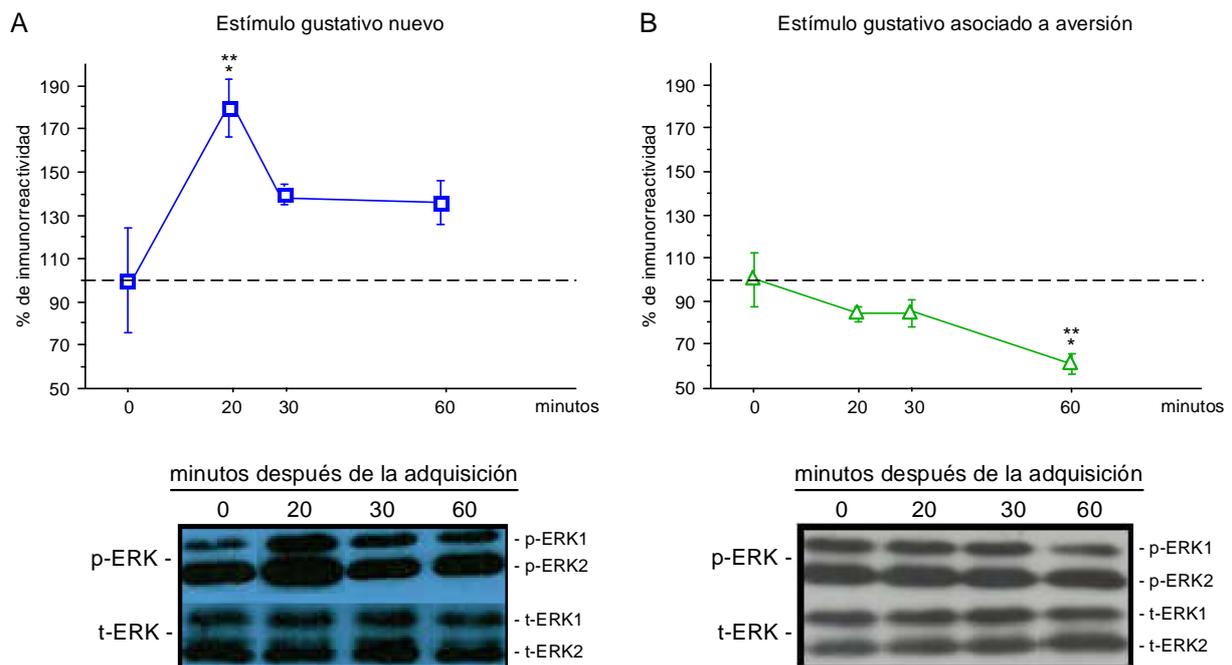


Figura 6. Efecto del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o asociado a aversión en la fosforilación de ERK1/2 en la CI. (A) Aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo. La activación de ERK1/2 (p-ERK) en la CI ( $n=7$  u  $8$  para cada condición) fue detectada a los 20 min después de la presentación de un sabor nuevo. (B) Condicionamiento de aversión al sabor. No se observó alguna activación de ERK1/2 en la corteza insular ( $n=7$  u  $8$  para cada condición), por el contrario su fosforilación disminuye significativamente a los 60 min respecto al grupo de 0 min (nivel basal), además de existir diferencias significativas entre los grupos de 20 y 30 min con respecto al grupo de 60 min, después de la asociación de estímulos (CAS). Las figuras muestran inmunoblots representativos y promedio  $\pm$  SEM de inmunorreactividad para ERK1/2. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

### Expresión de Arc en la corteza insular durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS.

Cuando se realizó el análisis de la expresión de Arc después del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo en la CI, se observaron diferencias significativas a diferentes tiempos (ANOVA:  $F_{3,24}=4.55$ ,  $p<0.05$ ). Como se muestra en la figura 7A, se observó un aumento significativo en la expresión de Arc a los 30 (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.009$ ) y 60 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.002$ ) después de la adquisición del aprendizaje gustativo. Estos resultados también se han observado en experimentos anteriores hechos en el laboratorio (Morin et al., 2010, comunicación

personal). Por el contrario, cuando se realizó la asociación de estímulos durante el aprendizaje del CAS, no se observaron diferencias significativas respecto a los niveles basales de Arc (0 min) ( $F_{3,25}=2.69$ ,  $p=0.067$ ). Pero cabe señalar que la expresión de Arc disminuye a los 60 min respecto al grupo de 30 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.008$ ) (figura 7B). Estos cambios temporales de Arc en la CI sugieren que esta proteína estaría involucrada únicamente en la consolidación de un aprendizaje gustativo nuevo.

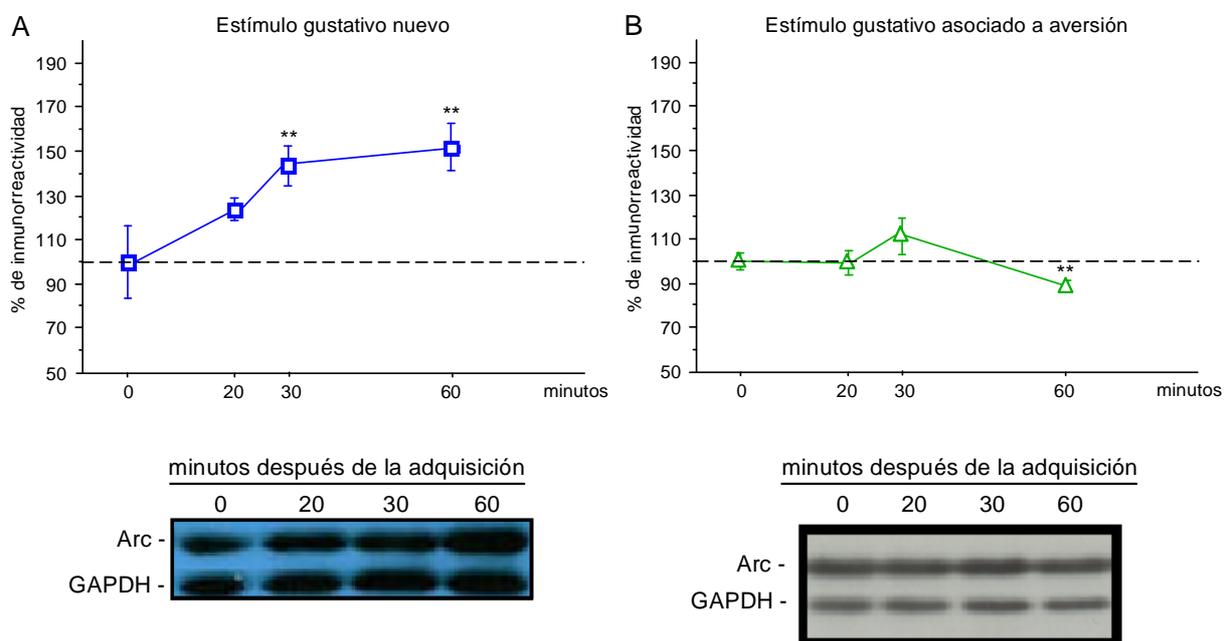


Figura 7. Efecto del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o asociado a aversión en la expresión de Arc en la CI. (A) Aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo. La expresión de Arc en la CI ( $n= 7$  u  $8$  para cada condición) fue detectada a los 30 y 60 min después de la exposición a un sabor nuevo. (B) Condicionamiento de aversión al sabor. Aunque no hay diferencias significativas en la expresión de Arc en la CI ( $n= 7$  u  $8$  para cada condición) respecto al grupo de 0 min, existen diferencias significativas en los grupos de 30 vs 60 min después de la asociación de estímulos. Las figuras muestran inmunoblots representativos y promedio  $\pm$  SEM de inmunorreactividad para Arc. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

