



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Fisiología Celular

PARTICIPACIÓN DEL LÓBULO TEMPORAL  
EN LA CONSOLIDACIÓN Y RECONSOLIDACIÓN  
DE LA EXTINCIÓN DEL CONDICIONAMIENTO  
DE AVERSIÓN AL SABOR

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**PAOLA GARCÍA DE LA TORRE**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

COMITÉ TUTOR: DRA. ELIZABETH A. HERNÁNDEZ ECHEGARAY  
DR. OSCAR PROSPERO GARCÍA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 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.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de septiembre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **GARCÍA DE LA TORRE PAOLA** con número de cuenta **505013578** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DEL LÓBULO TEMPORAL EN LA CONSOLIDACIÓN Y RECONSOLIDACIÓN DE LA EXTINCIÓN DEL CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR"**, realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI**.

Presidente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY  
Vocal: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA  
Secretario: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
Suplente: DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA  
Suplente: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de octubre de 2011.

*María del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. de Becario 193977)

Por sus enseñanzas y atención agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, tutor principal de mi tesis de doctorado. Además por sus acertados consejos y colaboración con este proyecto a la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray y al Dr. Oscar Próspero García.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi esposo Víctor por su eterna paciencia, consuelo y apoyo a lo largo de estos años. Te adoro.

A mis padres por enseñarme todo lo que sé de la vida, por darme siempre más de lo que puedo pedir y por hacer de mi todo lo que soy hoy.

Ale y Juan, gracias por crecer conmigo, por compartir felicidad y tristeza, y por recordarme que no todo es blanco o negro en la vida.

Kiara e Iker son siempre mi descanso, la luz al final del túnel, gracias enanos, los quiero.

A mis abuelos, por compartir conmigo su sabiduría y ser mi refugio en innumerables ocasiones.

A Cristina, Consuelo, Katia y Leonardo por ser tan buenos alumnos y amigos. Sin ustedes esto jamás habría sido posible.

Azul, Kioko, Julio, Lucía, Daniel y Mónica, gracias por haber hecho de mi doctorado una experiencia inolvidable.

# ÍNDICE

Listado de Figuras	4
Abreviaturas	5
Resumen	6
Abstract	7
Capítulo I	
Introducción	10
Lóbulo temporal medial	11
Consolidación	12
Extinción	14
Reconsolidación	16
Memoria de reconocimiento de sabores	18
Capítulo II	
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	23
Objetivos	23
Capítulo III	
Metodología	25
Sujetos y cirugía	25
Reactivos y soluciones	25
Procedimientos conductuales	26
Capítulo IV	
Resultados	28

## Capítulo V

Discusión y Conclusiones	35
Referencias	40

## Anexos

- A. Garcia-Delatorre, P., Rodriguez-Ortiz, C.J., Arreguin-Martinez, J.L., Cruz-Castaneda, P. & Bermudez-Rattoni, F. (2009) Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn. Mem.*, 16, 514–519.
- B. Garcia-Delatorre P, Rodríguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F. (2010) Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *Eur J Neurosci.*, 32(6):1018-23

## **FIGURAS**

- 1 Esquema de las características conductuales de la extinción. Tomado de Myers y Davis, 2002.
- 2 Representación esquemática de las teorías de la consolidación y reconsolidación de la memoria. Tomado de Dudai, 2009.
- 3 Representación gráfica de la tarea de reconocimiento de sabores. Tomado de Bermúdez-Rattoni, 2004.
- 4 Participación del lóbulo temporal en la reconsolidación del CAS. Tomado de García-de-laTorre, 2008.
- 5 Amígdala Central en la extinción del CAS
- 6 Amígdala Basolateral en la extinción del CAS
- 7 Corteza Insular en la extinción del CAS
- 8 Corteza Perirrinal en la extinción del CAS
- 9 Hipocampo en la extinción del CAS
- 10 Lóbulo temporal medial en la extinción del CAS



## ABREVIATURAS

ABL	amígdala basolateral
ACe	amígdala central
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
CaN	calcineurina
CAS	condicionamiento de aversión al sabor
CI	corteza insular
EC	estímulo condicionado
EI	estímulo incondicionado
HP	hipocampo
MCP	memoria a corto plazo
MLP	memoria a largo plazo
NMDA	<i>N</i> -metil <i>D</i> -aspartato
PK	proteína cinasa
PR	corteza perirrinal

## RESUMEN

El proceso de extinción se ha descrito como la disminución en la frecuencia o intensidad de la respuesta condicionada seguida del retiro del reforzador o estímulo incondicionado. Por lo tanto, la extinción experimental no refleja el olvido de la memoria original sino un nuevo aprendizaje que requiere de ser consolidado para mantenerse al largo plazo. Durante la extinción del condicionamiento de aversión al sabor (CAS), un sabor que se ha asociado a malestar gástrico, vuelve al estatus de seguro por presentaciones continuas del sabor sin consecuencia aversiva.

En este trabajo se analizaron las estructuras del lóbulo temporal que podrían estar involucradas en la consolidación y reconsolidación de la extinción del CAS mediante la síntesis de nuevas proteínas. Nuestros resultados mostraron que el hipocampo y las cortezas perirrinal e insular participan en la consolidación de la extinción del CAS, mientras que la amígdala basolateral y central no están involucradas en la formación de esta memoria. Además, encontramos que la corteza insular es en parte responsable de la reconsolidación de la extinción del CAS. La inhibición de la síntesis de proteínas en esta estructura evita que la memoria sea reconsolidada afectando al trazo previo.

La participación del hipocampo en la memoria de reconocimiento de sabores no ha sido estudiada a profundidad, sin embargo, se ha descrito a esta estructura como un modulador a la baja de la consolidación del CAS y se ha relacionado también a asociaciones sabor-contexto. Sin embargo, es claro que esta estructura participa en la consolidación de sabores seguros pero no aversivos. En conjunto, estos datos sugieren que las memorias seguras son procesadas por la corteza insular y perirrinal y por el hipocampo mientras que las memorias aversivas dependen de la corteza insular y de la amígdala.

## ABSTRACT

The extinction process has been described as the decline in the frequency or intensity of the conditioned response following the withdrawal of reinforcement. Hence, experimental extinction does not reflect forgetting of the original memory but rather reflects new learning, which requires of consolidation in order to remain in a long-term. During extinction of conditioned taste aversion (CTA) a taste previously associated as aversive, returns to a safe status by continuous presentations of the flavor with no aversive consequence. In addition, reconsolidation has been defined as a labile state of a consolidated memory after its reactivation by presentation of relevant information.

For CTA extinction, it would involve destabilization of a previously consolidated extinction trace obtained by various taste presentations. In this paper, we analyzed structures from the temporal lobe that could be involved in consolidation and reconsolidation of extinction of CTA by means of new protein synthesis.

Our results showed that protein synthesis in the hippocampus (HC), the perirrhinal (PR) and insular cortices (IC) participate in extinction consolidation, while neither the basolateral (BLA) nor the central nuclei of the amygdale (CeA) have a part on this phenomenon. Furthermore, we surprisingly found that the inhibition of protein synthesis in the IC on a third extinction trial has an effect on reconsolidation of extinction. The participation of the HC in taste memory has yet to be elucidated, even though it has been described as a down modulator for CTA consolidation and has been related to a context-taste association. Nonetheless, it is clear that this structure is essential for consolidation of safe taste memory. Furthermore, the same structures that we found take part in CTA extinction were reported to participate in neophobia attenuation. Altogether, these data suggests that safe taste memories are sub served by the IC, HC and PR, whereas aversive taste memories depend on the IC and CeA.