## **Activación de ERK1/2 en la amígdala durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS.**

En los experimentos anteriores se observaron cambios temporales de las proteínas Arc y ERK1/2 en la CI únicamente cuando el estímulo gustativo no involucra aversión. Sin embargo, cuando el componente aversivo comienza a integrarse al procesamiento de la información, otras estructuras podrían estar involucradas en la consolidación de la memoria por medio de estas proteínas. Particularmente, la AMY es una estructura cerebral que se ha relacionado ampliamente con aprendizajes que involucran componentes aversivos, tal es el caso del CAS. Para investigar si los cambios temporales en la actividad de ERK1/2 y la expresión de Arc ocurren en la AMY únicamente cuando el componente aversivo se integra al procesamiento de la información, se realizó la disección bilateral de la AMY a diferentes tiempos después de la adquisición de un aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o después de la adquisición del CAS.

El análisis densitométrico no muestra cambios significativos temporales de los niveles de p-ERK en la AMY después de la adquisición del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo (ANOVA:  $F_{3,22}=0.36$ ,  $p=0.77$ ) (figura 8A), ni cuando se realizó el aprendizaje del CAS (ANOVA:  $F_{3,28}=1.35$ ,  $p=0.27$ ) (figura 8B). Además, no se observaron diferencias significativas en los niveles de t-ERK entre los distintos grupos durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo (ANOVA:  $F_{3,22}=1.26$ ,  $p=0.31$ ) ni durante el aprendizaje del CAS (ANOVA:  $F_{3,28}=1.69$ ,  $p=0.35$ ). Esto sugiere que durante el aprendizaje del CAS en la AMY, vías de señalización distintas a ERK1/2 pudieran estar llevando a cabo el procesamiento de la información cuando comienza a integrarse el componente aversivo.

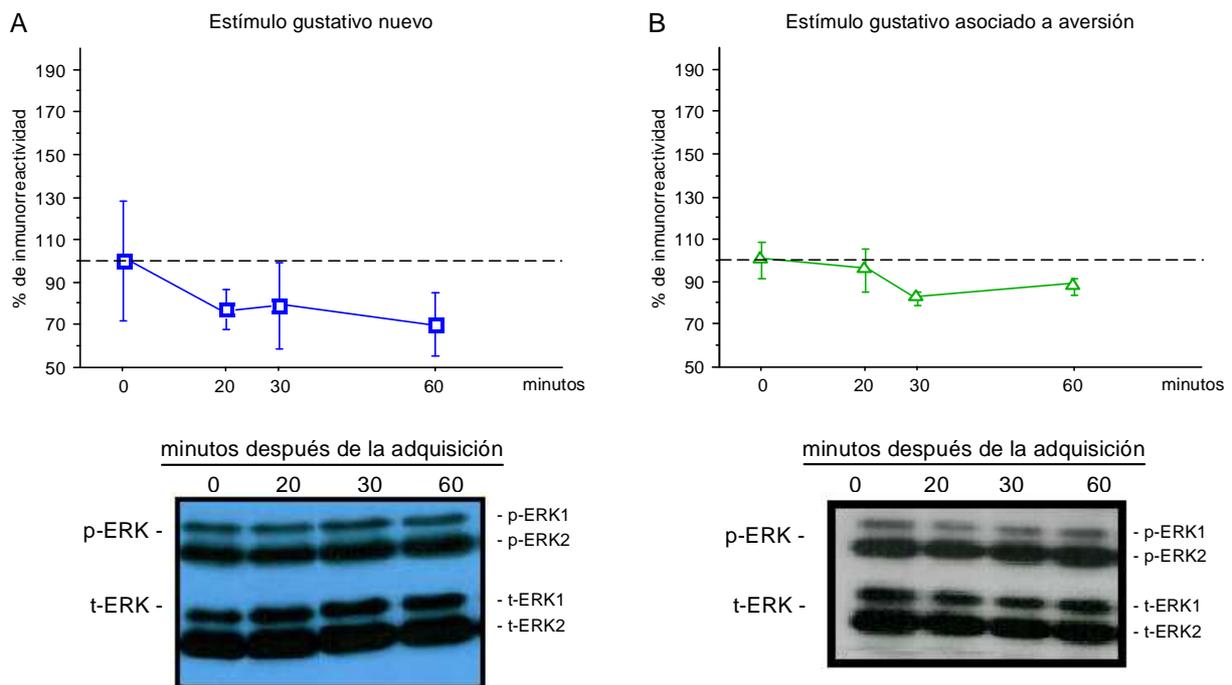


Figura 8. Efecto del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o asociado a aversión en la fosforilación de ERK1/2 en la AMY. (A) Aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo. No se observaron cambios significativos en la activación de p-ERK en la AMY ( $n=7$  u  $8$  para cada condición) después de la presentación de un sabor nuevo. (B) Condicionamiento de aversión al sabor. No se observaron diferencias significativas en los niveles de p-ERK en la AMY ( $n=7$  u  $8$  para cada condición) para ninguna condición después de la asociación de estímulos. Las figuras muestran inmunoblots representativos y promedio  $\pm$  SEM de inmunorreactividad para ERK1/2. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

### Expresión de Arc en amígdala durante el reconocimiento de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Arc en la AMY durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo (ANOVA:  $F_{3,22}=0.09$ ,  $p=0.96$ ) (figura 9A). Sin embargo, cuando se realizó el protocolo de CAS, se encontraron cambios significativos entre los distintos grupos (ANOVA:  $F_{3,28}=7.68$ ,  $p<0.01$ ) (figura 9B). La expresión de Arc en la AMY, aumentan significativamente a los 60 min respecto a los niveles basales de expresión (0 min) (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.031$ ). Además, se observaron cambios significativos en los grupos 20 vs 60 min (prueba

post-hoc Fisher,  $p=0.0002$ ) y 30 vs 60 min (prueba post-hoc Fisher,  $p=0.0007$ ). Esto sugiere que la expresión de Arc puede estar involucrada espacial y temporalmente en la consolidación de un estímulo gustativo aversivo en la AMY 60 min después de la adquisición del CAS.