**Participación del lóbulo temporal  
en la consolidación y re consolidación de la extinción  
del condicionamiento de aversión al sabor**

# CAPÍTULO I

# INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el cerebro ha sido un órgano enigmático que fue poco estudiado por mucho tiempo. Los primeros intentos de Karl Lashley por localizar la memoria en el cerebro datan de los años 20s. En esa época, Lashley entrenó ratas en un laberinto simple realizando pruebas de memoria y relacionándolas con el tamaño del área cortical que había retirado del animal. Más adelante Hebb describió los resultados de Lashley sugiriendo que las conexiones que se forman durante el aprendizaje no podían estar localizadas en una sola región del cerebro. La postura actual es que la memoria está distribuida en todo el cerebro pero cada estructura almacena una parte específica del todo (Squire y Kandel, 2009). En este trabajo en particular nos interesa el estudio de las estructuras que se ha visto participan en la formación y permanencia de la memoria de reconocimiento de sabores.

El estudio formal de la memoria comenzó en el siglo XIX con los estudios del alemán Herman Ebbinghaus, quien en su trabajo *“Uber das Gedachtnis”* (*Sobre la memoria*) realizó un análisis sistemático de la memoria por medio de experimentos basados en la memorización de sílabas sin sentido con lo que realizó una curva de aprendizaje; a través de estos experimentos observó una relación entre el tiempo y la capacidad para recordar las sílabas, ya que entre mayor tiempo post adquisición, menor número de sílabas podían recordar. Más adelante, William James en su obra *“Principles of Phsycology”* (*Principios de psicología*) realizó una distinción entre lo que él llamó memorias “primarias” y “secundarias”. Las primeras las definió como el conocimiento que no era necesario evocar porque no ha abandonado el curso principal de nuestro conocimiento, mientras las segundas se refieren a la información que ha dejado de ocupar nuestra atención y que hemos dejado de tener conciencia en ella pero que puede recuperarse a voluntad cuando se necesite (Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001). En la actualidad se hace referencia a los dos tipos de memoria análogos a los propuestos por James; la memoria de corto plazo (MCP), cuando es de duración corta y va de segundos a horas y, la memoria de largo plazo (MLP) cuando la duración es mayor (Dudai, 2002).

La permanencia a largo plazo de una memoria se ha visto relacionada con la síntesis de nuevas proteínas y se conoce como consolidación.

### *Lóbulo temporal medial*

El entendimiento acerca de cómo el cerebro puede aprender y memorizar se adquirió con el caso del paciente conocido como H.M. Este paciente sufría de epilepsia severa para lo cual se le extirpó la porción medial de ambos lóbulos lo que alivia en gran medida los ataques convulsivos. Sin embargo, esta cirugía dejó al paciente con amnesia retrógrada irreversible severa. Los científicos dedujeron entonces que el lóbulo temporal medial estaba participando en el paso de la memoria de corto plazo a memoria de largo plazo. Desde entonces se han relacionado estructuras del lóbulo temporal medial específicas a los diferentes tipos de memoria (SfN).

Por ejemplo, la corteza perirhinal (PR) participa en la familiaridad del estímulo, el hipocampo (HC) se ha relacionado a la asociación entre estímulos, la corteza insular (CI) a la memoria de reconocimiento de sabores y la amígdala a memorias con peso emocional (Kandel et al. 2000; Squire y Zola-Morgan, 1991). Es decir, mientras que la región temporal del cerebro es importante para la formación, organización, consolidación y evocación de la memoria, las áreas corticales son importantes para el almacenamiento a largo plazo del conocimiento de hechos y eventos y el uso de dicho conocimiento en situaciones cotidianas (SfN).

Una memoria debe ser consolidada después de su adquisición, esto es, requiere de la síntesis de nuevas proteínas para su almacenamiento a largo plazo (Kandel et al. 2000). La memoria ya consolidada puede ser evocada, permitiendo el acceso, selección o reactivación de representaciones internas (Dudai, 2002). Por lo tanto, el aprendizaje se puede definir como la adquisición de información o reorganización de información que resulta en un nuevo conocimiento (Dudai, 2002).

## *Consolidación*

El término de consolidación se atribuye a Muller y Pilzecker quienes observaron que las memorias tardan tiempo en fijarse (Dudai, 2004). Así lo propusieron en su hipótesis de la preservación-consolidación de la memoria a partir de los estudios que realizaron en humanos. Ellos encontraron que la memoria recién aprendida era interrumpida por el aprendizaje de otro tipo de información si éste era presentado poco tiempo después, sugiriendo así que los procesos que subyacen a las nuevas memorias persisten en un inicio en un estado frágil y se consolidan a través del tiempo (McGaugh *et al.*, 2000).

De acuerdo con la hipótesis de la consolidación, un trazo de memoria se estabiliza y es capaz de fortalecerse a través del tiempo. Experimentalmente se ha demostrado que ciertos tratamientos pueden interrumpir este proceso; en los años cuarenta se reportó que los choques electro-convulsivos después del entrenamiento producen un deterioro en la memoria. Sin embargo, cuando el mismo tratamiento fue aplicado en puntos progresivamente más distantes en el tiempo al entrenamiento, los animales mostraron una reducción significativa y gradual en el deterioro de la memoria (Duncan, 1949). Los estudios de Duncan contribuyen a la hipótesis de Muller y Pilzecker, ya que propone que el aprendizaje requiere tiempo para estabilizarse en una memoria duradera.

Durante la década de los 60's se fomentó el desarrollo de múltiples estudios que demostraron que la administración farmacológica de inhibidores de síntesis de proteínas después del entrenamiento provoca que la MLP se vea afectada (Flexner *et al.*, 1965). Al contrario, la MCP no presentaba ningún deterioro con la aplicación del mismo tratamiento. Por ejemplo, en un entrenamiento en un laberinto en forma "T" entrenaron ratones para que aprendieran a escapar de un brazo a otro ya que en uno de ellos recibían choques eléctricos. Al administrar acetociclohexamida (un inhibidor de la síntesis de proteínas) intracerebralmente, 5 horas antes del entrenamiento y realizando la prueba 3 horas después del mismo, no se observó un deterioro en la MCP. Sin embargo, cuando la prueba fue realizada en horas posteriores o incluso días después, la memoria a largo plazo estaba severamente afectada (Barondes y Cohen, 1967). Como conclusión de estos trabajos, se estableció que la consolidación es el periodo durante el cual nuevas proteínas son



sintetizadas en las neuronas para almacenar la información adquirida a largo plazo (McGaugh, 2000).

El proceso celular responsable de una memoria de corto plazo implica sólo la activación de cascadas de transducción, proceso por el cual la célula transforma una señal extracelular en una respuesta celular. Para el almacenamiento de la memoria a largo plazo, las señales de transducción llegan al núcleo celular donde se produce el proceso de transcripción que desencadena la traducción del RNA el cual finalmente lleva a la síntesis de nuevas proteínas, las cuales produce alteraciones temporales de la transmisión sináptica en modificaciones persistentes de la arquitectura sináptica. A esto se le conoce como consolidación celular o sináptica (Dudai, 2004).

La teoría de la consolidación propone que a través de la síntesis de proteínas *de novo*, memorias adquiridas recientemente se fortalecen en el tiempo en un trazo de memoria estable a largo plazo (McGaugh 1966, 2000; Davis y Squire 1984). Este proceso molecular es el más estudiado hasta ahora en la formación de la memoria.