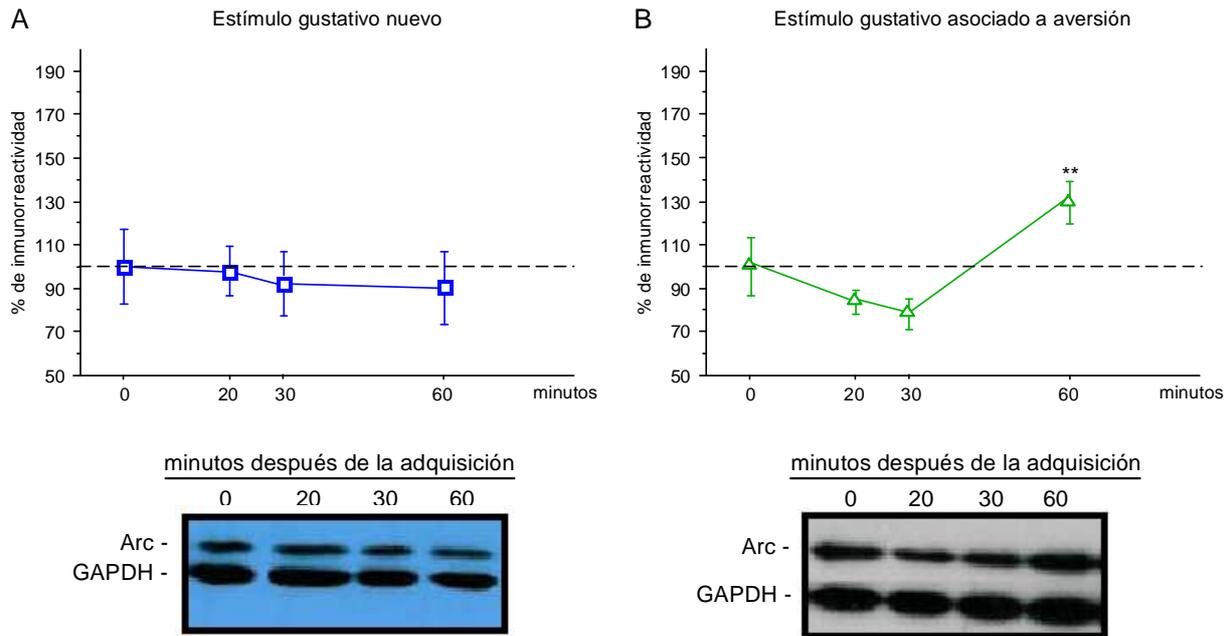


Figura 9. Efecto del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o asociado a aversión en la expresión de Arc en la AMY. (A) Aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo. No se observaron cambios significativos en la expresión de Arc en la AMY ( $n= 7$  u  $8$  para cada condición) en ninguna condición después de la exposición a un sabor nuevo. (B) Condicionamiento de aversión al sabor. La expresión de Arc en la amígdala ( $n= 7$  u  $8$  para cada condición) incrementa significativamente 60 min después de la asociación de estímulos. Además se observaron diferencias significativas en los grupos de 20 y 30 min respecto al grupo de 60 min. Las figuras muestran inmunoblots representativos y promedio  $\pm$  SEM de inmunorreactividad para Arc. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

## DISCUSIÓN

En este trabajo se investigaron cambios temporales y región-específicos de las proteínas Arc y ERK1/2 durante la formación de la memoria gustativa. Se observó un aumento temporal en la expresión de Arc y en la fosforilación de ERK1/2, que son inducidos en regiones cerebrales específicas después del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o después del condicionamiento de aversión al sabor. Estudios farmacológicos y anatómicos han enfatizado la participación de distintas estructuras (CI, AMY, hipocampo) y mecanismos moleculares (inducción de genes de expresión temprana, síntesis de proteínas, vías de señalización intracelulares) en la formación de la memoria gustativa. En este sentido, este trabajo aporta nuevos datos respecto a la actividad temporal y región-específica de las proteínas ERK1/2 y Arc que ocurre en los procesos que se llevan a cabo durante el aprendizaje gustativo.

Diversos estudios muestran la existencia de actividad en la CI durante el procesamiento de un estímulo gustativo nuevo, por ejemplo, la exposición a un estímulo gustativo nuevo genera cambios moleculares y eléctricos tales como incremento en el disparo de neuronas (Katz et al., 2001), expresión de IEG, como *c-fos* (Bernstein y Koh, 2007), activación de vías de señalización intracelulares (Berman et al., 2008; Belevovsky et al., 2005) y aumento en la liberación de neurotransmisores (Shimura et al., 1995; Miranda et al., 2000; Mickley et al., 2000). En este trabajo describimos también que existen cambios moleculares que ocurren en la CI, particularmente de las proteínas ERK1/2 y Arc, con lo cual podemos sugerir que la corteza gustativa es una estructura clave en la formación de la memoria gustativa. En el caso de la AMY, es una estructura que ha sido ampliamente estudiada durante el procesamiento de la información gustativa. Durante la ingestión de distintos sabores, se ha observado que diversas neuronas responden a estos estímulos tanto en la CEA (Nishijo et al., 2000) como en la BLA (Fontanini et al., 2009). Además, se ha observado una expresión de *c-fos* principalmente en la CEA después de la exposición a un estímulo gustativo nuevo

que ya no se observa cuando dicho estímulo se vuelve familiar (Koh et al., 2003). Incluso, trabajos recientes en nuestro laboratorio describen una liberación de distintos neurotransmisores en esta estructura (Guzmán-Ramos et al., 2010). En este trabajo describimos que existen cambios en la expresión de Arc en la AMY después de la asociación del estímulo gustativo con el estímulo visceral durante el aprendizaje del CAS. Lo que nos lleva a sugerir que esta estructura comienza a modular la consolidación de la memoria cuando se genera una asociación.

En este trabajo, encontramos que en la CI, la fosforilación de ERK1/2 aumenta transitoriamente 20 min después del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo, lo cual coincide con estudios previos (Berman et al., 1998; Belevsky et al., 2005). Sin embargo, los niveles de fosforilación de ERK1/2 durante el aprendizaje del CAS disminuyen, sugiriendo que esta vía de señalización está involucrada solo en el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo y, cuando el aprendizaje comienza a involucrar la asociación de un componente aversivo, otras vías de señalización estarían participando en el procesamiento de la información e incluso se estaría promoviendo una desfosforilación de ERK1/2 que permitiría que la asociación de estímulos ocurra (Lin et al., 2010). Es importante señalar que hay trabajos en los cuales se observa que la activación de ERK1/2 en la CI ocurre durante el aprendizaje del CAS (Berman et al. 1998), contrario a lo que nosotros observamos. Sin embargo, en esos estudios se utilizó un protocolo conductual distinto de CAS, además de que la participación de ERK1/2 la observan por medio de la microinyección intracerebral de un inhibidor de esta vía (PD098059). En el caso de la AMY, no observamos cambios en ERK1/2 durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo ni durante el CAS. Se sabe que la AMY participa en el aprendizaje de memorias que involucran componentes emocionales relevantes (Sah et al., 2003), esto nos hace pensar que en el caso del aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo el componente emocional no está siendo relevante en la AMY, por lo cual no observamos ningún cambio en la fosforilación de ERK1/2. En el caso del CAS, nos sugiere que aunque comienza a ser relevante un componente emocional, como lo es el componente