Al respecto, se sabe que una de las proteínas sintetizadas durante la consolidación de la memoria es el BDNF (Brain-derived neurotrophic factor/factor neurotrópico derivado de cerebro). Escobar y colaboradores (Moguel-González et al. 2008) describieron la reversibilidad del efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre la memoria de un paradigma de condicionamiento al sabor, por medio de inyecciones de BDNF intracerebrales.

Más recientemente se describió la participación de PKM $\zeta$  (isoforma M $\zeta$  de la proteína cinasa PKC) en la permanencia de la memoria. Como explica Sacktor (Sacktor, 2011) en la última revisión del tema, PKM $\zeta$  es una cinasa exclusiva del tejido nervioso, constitutivamente activa y cuya fosforilación permite el mantenimiento del LTP y de la memoria a largo plazo. En trabajos anteriores se ha demostrado que la inhibición de esta cinasa afecta la memoria a largo plazo incluso después de meses de su consolidación (Schema et al. 2007).

## *Extinción*

La extinción fue descrita desde que Pavlov realizó sus experimentos sobre tareas asociativas en 1928 y se define como la disminución en la frecuencia o intensidad de una respuesta condicionada en ausencia del estímulo incondicionado (Quirk y Mueller, 2008). Esta definición explica la conducta esperada cuando el proceso de extinción se lleva a cabo en un paradigma experimental, sin embargo, a nivel de mecanismos moleculares carece de explicación y esto es porque a nivel molecular la extinción es consolidada, es decir, la extinción requiere de ser aprendida y consolidada para su permanencia a largo plazo. Por ello, se ha sugerido que la extinción no representa el olvido de una tarea aprendida sino un nuevo aprendizaje que sustituye la respuesta conductual de la primera asociación (Myers y Davis, 2002).

Se han descrito diferencias entre los mecanismos de consolidación de una memoria y los involucrados en la extinción de la misma. Por ejemplo, Berman y Dudai (2001) quienes describen diferencias en los procesos involucrados en la consolidación del condicionamiento de aversión al sabor (CAS), una tarea en la que el sujeto de estudio asocia un sabor a malestar gástrico, en comparación con su extinción. Los receptores muscarínicos, receptores  $\beta$  adrenérgicos, MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) y síntesis de nuevas proteínas son esenciales para la consolidación del CAS; la extinción es independiente tanto de receptores muscarínicos como de la MAPK. Además, a nivel conductual se sabe que la extinción de una de las claves asociadas al estímulo aversivo, no generaliza la extinción de una memoria al resto de las claves a las que está asociado el estímulo incondicionado (Yang et al., 2011), es decir, no modifica la respuesta condicionada por completo.

La extinción es un proceso activo de aprendizaje distinto al de la adquisición que requiere de entrenamiento adicional para desarrollarse y de un proceso de consolidación, dependiente de síntesis de nuevas proteínas, para su persistencia a largo plazo. De acuerdo a esta definición de extinción, la respuesta condicionada puede recuperarse ya que el trazo original no se ha perdido, sino que se ha creado un nuevo trazo. Al respecto, se reportó que después del CAS, un sabor cambia su representación cortical después de la extinción del CAS, aunque estos cambios no

originaron una representación idéntica a la original (Accolla y Carleton, 2008). Es decir, es más probable que se haya creado una nueva representación del sabor a que se haya modificado la original, lo que apoyaría la idea de que la extinción es en sí un nuevo aprendizaje.

Al respecto, se ha observado que después de la extinción la respuesta condicionada original puede volver a expresarse. La recuperación de la conducta previamente extinta se ha descrito bajo tres condiciones generales: recuperación espontánea, renovación y restablecimiento (figura 1). La recuperación espontánea se observa cuando se realiza una prueba de memoria después de un periodo de tiempo considerablemente largo; la renovación ocurre cuando el estímulo condicionado se da en un contexto diferente al de la extinción; y el restablecimiento al presentar el estímulo incondicionado de manera inesperada (Myers y Davis, 2002).

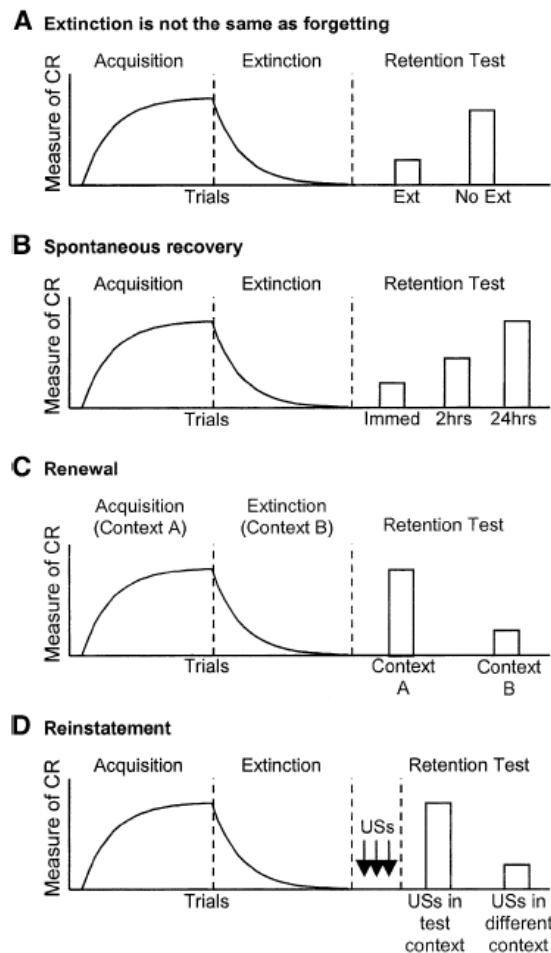


Figura 1. Tomado de Myers y Davis, 2002. Aquí se esquematizan las características conductuales de la extinción. (A) La extinción requiere de un periodo de adquisición, por ello se puede decir que no es olvido. (B) Recuperación instantánea, la respuesta condicionada (RC) puede reaparecer después de un periodo extendido de tiempo. (C) Renovación, la extinción es específica del contexto en el que se

adquiere, por ello la RC puede reaparecer al probar en un contexto distinto al de la extinción. (D) Restablecimiento, la RC puede recuperarse al presentar el estímulo incondicionado de manera inesperada.

Para la consolidación de una tarea de reconocimiento de sabores (Condicionamiento de aversión al sabor) se requiere de la disminución de la calcineurina (CaN) y disminución del factor de transcripción Zif268 en la amígdala, mientras que la actividad de la CaN no se altera por la extinción de la tarea y la sobreexpresión de Zif268 tampoco afecta este proceso de la memoria (Baumgärtel et al. 2008). La extinción entonces se puede explicar como un re-aprendizaje sino que además es molecularmente distinto al aprendizaje original.

### *Reconsolidación*

Se pensaba que después de la consolidación la memoria no podía ser afectada por agentes amnésicos. Sin embargo, ahora se sabe que cuando se reactiva (evoca) la memoria consolidada se vuelve sensible a estos agentes y requiere de síntesis de proteínas una vez más para mantenerse a largo plazo (Sara 2000; Suzuki et al. 2004). Este proceso se conoce como reconsolidación (Nader et al. 2000) y se ha estudiado en diferentes tareas de memoria y estructuras cerebrales (revisado en Dudai y Eisenberg 2004). No obstante, el término reconsolidación ha sido desafiado y parece inadecuado ya que existe evidencia que muestra que este proceso no es una recapitulación fiel de la consolidación (Dudai 2006). Al respecto se ha demostrado que la consolidación y la reconsolidación comparten algunos mecanismos moleculares pero difieren en muchos otros (revisado en Dudai y Eisenberg 2004). Por ejemplo, el BDNF en el hipocampo se requiere para la consolidación del condicionamiento al miedo de contexto pero no para su reconsolidación (Lee et al. 2004). Por otra parte, la PKA (proteína-cinasa A) se requiere en la amígdala basolateral (ABL) para ambos mecanismos en una tarea de condicionamiento al sabor (Koh y Bernstein 2003).

Además, se ha propuesto que la reconsolidación es un proceso que incorpora información relevante a un trazo de memoria previamente consolidado (Sara, 2000; Rodríguez-Ortiz et al. 2005; Rodríguez-Ortiz et al. 2008). Cuando la actualización de la memoria ocurre, la memoria previamente almacenada se desestabiliza (Lee 2008) y puede entonces ser afectada por inhibidores

de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, cuando el comportamiento ha alcanzado un nivel asintótico y no hay un aprendizaje evidente, la memoria previamente consolidada permanece estable y resistente a tratamientos amnésicos (Rodríguez-Ortiz et al. 2005).

Con estos descubrimientos surge un nuevo esquema tratando de explicar los procesos de los que depende la memoria. Dudai (2009) sugiere entonces los esquemas presentados en la figura 2 para describir las teorías que hasta ahora se han propuesto y que podrían explicar lo que ocurre con un trazo de memoria. El esquema *a* muestra la clasificación básica de la memoria que representa el paso de una memoria de corto plazo a una de largo plazo a través del tiempo y que es conocido como el trazo dual. Con la introducción de la teoría de la consolidación se incorporan a este diagrama nuevos componentes creando un diagrama más relajado en el que la memoria ya consolidada puede ser evocada nuevamente cuando sea necesario en el contexto de la consolidación de sistemas. Un concepto alternativo, plantea que la memoria puede estar en dos estados alternantes (figura *2b*), el estado activo se refiere al tiempo durante e inmediatamente después de la consolidación o la evocación, el resto del tiempo se considera que la memoria está en un estado inactivo. Este modelo se puede ver como un modelo cíclico en el que los estados de actividad e inactividad del trazo de memoria fluctúan en el tiempo.

Tanto la teoría de la consolidación como la de la reconsolidación sugieren que el estado activo de la memoria provoca un estado especial (post-activación) en la que el trazo es sumamente plástico y lábil lo que permite cambios post-consolidación dando un esquema en el que ya puede hablarse de reconsolidación. Este mismo modelo “cíclico” se ha visto modificado con los reportes de efectos sobre un trazo de memoria aún cuando éste no haya sido reactivado (figura *2c*; Dudai, 2009).

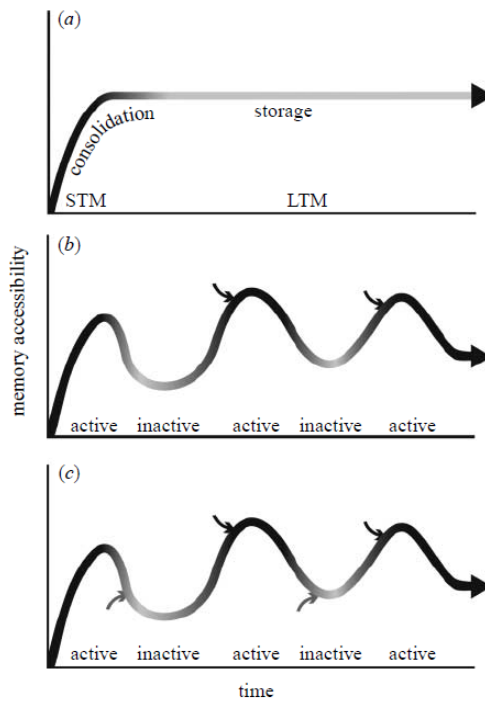


Figura 2. Tomado de Dudai, 2009. Representación esquemática de las teorías de la consolidación y reconsolidación de la memoria. a) Modelo clásico, b) Modelo cíclico y c) Modelo cíclico modificado.

En este modelo cíclico se reflejan los puntos lábiles de la memoria ya consolidada lo que esquematiza de una manera el proceso de actualización que representa la reconsolidación de la memoria. Así mismo, permite explicar más fácilmente el proceso de consolidación durante el sueño, tema en el que no ahondaremos en este trabajo.

### *Memoria de reconocimiento de sabores*

Una de las destrezas de supervivencia más importantes para los animales y que se ha desarrollado a través de la evolución, es la memoria de reconocimiento de sabores. La memoria de reconocimiento es la habilidad de discriminar la familiaridad de cosas previamente experimentadas. En el caso de la comida, cuando un animal experimenta un sabor nuevo, éste vacila para comerlo mostrando un consumo reducido (respuesta neofóbica). Sin embargo, cuando el nuevo sabor no tiene una consecuencia nociva, se reconoce como seguro (preferido) lo que lleva a un incremento en el consumo. Pero si el nuevo sabor se asocia a un malestar, el animal lo rechaza la próxima vez, desarrollando una aversión de larga duración (el sabor se convierte en una señal aversiva), este

forma de memoria de reconocimiento se conoce como condicionamiento de aversión al sabor (CAS; revisado en Bermúdez-Rattoni 2004). La extinción se define como la disminución en frecuencia o intensidad de la respuesta condicionada seguida de la ausencia del reforzamiento y refleja un re-aprendizaje más que el olvido de la tarea. Para el CAS, la extinción consiste en presentar el estímulo condicionado (sacarina) sin el estímulo incondicionado (malestar gástrico) después de una o más asociaciones del EC-EI. La figura 3 muestra una gráfica simbólica representando la neofobia, atenuación de la neofobia, CAS y extinción del CAS.

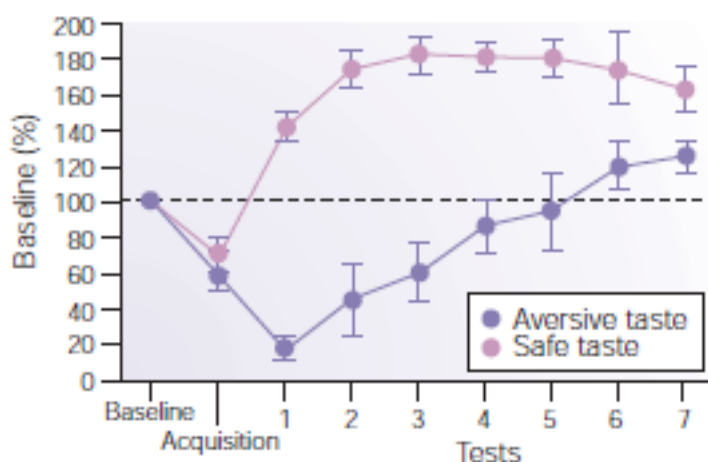


Figura 3. Tomado de Bermúdez-Rattoni, 2004. Consumo de sacarina representado en porcentaje de la línea basal de consumo de agua. Hay un decremento en el consumo (neofobia) durante la primera presentación de sacarina. Los círculos morados representan el grupo que recibió un agente de inducción de malestar (inyecciones de LiCl) después de la primera exposición a la sacarina desarrollando así aversión condicionada al sabor (CAS). Los círculos rosas representan al grupo que mostró atenuación de la neofobia por las repetidas presentaciones de la sacarina.