aversivo, otras vías de señalización estarían participando durante la formación de este tipo de memoria gustativa en la AMY. Actualmente poco se sabe acerca de otras vías de señalización que estén participando en el procesamiento de esta memoria, sin embargo existen trabajos hechos en cultivos neuronales en los cuales se reporta una regulación transcripcional de Arc por medio de la señalización de PI3K y CamKII (cinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina) después de la estimulación neuronal (Zheng et al., 2009). Además, utilizando el aprendizaje de condicionamiento al miedo se ha reportado un papel de la vía de PI3K en la AMY durante la consolidación de la memoria (Lin et al., 2001). Lo que nos llevaría a sugerir que estas vías de señalización podrían involucrarse en el procesamiento de la información cuando la AMY comenzara a modular la consolidación de una memoria gustativa aversiva.

Respecto a la expresión de Arc, observamos que al igual que ERK1/2, fue temporalmente inducida en distintas regiones cerebrales dependiendo del tipo de aprendizaje que este ocurriendo. Por un lado, la novedad de un estímulo gustativo provoca que la expresión de Arc aumente en la CI. Por otro lado, cuando este estímulo comienza a ser asociado con un componente aversivo, la participación de estructuras cambia, ahora el aumento en la expresión de Arc ocurre en otra estructura, la AMY, lo cual coincide con estudios previos en los que se observa un aumento en el mRNA de Arc en la AMY después de la adquisición del CAS (Barot et al., 2008). Con base en esto, sugerimos que la memoria puede ser almacenada en determinadas estructuras dependiendo del tipo de información que se este adquiriendo y consolidando. Además, sugerimos un papel importante de Arc en la CI durante el aprendizaje gustativo nuevo y en la AMY durante el CAS.

Arc se ha utilizado como un marcador de actividad neuronal durante procesos de aprendizaje y memoria, por ello se ha estudiado ampliamente en diferentes tipos de aprendizajes (Bramham et al., 2010). Sin embargo, poco se ha estudiado acerca del papel que tiene Arc durante la formación de memorias gustativas. El aumento en la

expresión de Arc durante la adquisición del CAS nos sugiere que debe existir necesariamente una convergencia entre el EC (estímulo gustativo) y el EI (componente aversivo) para que Arc pueda estar involucrada en este tipo de aprendizaje en la AMY, si esta convergencia no ocurre, y sólo se procesa la información del estímulo gustativo, la participación de Arc sólo ocurrirá en la CI. Esto sugeriría que la expresión de Arc está controlada por distintos mecanismos de señalización en diferentes regiones cerebrales y que estos mecanismos de señalización dependerían de la convergencia de estímulos que puede estar ocurriendo durante la consolidación de la memoria.

Se ha sugerido que los cambios que ocurren en las conexiones sinápticas durante los eventos de plasticidad, inducen los mecanismos requeridos para la consolidación de la memoria (Bramham et al., 2010). En este trabajo encontramos que la activación de cascadas de señalización intracelulares y la participación de genes de expresión temprana parecen estar involucradas en la consolidación de la memoria gustativa, y que dichas señales podrían estar actuando a través de distintos mecanismos.

El aprendizaje gustativo involucra la activación de diferentes sistemas de neurotransmisión [por ejemplo, el sistema colinérgico (Naor y Dudai, 1996)], los cuales podrían inducir la activación de ERK1/2. Un modelo aceptable sería la activación del sistema colinérgico y la subsecuente liberación de Ach, lo cual conduciría a la activación de receptores muscarínicos que desencadenaría la activación de ERK1/2 vía PKC (Bahar et al., 2004; Jones et al., 1999). Además, el flujo de calcio vía receptores NMDA, los cuales son necesarios para la formación de la memoria gustativa, e incluso la activación de RTK, por medio de la estimulación con BDNF, estarían actuando sinérgicamente junto con la señalización colinérgica, permitiendo la activación de ERK1/2 en este tipo de aprendizaje (Rosenblum et al., 1997; Castillo y Escobar, 2011).

Una vez que ERK1/2 es activada, ésta puede translocarse al núcleo (Horgan y Stork, 2003; Patterson et al., 2001) y regular distintos factores de transcripción, como Elk-1 (Berman et al., 1998), o CREB (Shaywitz et al., 1999), estos factores actúan regulando la expresión de genes relacionados con plasticidad sináptica que poseen elementos de respuesta SRE (elemento de respuesta a suero) o CRE (elemento de respuesta a AMPc) en su región promotora (Hagiwara et al., 1996; Sweatt, 2001). Entre estos genes se encuentran BDNF, *Homer1a* o *arc* (Guzowski, 2002; Shepherd et al., 2006), los cuales son IEG efectores que en consecuencia proporcionarían los elementos estructurales necesarios para el crecimiento y estabilización de las sinapsis que sustentarían la formación de la memoria (Bailey et al., 1996; Benito y Barco 2010).

Diversos estudios han enfocado su investigación en la descripción detallada de la proteína Arc, en particular, la activación de proyecciones neuronales de la vía perforante al giro dentado hipocámpal usando patrones de estimulación que inducen LTP, causa que el mRNA de *arc* recién sintetizado se localice selectivamente en segmentos dendríticos de las neuronas que fueron recientemente estimuladas (Steward et al., 1998; Waltereit et al., 2001; Bramham et al., 2010). Además, en la región promotora del gen *arc* se han identificado elementos SRE río arriba del sitio de inicio de la transcripción y un elemento que funciona como censor de actividad llamado elemento de respuesta a actividad sináptica (SARE), el cual presenta sitios de unión para las proteínas CREB y SRF (factor de respuesta a suero), sugiriendo que la regulación transcripcional de *arc* puede ser llevada a cabo por medio de distintos factores de transcripción (Guzowski et al., 2002; Bramham et al., 2010). A pesar de la continua investigación en esta proteína (Arc), hasta ahora las cascadas de señalización intracelulares que conectan la actividad sináptica con la transcripción de *arc* no están completamente entendidas. Algunos estudios demuestran que la vía de ERK1/2 conduce a la transcripción de *arc* (Panja et al., 2009; Chotiner et al., 2010) pero estos trabajos lo realizan en modelos experimentales de plasticidad (LTP), y pocos son los trabajos que demuestran dicha

transcripción de *arc* por medio de la activación de ERK1/2 durante la formación de la memoria (Ploski et al. 2008). En este trabajo observamos que en la CI durante la adquisición y/o consolidación de un estímulo gustativo nuevo, ocurre una activación de ERK1/2 a los 20 min y posteriormente un aumento en la expresión de Arc a partir de los 30 min, esto nos habla de una posible coordinación temporal entre ERK1/2 y Arc, como la observada anteriormente por Ploski y colaboradores pero en otro tipo de aprendizaje. En el caso de la AMY durante el aprendizaje del CAS, observamos un aumento en la expresión de Arc pero la activación de ERK1/2 no ocurre, sugiriendo que esta expresión de Arc estaría ocurriendo por medio de otras vías de señalización intracelular distintas a ERK1/2. Por ello, futuros experimentos en este sentido son necesarios para demostrar la existencia de dicha coordinación de ERK1/2 y Arc en la CI y la exploración de distintas vías de señalización en la AMY durante la formación de memorias gustativas seguras y asociadas a aversión.