El CAS es una tarea conveniente para investigar los mecanismos de la reconsolidación en un protocolo de aprendizaje aversivo. En este paradigma, se presenta un sabor (sacarina) a las ratas que actúa como el estímulo condicionado (EC). Después, se induce malestar gástrico con una inyección de cloruro de litio que actúa como el estímulo incondicionado (EI). La respuesta conductual del animal en el día de la prueba es un decremento en el consumo del nuevo sabor como resultado de la asociación EC-EI. Esta tarea se puede adquirir en un solo ensayo y la memoria aversiva resultante se puede medir varios días después. El trazo de memoria aversiva se puede extinguir con el re-aprendizaje de un trazo nuevo, no aversivo, a partir de exposiciones repetidas a la sacarina que ya no es pareado con el malestar gástrico (EC-noEI).

Varios reportes indican que tanto la CI (Dunn y Everitt 1988; Rosenblum et al. 1993; Escobar et al. 1998; Yasoshima y Yamamoto 1998) como la amígdala (Yamamoto y Fujimoto 1991; Yamamoto 2007; Bahar et al. 2004) subyacen la consolidación del CAS.

Se ha postulado que la memoria gustativa depende de una representación neural del sabor que probablemente permanece almacenada en varias regiones cerebrales en paralelo; esta representación neural ha sido llamada trazo de memoria gustativa (Bures et al. 1998). Al respecto, hemos demostrado previamente que para la formación de un trazo de memoria de aversión al sabor es necesaria la actividad colinérgica tanto en la CI como en la amígdala. Así, lesiones inducidas por NMDA en el núcleo basalis magnocellularis provocan una interrupción de la adquisición de la aversión al sabor debido a una reducción de actividad colinérgica considerable tanto en la amígdala como en la CI (Gutiérrez et al. 1999). Se han descrito también interconexiones entre la amígdala y la CI usando rastreadores retrógrados y bidireccionales. Se encontró que las partes agranular y disgranular de la ínsula tienen conexiones prominentes con la amígdala, lo que podría mediar las conductas generadas por estímulos aversivos (Höistad and Barbas 2008). Al respecto, Escobar y Bermúdez-Rattoni (2000) reportaron que la estimulación tetánica de la ABL induce LTP (long-term potentiation; potenciación a largo plazo) en la CI lo que mejora la retención del CAS. Similarmente, se ha demostrado que aplicaciones de glutamato en la amígdala mejoran la memoria de aversión al sabor y este efecto se puede bloquear con infusiones de un antagonista de NMDA en la CI (Ferreira et al. 2005).

La consolidación del CAS requiere de la síntesis de proteínas en la CI y en la amígdala. Bahar y colaboradores (2003; 2004) encontraron que la inhibición de la síntesis de proteínas en la amígdala central (ACe) pero no en la ABL bloquea la consolidación del CAS, sin embargo, infusiones en cualquiera de estos núcleos de la amígdala no afectan la reconsolidación de la memoria del CAS. Estos resultados sugieren que para la formación y consolidación de la memoria de aversión al sabor se requiere de una interacción dinámica entre la amígdala y la CI.

La reconsolidación, en cambio, depende tanto de la CI como de la amígdala como pudimos comprobar anteriormente en el laboratorio (García de la Torre et al. 2008). Inyecciones de



anisomicina tanto en la CI como en la amígdala fueron necesarias para afectar la memoria previa en el CAS. Ambas estructuras son necesarias para la formación de la memoria del CAS pero aparentemente el trazo es almacenado de manera independiente en cada una de ellas por lo que es necesario afectar a ambas estructuras durante la desestabilización del trazo (ocasionado por la adquisición de un segundo CAS) para afectar el trazo previo, estos resultados se muestran de manera esquemática en la figura 4 y el artículo in extenso se encuentra como Anexo A.

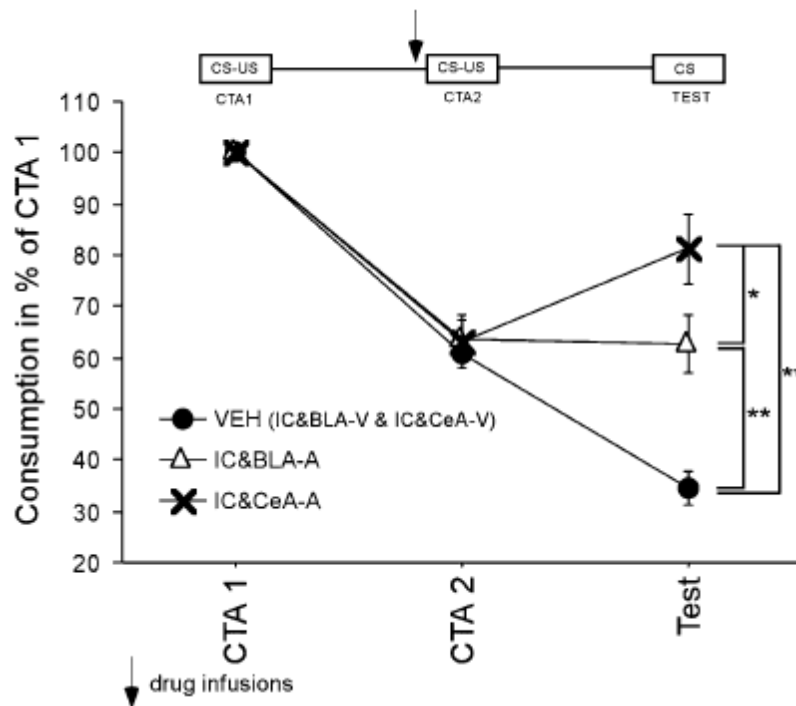


Figura 4. Tomado de García-de la Torre, 2008. La inhibición de la síntesis de proteínas de manera simultánea en la corteza insular y amígdala basolateral tiene efecto únicamente sobre la consolidación de la segunda adquisición ( $\Delta$ ) del CAS mientras que este mismo protocolo en la corteza insular y amígdala central afectan tanto la primera como la segunda adquisición (X), es decir tiene efecto sobre la reconsolidación de la memoria del CAS.

Para la consolidación de la atenuación de la neofobia la síntesis de nuevas proteínas en la corteza perirrinal, hipocampo y corteza insular es necesaria (De la Cruz et al. 2008). Esta tarea consiste en catalogar un sabor como seguro tal como ocurre durante la extinción del CAS. La extinción del CAS ha sido menos estudiada pero se sabe que se requiere de síntesis de proteínas en la corteza prefrontal (Mickley et al 2005) y en la CI para su consolidación (Berman y Dudai 2001). Ambas tareas están relacionadas con la memoria de reconocimiento de sabores y son las que pretendemos estudiar en este trabajo.

# CAPÍTULO II

### *Planteamiento del Problema*

La definición de la extinción experimental plantea que se trata de un nuevo aprendizaje y que requiere de consolidación para su permanencia a largo plazo. Específicamente en la tarea de CAS, la extinción es un proceso en el cuál un sabor ya catalogado como aversivo cambia a ser seguro. Para la memoria de reconocimiento de sabores, sabemos también, que la atenuación de la neofobia (sabor seguro) depende de estructuras distintas a las del CAS (sabor aversivo). Dados estos antecedentes, decidimos evaluar la participación de estas estructuras en la consolidación de la extinción del CAS. A diferencia de la atenuación de la neofobia, la extinción del CAS ofrece información acerca de los procesos que intervienen al modificar la estrategia ante un estímulo que ya fue catalogado como aversivo.

Además, en el proceso de definir qué estructuras del lóbulo temporal están participando, surge el planteamiento de que la extinción puede sufrir de un proceso de reconsolidación. Dado que estamos partiendo de la premisa “la extinción es un nuevo aprendizaje” estudiaremos la labilidad del trazo de extinción ya consolidado mediante un protocolo que desencadene la reconsolidación de la extinción del CAS.