Como se mencionó antes, la AMY y la CI tienen proyecciones recíprocas (Pitkanen et al., 2000; Price, 2003). Existen trabajos en los que se sugiere que las proyecciones de la AMY hacia la CI son claves para el establecimiento de la memoria gustativa asociada a aversión. La estimulación tetánica de la AMY induce LTP en la CI, incrementando significativamente la respuesta neuronal a estimulación de baja frecuencia (Escobar et al., 1998). La inducción de LTP en las proyecciones AMY-CI antes de la adquisición del CAS, favorece la retención de esta tarea (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). Ésto sugiere que la interacción entre estas estructuras podría constituir un mecanismo mediante el cual se pueda formar la memoria gustativa. Con base en los resultados que encontramos en el presente trabajo, podemos sugerir que la compartimentalización de estructuras y su relevancia dependerán de la información que este comenzando a adquirirse. Podemos sugerir que durante la adquisición de un estímulo gustativo la información comienza a ser procesada en la CI utilizando mecanismos moleculares como la activación de ERK1/2 que subsecuentemente permitirá la transcripción de *arc*, y la CI se mantendrá activa hasta que la información sea integrada y consolidada. Si nos apoyamos en el

hecho de que la expresión de Arc aumenta en la AMY cuando el estímulo gustativo es asociado con un estímulo visceral, podemos sugerir que cuando la señal de malestar gástrico (estímulo visceral) comienza a llegar al sistema, la relevancia de estructuras cambia en el procesamiento de la información originando que ahora la AMY sea la encargada de procesar dicha información respecto a la asociación de estímulos para que pueda ser consolidada la memoria. Con base en esto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la AMY es activada cuando un componente aversivo comienza a ser integrado a la memoria gustativa y que la formación de esta memoria es compartimentalizada dentro de distintas estructuras cerebrales, dependiendo de la asociación de estímulos (Bermúdez-Rattoni, 2004; De la Cruz et al., 2008).

Toda esta información nos sugiere que durante el periodo de consolidación de la memoria distintos patrones de actividad neuronal y sistemas de neurotransmisión inducen el disparo de potenciales de acción o la unión de neurotransmisores a receptores post-sinápticos. El resultado será un flujo de calcio extracelular o la liberación de calcio desde almacenes intracelulares (Berridge, 1998) y la activación de cascadas de señalización involucrando segundos mensajeros y la activación de proteínas cinasas (Sweatt 2001; Benito y Barco, 2010). Algunas de estas proteínas cinasas, tales como PKA (Delghandi et al., 2005), ERK (Davis y Laroche, 2006) y CamKII (Greer y Greenberg, 2008) regularán la expresión de genes en el núcleo. Sus moléculas blanco serán factores de transcripción presentes en el núcleo, como CREB o SRF, que al activarse se unirán a regiones promotores de distintos genes (CREB a CRE; SRF a SRE); y reclutarán la maquinaria transcripcional (Finkbeiner y Greenberg, 1998), para así promover la transcripción génica. Una vez que la transcripción de genes se ha activado, comienza la generación de proteínas, las cuales serán las encargadas de provocar los cambios estructurales neuronales, tales como, el incremento en la densidad de espinas dendríticas que provocaría la generación de nuevas conexiones sinápticas, además del fortalecimiento de las conexiones neuronales (Hubener y Bonhoeffer, 2010). Estos cambios serán

necesarios para que ocurra una estabilización de los circuitos neuronales encargados de que la información sea adquirida y pueda mantenerse a largo plazo. Tomando en cuenta estudios en los que se demuestra que la activación de ERK puede provocar una reorganización del citoesqueleto (Irigoyen et al., 1997), por medio del recambio rotatorio (ganancia de subunidades en un extremo y la pérdida en el otro) para la polimerización y estabilización de filamentos de actina (Rex et al., 2010) y microtúbulos (Fanara et al., 2010), reflejando así procesos de modelaje neuronal dependientes de actividad (Berman et al., 1998); y que en el caso de la proteína Arc, el mRNA de *arc* se acumula en dendritas de neuronas que han sido recientemente activada (Steward et al., 1998; Steward y Worley, 2001), se ha sugerido que ERK puede estar iniciando la señales necesarias para que la expresión de la proteína Arc ocurra y pueda regular cambios estructurales, como la expansión de la densidad post-sináptica y el aumento de espinas dendríticas por medio de la estabilización de F-actina (Ploski et al., 2008; Messaoudi et al., 2007). Además de regular la actividad de la maquinaria traduccional a nivel local en las dendritas de neuronas que han sido activadas por algún estímulo (Bramham et al., 2008; ver figura 10).

Por último, en base a los resultados observados en este trabajo, podemos proponer la realización de experimentos posteriores por medio de los cuales se demuestre que ambas proteínas (ERK1/2, Arc) son necesarias para que la formación de memorias gustativas seguras o aversivas ocurra. Utilizando metodologías que incluyan el bloqueo de la función de ambas proteínas, por medio de la microinyección de oligonucleótidos antisentido para Arc o de inhibidores de la vía de ERK (tales como, PD098059 o U0126), tanto en la CI como en la AMY, podremos observar si este bloque impide la formación de la memoria gustativa, lo que sugeriría una participación clave de ambas proteínas en el procesamiento de la información. De igual forma, podemos sugerir la administración de fármacos que inhiban la polimerización de filamentos de actina o microtúbulos (tales como latrunculina o colchicina respectivamente), o fármacos que estabilicen filamentos de actina (como

jasplakinolida) para poder establecer cambios estructurales que ocurren durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo o del CAS.

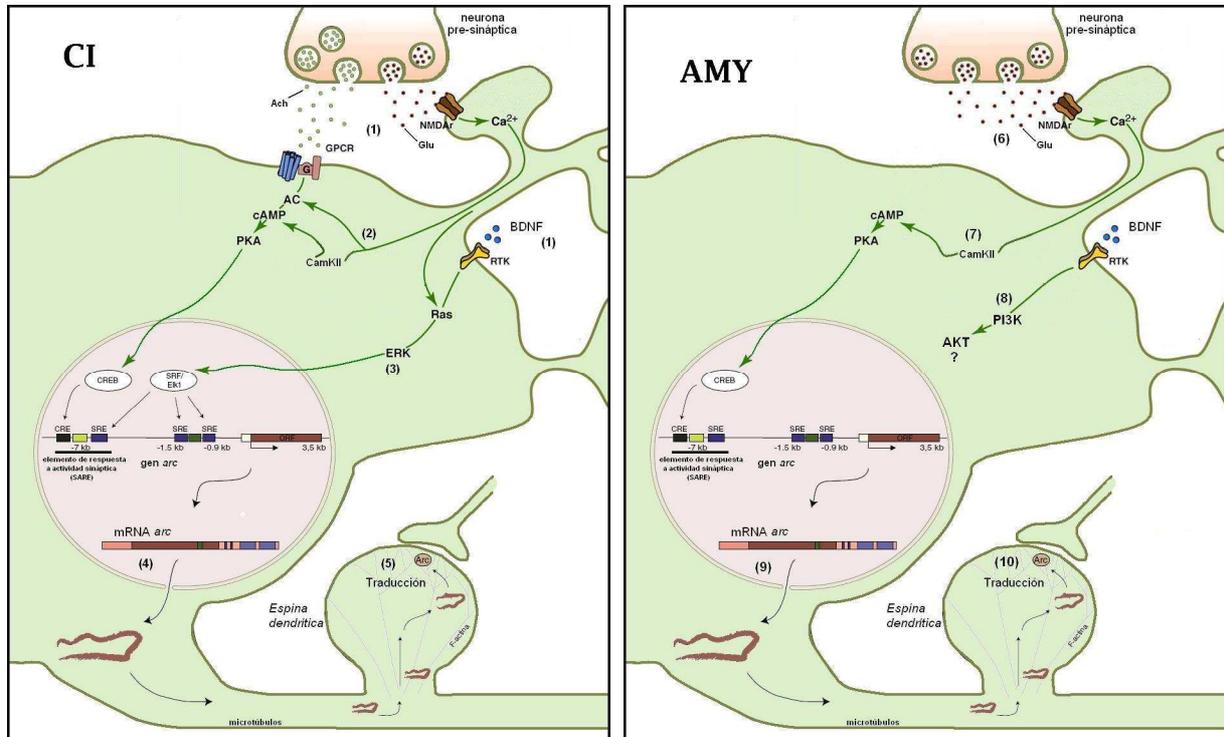


Figura 10. Integración de los eventos moleculares que ocurren en la CI y en la AMY durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo y durante el CAS. La exposición a un estímulo gustativo nuevo induce la liberación de diferentes neurotransmisores como ACh y Glu, y la secreción de factores de crecimiento como BDNF en la CI (1). Estos actuarán a través de sus receptores post-sinápticos, el resultado será un flujo de calcio extracelular o la liberación de calcio desde almacenes intracelulares y la activación de cascadas de señalización involucrando segundos mensajeros como el AMPc y la activación de proteínas cinasas como PKA, ERK o CamKII (2). En el caso de ERK, ésta puede translocarse al núcleo y activar factores de transcripción, como Elk-1, CREB o SRF, que al activarse se unirán a regiones promotoras (CRE, SRE) de distintos genes, siendo uno de ellos *arc* (3). Una vez que la transcripción génica se ha activado, comenzará la síntesis de distintos mRNA y en el caso de *arc* su mRNA será transportado a dendritas de neuronas que han sido estimuladas por el aprendizaje (4). Al llegar el mRNA a estos sitios dendríticos comenzará la traducción local de la proteína Arc que junto con otras proteínas serán las encargadas de provocar los cambios estructurales (expansión de la densidad post-sináptica, aumento de espinas dendríticas por medio de la estabilización de F-actina) necesarios para que ocurra la consolidación de la memoria (5). En la AMY, cuando el estímulo gustativo comienza a ser asociado con un estímulo visceral se induce la liberación de

neurotransmisores como el Glu y la secreción de factores de crecimiento como BDNF (6). El Glu activará receptores NMDA los cuales provocarán un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual activará por medio de la cinasa CamKII la vía AMPc/PKA/CREB (7); en el caso del BDNF activará RTK que inducirán la activación de la vía PI3K (8). Estas cascadas de señalización podrían estar regulando la transcripción de *arc* que conduciría a la síntesis y posterior transporte de su mRNA (9) a dendritas de neuronas recién activadas y la subsecuente traducción local de la proteína Arc (10).

## CONCLUSIONES

En conclusión, la formación de la memoria gustativa involucra mecanismos celulares que permiten su almacenamiento de forma eficiente para contribuir a la sobrevivencia de los organismos. Usando los paradigmas de aprendizaje gustativo nuevo y de CAS, describimos los perfiles temporales de la fosforilación de ERK y en la expresión de Arc durante la formación de una memoria gustativa segura y una memoria asociada a aversión. Con base en nuestros resultados, podemos sugerir un papel de Arc en la AMY durante la adquisición del CAS; y que la actividad coordinada de ERK y Arc ocurre sólo en la CI y no en la AMY durante el aprendizaje de un estímulo gustativo nuevo. Además, estos resultados nos permiten aportar elementos a la integración de un modelo que describa los mecanismos celulares necesarios para que la información sea almacenada.

En este trabajo se corrobora que la CI participa en el procesamiento y almacenamiento de la información acerca de nuevos sabores, y la identificación de cascadas de señalización intracelulares que toman parte en dicho proceso. Por otro lado apoya los trabajos en los que se observa que la AMY estará involucrada en el procesamiento de la información una vez que se incorpore un componente emocional a dicho procesamiento.

Estos datos nos ayudarán al entendimiento de la regulación molecular que existe durante el procesamiento de la información en diferentes tipos de memoria dependiendo de su localización en los sustratos neuronales. Además nos acerca a una descripción cada vez más detallada de los eventos moleculares que subyacen la formación de la memoria.

## ABREVIATURAS

Ach	acetilcolina
AKT	proteína cinasa, del inglés transforming AK strain
AMY	amígdala, del inglés amygdala
AMPC	adenosín monofosfato cíclico
Arc	proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad, del inglés activity-regulated cytoskeleton-associated
BLA	amígdala basolateral, del inglés basolateral amygdala
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés brain-derived neurotrophic factor
CaMKII	cinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina, del inglés Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II
CAS	condicionamiento de aversión al sabor
CEA	amígdala central, del inglés central amygdala
<i>c-fos</i>	gen de expresión temprana
CI	corteza insular
CRE	elemento de respuesta a AMPc, del inglés cAMP response element
CREB	proteína de unión a CRE, del inglés cAMP response element binding protein
EC	estímulo condicionado
EI	estímulo incondicionado
Elk-1	factor de transcripción, del inglés Ets-like transcription factor
ERK	cinasa regulada por señal extracelular, del inglés extracellular signal-regulated kinase
GTP	guanina 5' trifosfato, del inglés guanosine triphosphate
Glu	glutamato
IEG	genes de expresión temprana, del inglés Immediate-early genes
LiCl	cloruro de litio
LTP	potenciación a largo plazo, del inglés long-term potentiation