### *Hipótesis*

- Las estructuras que participan por medio de la síntesis de proteínas en la extinción del CAS, serán similares a las que lo hacen durante la atenuación de la neofobia por tratarse de una asociación segura del sabor.
- Una memoria de extinción puede ser reconsolidada por lo que podremos observar un efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la labilidad del trazo ya consolidado de la extinción del CAS.

### *Objetivo general*

Estudiar la participación del hipocampo, corteza insular, corteza perirrinal, amígdala central y amígdala basolateral en la extinción del CAS

### *Objetivos específicos*

Estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas por medio de inyecciones intracerebrales de anisomicina en la CI, HC, PR ACe y ABL tanto en la consolidación como en la reconsolidación de la extinción del CAS

# CAPÍTULO III

# METODOLOGÍA

## *Sujetos y cirugía*

Ratas Wistar macho de 280 g obtenidas del vivario del Instituto de Fisiología Celular. Los animales son colocados en cajas individuales con acceso a comida y agua ad libitum a menos que se señale lo contrario. Se encuentran a una temperatura de  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$  en un ciclo de luz/obscuridad de 12h/12h.

Cirugía en la corteza insular (CI) para insertar bilateralmente cánulas de 12mm de largo y 23Ga en las coordenadas AP + 1.2, DV - 4 y L +/- 5.5 y en corteza perirrinal (PR) en AP - 3, DV - 5 y L +/- 6.5. Introduciendo el inyector 2 mm más en el momento de realizar las inyecciones. Cirugía en la amígdala central (ACe) en las coordenadas AP - 2.2, DV - 5.8 y L +/- 4 para insertar cánulas de 12mm de largo y para amígdala basolateral (ABL) en las coordenadas AP - 2.8, DV - 6.5 y L +/- 5. Introduciendo el inyector 2mm para realizar las inyecciones. Las cánulas utilizadas para llegar al hipocampo (HC) son de 9mm de largo y las coordenadas AP - 3.4, DV - 2.7 y L +/- 1.7. Todas las ratas tienen 7 días de recuperación antes de pasar por cualquier otro procedimiento.

## *Reactivos y soluciones:*

- Sabores: sacarina 0.1% para los experimentos de Condicionamiento de aversión al sabor y su extinción; sacarina 0.3%, quinina 0.005% y NaCl 0.1M para los experimentos de atenuación de la neofobia.
- Cloruro de litio: 0.15M ó 0.4M dependiendo del experimento.
- ASCF (artificial cerebrospinal fluid) se utilizó como solución vehículo al inyectar anisomicina.
- Anisomicina, un inhibidor de síntesis de proteínas, que actúa a nivel de traducción al inhibir la peptidil transferasa. Dosis 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  en cada hemisferio para la amígdala y 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  para la corteza insular, en una concentración de 120mg/ml diluida en ASCF.

*Procedimientos conductuales:*

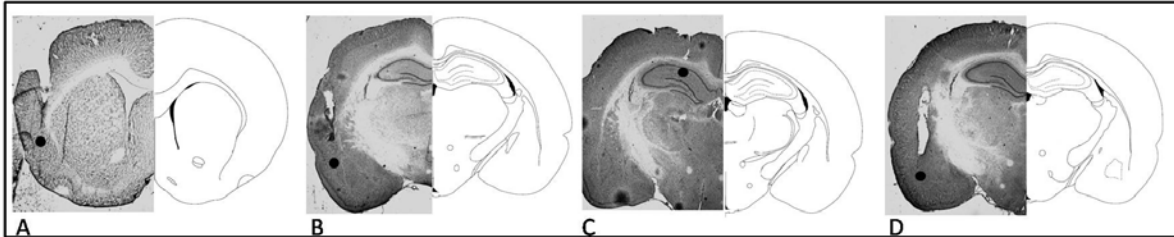
- Condicionamiento de aversión al sabor (CAS). Se utilizó sacarina al 0.1% como sabor novedoso y LiCl (0.15M 10% peso/volumen) como el agente tóxico para causar malestar. El CAS se realizó usando el siguiente protocolo: se dio una línea basal de agua que consistió en consumos de 15min diarios. El condicionamiento se realizó 24 hrs después administrando sacarina a una concentración de 0.1% durante 15 min y 15 min después del consumo se inyectó el LiCl i.p.; el número de días de este procedimiento dependerá del experimento. La prueba se realizó un día después de la inyección intracerebral y consistió en dar sacarina por 15 min.
- Extinción del CAS. Después de dar la línea basal de agua y dos adquisiciones de CAS, sacarina (0.1%)-LiCl (0.15M), se dieron presentaciones de sacarina sin el estímulo incondicionado (LiCl) lo que experimentalmente genera extinción del condicionamiento. El número de presentaciones dependerá del experimento y la prueba se realizará un día después de la inyección intracerebral.

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS

## *Consolidación y reconsolidación de la extinción del CAS*

### *Análisis histológico*



Después de cada experimento se extrajeron los cerebros y se cortaron en rebanadas de 40  $\mu\text{m}$  para realizarles la tinción Nysl. Se observaron los cortes en un microscopio de luz y se eliminaron del experimento las ratas en las que la cánula fue implantada de manera errónea. Después del análisis histológico la  $n$  de cada grupo inyectado en un primer ensayo de extinción fue la siguiente: ABL-V=8, ABL-A=8; ACe-V=9, ACe-A=9; PR-V=7, PR-A=7; HC-V=10, HC-A=10; CI-V=10, CI-A=10. La  $n$  de los grupos inyectados en un tercer ensayo de extinción fueron: ABL-V=9, ABL-A=9; ACe-V=9, ACe-A=9; PR-V=9, PR-A=9; HC-V=12, HC-A=12; CI-V=12, CI-A=13.

### *Inyecciones de anisomicina en ACe y ABL no afectan la extinción del CAS*

Para analizar la participación de la amígdala en la extinción del CAS se realizaron inyecciones del inhibidor de síntesis de proteínas después de la primera o tercera extinción. Una ANOVA de repetidas medidas para los grupos ACe-V y ACe-A inyectados en la primer extinción (Fig. 5-A) mostró que no hubo diferencias entre grupos ( $F_{1,22} = 1.22$ ;  $p = 0.280$ ), hubo diferencias entre días ( $F_{1,3} = 132.809$ ;  $p < 0.01$ ) y no hubo interacción ( $F_{1,66} = 1.15$ ;  $p = 0.3339$ ). Los mismos grupos inyectados en la tercera extinción (Fig. 5-B) mostraron resultados similares; no hubo diferencias entre grupos ( $F_{1,16} = 0.172$ ;  $p = 0.683$ ) ni interacción ( $F_{1,80} = 0.168$ ;  $p = 0.9738$ ) pero sí



hubo diferencias entre días ( $F_{1,5} = 36.970$ ;  $p < 0.01$ ). Un análisis post hoc con prueba de Fisher reveló que no hay diferencias entre grupos en ninguna de las pruebas.