MAPK	cinasa activada por mitógeno, del inglés mitogen-activated protein kinase
MEK	cinasa de ERK/MAPK, del inglés MAP/ERK kinase
mRNA	ácido ribonucleico mensajero, del inglés messenger Ribonucleic acid
NMDA	N-metil D-aspartato,
NMDAr	receptores N-metil D-aspartato
NTS	núcleo del tracto solitario
PBN	núcleo parabraquial, del inglés parabrachial nucleus
PI3K	cinasa de fosfoinosítido-3, del inglés phosphoinositide 3-kinase
PKA	proteína cinasa A, del inglés cAMP-dependent protein kinase
PKC	proteína cinasa C, del inglés protein kinase C
Raf	proteína cinasa
Ras	GTPasa monomérica
RTK	receptores con actividad de cinasa de tirosina, del inglés receptor tyrosine kinase
SDS	duodecil sulfato de sodio, del inglés sodium dodecyl sulfate
SRE	elemento de respuesta a suero, del inglés serum response element
SRF	factor de respuesta a suero, del inglés serum response factor

## BIBLIOGRAFÍA

- Accolla R, Bathellier B, Petersen CC, Carleton A. Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci.* 2007; 27(6):1396-1404.
- Adams JP, Sweatt JD. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42:135-163.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci.* 1998; 1(7):602-609.
- Bahar A, Dudai Y, Ahissar E. Neural signature of taste familiarity in the gustatory cortex of the freely behaving rat. *J Neurophysiol.* 2004; 92(6):3298-3308.
- Barot SK, Kyono Y, Clark EW, Bernstein IL. Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(52):20959-20963.
- Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol.* 1993; 55:397-426.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(24):13445-13452.
- Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci.* 2010; 33(5):230-240.

- Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci.* 1998; 18(23):10037-10044.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. 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.* 2000; 20:7017–7023.
- Belelovsky K, Elkobi A, Kaphzan H, Nairn AC, Rosenblum K. A molecular switch for translational control in taste memory consolidation. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(10):2560-2568.
- Bermúdez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5:209–217.
- Bermúdez-Rattoni F, McGaugh JL. Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research.* 1991; 549:165–170.
- Bernstein IL, Koh MT. Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses.* 2007; 32(1):99-103.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998; 21(1):13-26.
- Best PJ, White AM, Minai A. Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:459-486.

- Buresova O, Bures J. Cortical and subcortical components of the conditioned saccharin aversion. *Physiology and Behavior*. 1973; 11:435–439.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci*. 2008; 28(46):11760-11767.
- Braun JJ, Slick TB, Lorden JF. Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions. *Physiol Behav*. 1972; 9(4):637-641.
- Castillo DV, Escobar ML. A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behav Brain Res*. 2011; 217(1):248-252.
- Chotiner JK, Nielson J, Farris S, Lewandowski G, Huang F, Banos K, de Leon R, Steward O. Assessment of the role of MAP kinase in mediating activity-dependent transcriptional activation of the immediate early gene *Arc/Arg3.1* in the dentate gyrus in vivo. *Learn Mem*. 2010; 17(2):117-129.
- Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*. 1989; 340(6233):474-476.
- Davis S, Laroche S. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav*. 2006; 5 Suppl 2:61-72.
- Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychology Bull*. 1984; 96:518-559.

- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci.* 2000; 20(12):4563-4572.
- De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermudez-Rattoni F. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci.* 2008; 28(7):1377-1381.
- Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal.* 2005; 17(11):1343-1351.
- Domjan M. Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J Exp Psychol Anim Behav.* 1976; 2:17–27.
- Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol.* 2004; 55:51-86.
- English JD, Sweatt JD. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem.* 1996; 271(40):24329-24332.
- English JD, Sweatt JD. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem.* 1997; 272(31):19103-19106.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research.* 2000; 852:208–212.

- Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F. In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* 1998; 779(1-2):314-319.
- Fanara P, Husted KH, Selle K, Wong PY, Banerjee J, Brandt R, Hellerstein MK. Changes in microtubule turnover accompany synaptic plasticity and memory formation in response to contextual fear conditioning in mice. *Neuroscience.* 2010; 168(1):167-178.
- Ferreira G, Gutiérrez R, De La Cruz V, Bermúdez-Rattoni F. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16:1139–1145.
- Ferreira G, Miranda MI, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F. Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(10):2596-2604.
- Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, Posada J, Cooper JA, Baraban JM. p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. *Neuroscience.* 1993; 55(2):463-472.
- Finkbeiner S, Greenberg ME. Ca<sup>2+</sup> channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol.* 1998; 37(1):171-189.
- Fontanini A, Grossman SE, Figueroa JA, Katz DB. Distinct subtypes of basolateral amygdala taste neurons reflect palatability and reward. *J Neurosci.* 2009; 29(8):2486-2495.

- Gallo M, Roldan G, Bures J. Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res.* 1992; 52(1):91-97.
- García-DeLaTorre P, Rodríguez-Ortiz CJ, Arreguin-Martínez JL, Cruz-Castañeda P, Bermúdez-Rattoni F. Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn Mem.* 2009; 16(9):514-519.
- Garcia J, Kimeldorf DJ, Koelling RA. Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science.* 1955; 122(3160):157-158.
- Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science.* 1986; 234(4772):80-83.
- Greer PL, Greenberg ME. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron.* 2008; 59(6):846-860.
- Gutiérrez H, Hernández-Echeagaray E, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience.* 1999; 89(3):751-758.
- Guzmán-Ramos K, Osorio-Gómez D, Moreno-Castilla P, Bermúdez-Rattoni F. Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *J Neurochem.* 2010; 114(1):226-236.

- Guzowski JF. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*. 2002; 12(1):86-104.
- Hagiwara M, Shimomura A, Yoshida K, Imaki J. Gene expression and CREB phosphorylation induced by cAMP and Ca<sup>2+</sup> in neuronal cells. *Adv Pharmacol*. 1996; 36:277-285.
- Hanamori T, Kunitake T, Kato K, Kannan H. Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J Neurophysiol*. 1998; 79(5):2535-2545.
- Hebb, D. O. *The Organization of Behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley, 1949.
- Horgan AM, Stork PJ. Examining the mechanism of ERK nuclear translocation using green fluorescent protein. *Exp Cell Res*. 2003; 285(2):208-220.
- Hübener M, Bonhoeffer T. Searching for engrams. *Neuron*. 2010; 67(3):363-371.
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*. 1999; 21(4):869-883.
- Irigoyen JP, Besser D, Nagamine Y. Cytoskeleton reorganization induces the urokinase-type plasminogen activator gene via the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Biol Chem*. 1997; 272(3):1904-1909.

- Jones MW, French PJ, Bliss TV, Rosenblum K. Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci.* 1999; 19(21):RC36.
- Kandel, ER, Schwartz J, Jessell TM (eds). *Principles of neural science* 4<sup>a</sup> ed. New York, EU: McGraw-Hill, 2000.
- Katz DB, Simon SA, Nicolelis MA. Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J Neurosci.* 2001; 21(12):4478-4489.
- Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell.* 2004; 116(3):467-479.
- Koh MT, Wilkins EE, Bernstein IL. Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci.* 2003; 117(6):1416-1422.
- Kosar E, Grill HJ, Norgren R. Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain Res.* 1986; 379(2):329-341.
- Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem.* 2007; 14(11):758-770.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem.* 1999; 6(2):77-87.
- Lin PY, Wang SP, Tai MY, Tsai YF. Differential involvement of medial prefrontal cortex and basolateral amygdala extracellular signal-regulated

kinase in extinction of conditioned taste aversion is dependent on different intervals of extinction following conditioning. *Neuroscience*. 2010; 171(1):125-133.

- Lindemann B. Taste reception. *Physiol Rev*. 1996; 76(3):718-766.
- Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, Gean PW. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*. 2001; 31(5):841-851.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(12):5734-5738.
- Lloyd AC. Distinct functions for ERKs? *J Biol*. 2006; 5(5):13.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*. 1995; 14(2):433-445.
- Margolskee RF. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem*. 2002; 277(1):1-4.
- McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 1966; 153(742):1351-1358.
- McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol*. 1998; 55(3):257-332.

- McGaugh JL. Memory: a century of consolidation. *Science*. 2000; 287(5451):248-251.
- Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dageyte G, da Silva B, Bramham CR. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*. 2007; 27(39):10445-10455.
- Mickley GA, Remmers-Roeber DR, Crouse C, Peluso R. Ketamine blocks a taste recognition memory in fetal rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 67(3):575-581.
- Miranda MI, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res*. 2000; 882(1-2):230-235.
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF. Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 2008; 89(3):269-284.
- Moga DE, Calhoun ME, Chowdhury A, Worley P, Morrison JH, Shapiro ML. Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. *Neuroscience*. 2004; 125(1):7-11.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure. *Science*. 1987; 237(4811):192-197.
- Nagai T, Takuma K, Kamei H, Ito Y, Nakamichi N, Ibi D, Nakanishi Y, Murai M, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K. Dopamine D1 receptors regulate

protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn Mem.* 2007; 14(3):117-125.

- Naor C, Dudai Y. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res.* 1996; 79(1-2):61-67.
- Nelson SB, Turrigiano GG. Strength through diversity. *Neuron.* 2008; 60(3):477-482.
- Nishijo H, Ono T, Uwano T, Kondoh T, Torii K. Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various tastant solutions during ingestive behavior in rats. *J Nutr.* 2000; 130:954-959.
- Ogawa H, Ito S, Murayama N, Hasegawa K. Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neurosci Res.* 1990; 9(3):196-201.
- Panja D, Dageyte G, Bidinosti M, Wibrand K, Kristiansen AM, Sonenberg N, Bramham CR. Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo. *J Biol Chem.* 2009; 284(46):31498-31511.
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron.* 2001; 32(1):123-140.

- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 911:369-391.
- Peigneux P, Orban P, Baeteau E, Degueldre C, Luxen A, Laureys S, Maquet P. Offline persistence of memory-related cerebral activity during active wakefulness. *PLoS Biol.* 2006; 4(4):e100.
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B. ERK in learning and memory: A review of recent research. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(1):222-232.
- Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron.* 2005; 48(2):175-187.
- Ploski JE, Pierre VJ, Smucny J, Park K, Monsey MS, Overeem KA, Schafe GE. The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci.* 2008; 28(47):12383-12395.
- Price JL. Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 985:50-58.
- Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(12):2707-2719.
- Rassouli Y, Rezayof A, Zarrindast MR. Role of the central amygdala GABA-A receptors in morphine state-dependent memory. *Life Sci.* 2010; 86(23-24):887-893.

- Rex CS, Gavin CF, Rubio MD, Kramar EA, Chen LY, Jia Y, Haganir RL, Muzyczka N, Gall CM, Miller CA, Lynch G, Rumbaugh G. Myosin IIb regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation. *Neuron*. 2010; 67(4):603-617.
- Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R, Bermúdez-Rattoni F. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem*. 2005; 12(5):533-537.
- Roesler R, Schröder N. Cognitive enhancers: Focus on modulatory signaling influencing memory consolidation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011; En proceso de impresión.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol*. 1993; 59(1):49-56.
- Rosenblum K, Schul R, Meiri N, Hadari YR, Zick Y, Dudai Y. Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995; 92:1157–1161.
- Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci*. 1997; 17:5129–5135.
- Rossato JI, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*. 2009; 325(5943):1017-1020.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*. 2003; 83(3):803-834.

- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem.* 1999; 6(2):97-110.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci.* 2000; 20(21):8177-8187.
- Scheiderer CL, Smith CC, McCutchen E, McCoy PA, Thacker EE, Kolasa K, Dobrunz LE, McMahon LL. Coactivation of M(1) muscarinic and alpha1 adrenergic receptors stimulates extracellular signal-regulated protein kinase and induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus. *J Neurosci.* 2008; 28(20):5350-5358.
- Scott K. Taste recognition: food for thought. *Neuron.* 2005; 48(3):455-464.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:821-861.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron.* 2006; 52(3):475-484.
- Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 1990; 4(4):477-85.

- Shimura T, Suzuki M, Yamamoto T. Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Res.* 1995; 679(2):221-226.
- Squire LR, Clark RE, Knowlton BJ. Retrograde amnesia. *Hippocampus.* 2001; 11(1):50-55.
- Steward O, Worley PF. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron.* 2001; 30(1):227-240.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron.* 1998; 21(4):741-751.
- Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem.* 2001; 76(1):1-10.
- Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2004; 14(3):311-317.
- Tzingounis AV, Nicoll RA. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron.* 2006; 52(3):403-407.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D. Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca<sup>2+</sup> and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci.* 2001; 21(15):5484-5493.

- Yamagata K, Andreasson KI, Sugiura H, Maru E, Dominique M, Miki N, Hayashi Y, Yoshioka M, Kaneko K, Kato H, Worley PF. Arcadlina is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem.* 1999; 274(27):19473-19479.
- Yamamoto T. Taste responses of cortical neurons. *Prog Neurobiol.* 1984; 23(4):273-315.
- Yamamoto T, Azuma S, Kawamura Y. Functional relations between the cortical gustatory area and the amygdala: electrophysiological and behavioral studies in rats. *Exp Brain Res.* 1984; 56(1):23-31.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res.* 1994; 65(2):123-137.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci.* 2002; 22(5):1532-1540.
- Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006; 24(1):21-44.
- Zheng F, Luo Y, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor-mediated transcription of the immediate early gene Arc by intracellular calcium and calmodulin. *J Neurosci Res.* 2009; 87(2):380-392.