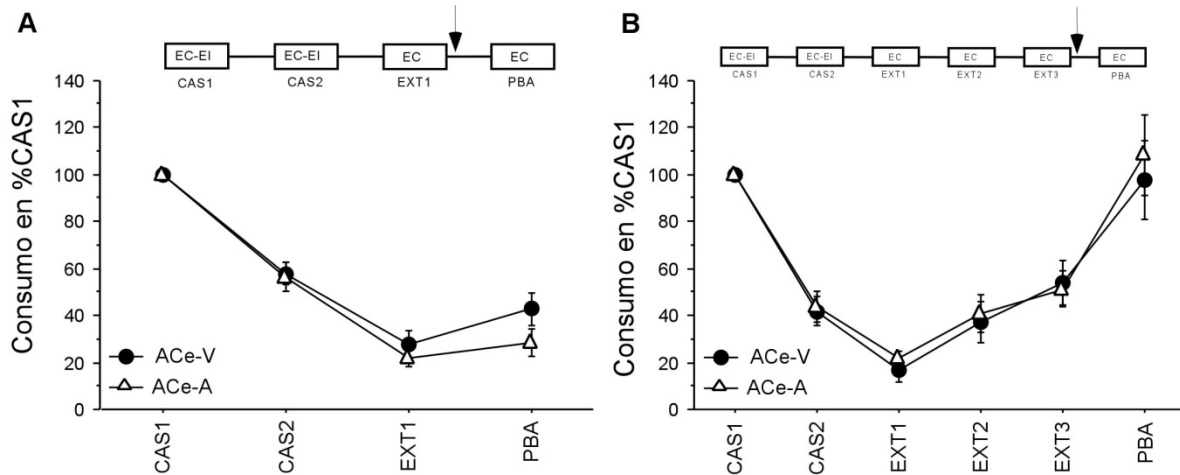


FIGURA 5. Extinción del CAS. La amígdala central no participa en la consolidación del CAS. A, inyecciones de anisomicina en la ACe después de la primera extinción no tiene efecto sobre la memoria. B, de igual forma, la inhibición de la síntesis de proteínas en la ACe después de la tercera presentación de sacarina no afecta la memoria de extinción.

El mismo protocolo se siguió para la ABL y se realizó una ANOVA de repetidas medidas para los grupos ABL-V y ABL-A que fueron inyectados en la primera extinción mostró que no hay diferencias entre grupos ( $F_{1,14} = 0.019$ ;  $p = 0.892$ ), hubo diferencias entre días ( $F_{1,3} = 67.279$ ;  $p < 0.01$ ) y no hubo interacción ( $F_{1,42} = 0.600$ ;  $p = 0.6187$ ). Mientras que la misma prueba, para la inyección realizada en la tercera extinción (Fig.6-B), la prueba reveló que no hubo diferencias entre grupos ( $F_{1,14} = 0.413$ ;  $p = 0.5307$ ), hubo diferencias entre días ( $F_{1,5} = 37.673$ ;  $p < 0.01$ ) y no hubo interacción ( $F_{1,70} = 1.130$ ;  $p = 0.3525$ ). El análisis post hoc con prueba de Fisher reiteró que no hay diferencias entre grupos el día de la prueba para ninguno de los experimentos.

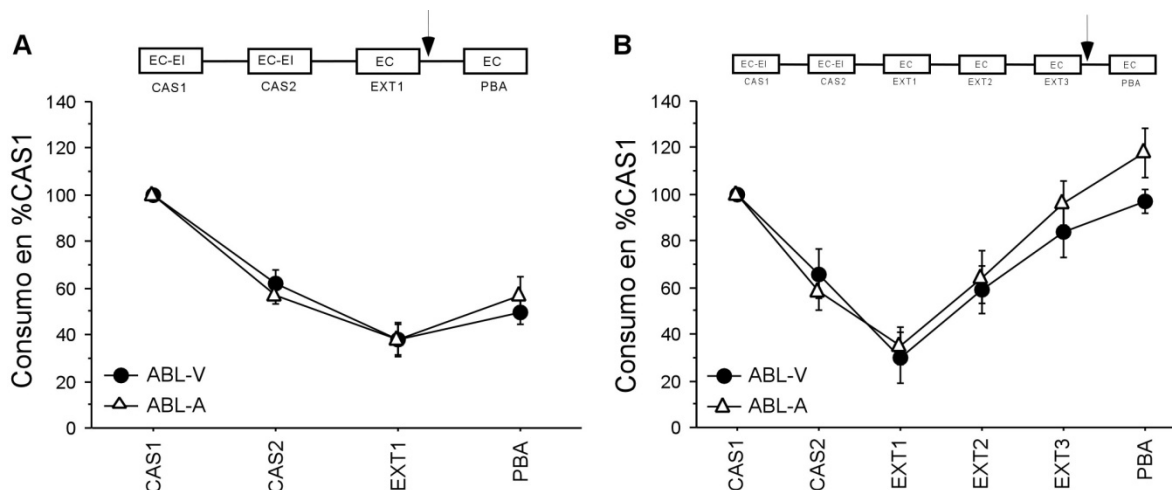


FIGURA 6. Extinción del CAS. La amígdala basolateral no participa en la consolidación del CAS. A, inyecciones de anisomicina en la ABL inmediatamente después de la primer extinción no tienen efecto sobre la memoria como se observa el día de la prueba. B, la inhibición de síntesis de proteínas en una tercera presentación del EC tampoco tiene efecto sobre la memoria.

### *Infusiones de anisomicina en la CI afectan la consolidación y reconsolidación de la extinción del CAS*

La inhibición de la síntesis de proteínas en la CI en la segunda extinción afectó la consolidación de la extinción como se muestra en la figura 7. Una ANOVA de repetidas medidas mostró que no hay diferencias entre grupos ( $F_{1,28} = 2.67$ ;  $p = 0.1132$ ) aunque sí la hay entre días ( $F_{1,3} = 218.99$ ;  $p < 0.01$ ) además de una interacción significativa entre ambos ( $F_{1,84} = 840.81$ ;  $p < 0.05$ ). El análisis post hoc con prueba de Fisher mostró diferencias significativas en los consumos entre CI-V y CI-A el día de prueba ( $p < 0.05$ ) indicando un efecto sobre la consolidación de la extinción. De igual manera la ANOVA de repetidas medidas para los grupos inyectados en la tercera extinción reveló que no hay diferencias entre grupos ( $F_{1,23} = 0.118$ ;  $p = 0.733$ ) pero sí entre los días ( $F_{1,5} = 4.182$ ;  $p < 0.01$ ) e igualmente hay interacción ( $F_{1,115} = 36.822$ ;  $p < 0.05$ ). El análisis post hoc con prueba de Fisher reveló diferencias significativas entre grupos el día de la prueba ( $p < 0.05$ ). Una *t* pareada muestra diferencias entre los consumos del día de la inyección y el día de la prueba para el grupo CI-A inyectado en la tercera extinción ( $p < 0.05$ ). Estos datos sugieren que

además de afectarse la consolidación, se afectó el trazo previo, es decir hubo efecto sobre la reconsolidación de la extinción.

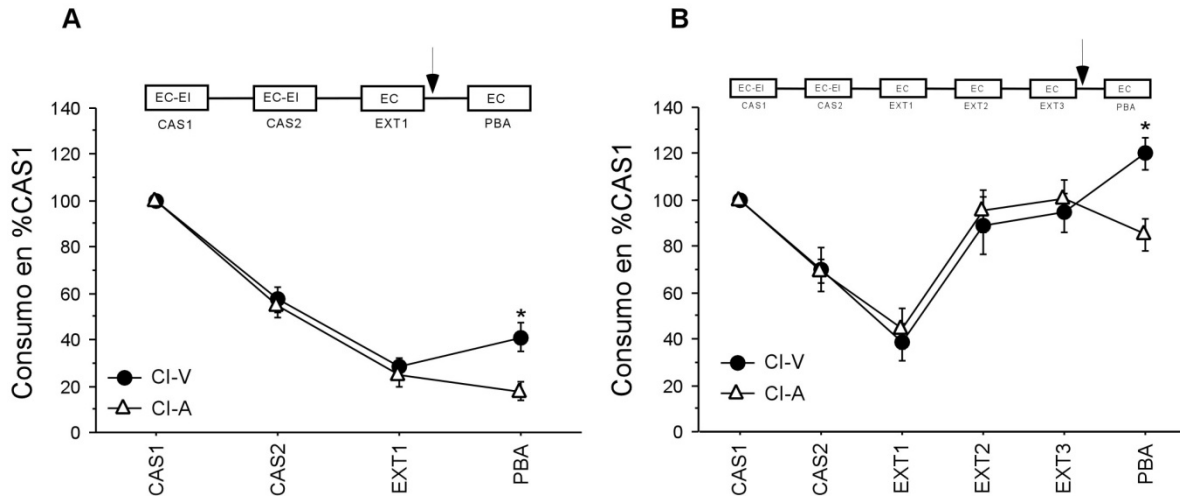


FIGURA 7. Extinción del CAS. La CI participa en la consolidación y reconsolidación de la extinción. A, inyecciones de anisomicina en CI en la primera extinción del CAS afectan su consolidación; B, mientras que la inhibición de la síntesis de proteínas en la CI durante la tercera extinción afectan no sólo la consolidación de esa extinción, sino que afectan parte del trazo previo, sugiriendo que se afecta la reconsolidación de la extinción (\* $p < 0.05$ ).

#### *Infusiones de anisomicina en la corteza PR afectan la consolidación de la extinción del CAS*

Las inyecciones de anisomicina en la corteza PR en la primera extinción mostraron resultados similares a los encontrados en la CI ya que también se afectó la consolidación de la memoria. La ANOVA de repetidas medidas mostró que no hay diferencias entre grupos ( $F_{1,15} = 0.75$ ;  $p = 0.3975$ ) pero sí entre días ( $F_{1,3} = 3.09$ ;  $p < 0.05$ ) y que no hay interacción ( $F_{1,45} = 1.18$ ;  $p = 0.3255$ ). El análisis post hoc con prueba de Fisher mostró diferencias significativas en los consumos entre los grupos PR-V y PR-A el día de prueba ( $p < 0.05$ ) indicando un efecto sobre la consolidación de la extinción.

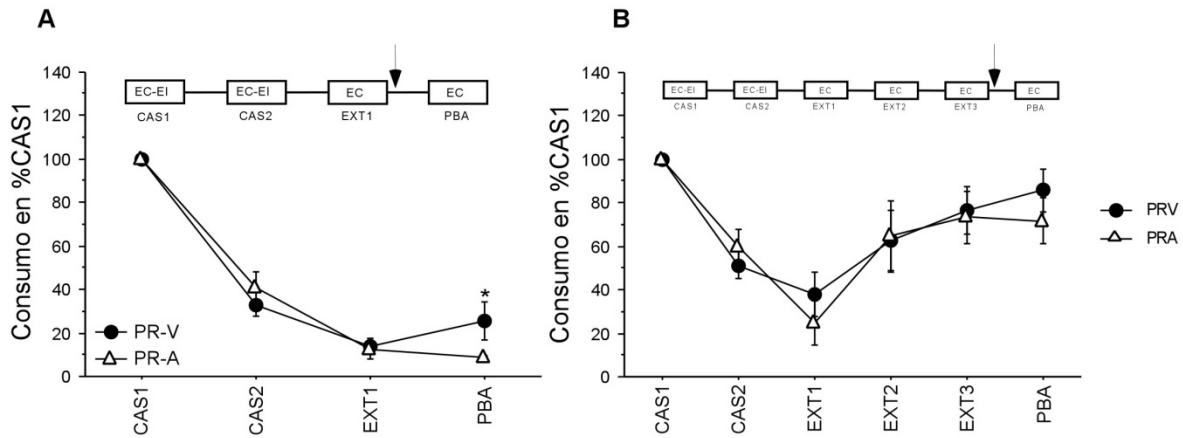


FIGURA 8. Extinción del CAS. La corteza PR participa en la consolidación de la extinción del CAS. Inyecciones de anisomicina en la corteza PR inmediatamente después de la primera extinción afectan la consolidación de la extinción ( $p < 0.05$ ).

### *La síntesis de proteínas en el hipocampo es necesaria para la extinción*

Inyecciones de anisomicina en el HC antes de la primera o tercera extinción del CAS afectan la consolidación del mismo. En los grupos inyectados en la primera extinción una ANOVA de repetidas medidas mostró que no hay diferencias entre grupos ( $F_{1,10} = 0.4151$ ;  $p = 0.4151$ ) pero sí entre días ( $F_{1,3} = 44.769$ ;  $p < 0.001$ ) y hay interacción ( $F_{1,30} = 4.574$ ;  $p < 0.05$ ). El análisis post hoc con prueba de Fisher mostró diferencias significativas en los consumos entre los grupos HC-V e HC-A el día de prueba ( $p < 0.05$ ) indicando un efecto sobre la consolidación de la extinción. Asimismo, una ANOVA de repetidas medidas para los grupos inyectados en la tercera extinción, reveló que no hay diferencias entre grupos ( $F_{1,15} = 0.148$ ;  $p = 0.706$ ) pero sí entre días ( $F_{1,5} = 35.054$ ;  $p < 0.001$ ) y que sí hay interacción ( $F_{1,75} = 3.597$ ;  $p < 0.05$ ). El análisis post hoc con prueba de Fisher mostró diferencias significativas en los consumos entre los grupos HC-V e HC-A el día de prueba ( $p < 0.05$ ) indicando un efecto sobre la consolidación de la extinción.

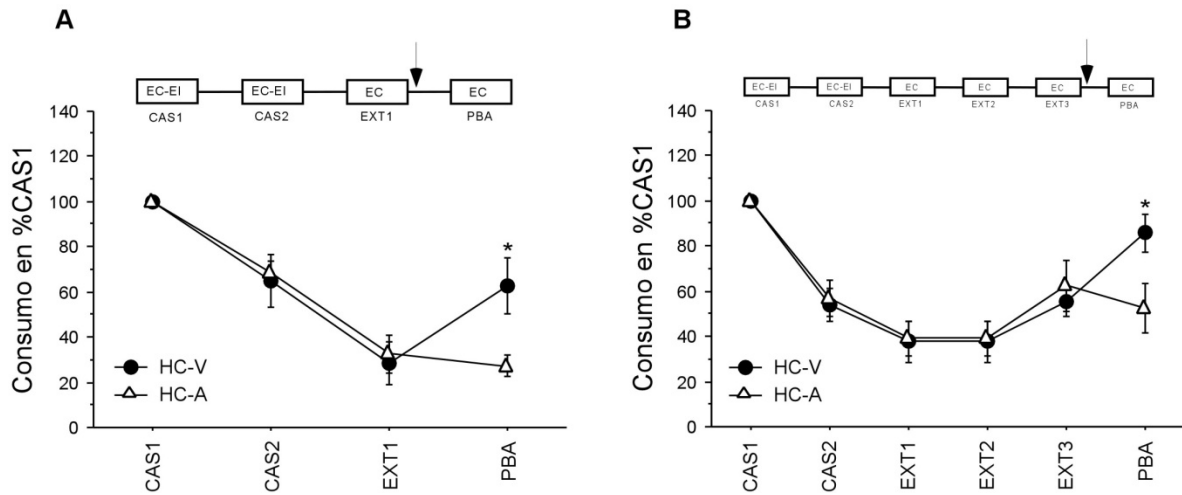


FIGURA 9. Extinción del CAS. El hipocampo participa en la consolidación de la extinción del CAS. Inyecciones de anisomicina en el HC inmediatamente después tanto de la primera (A) como de la tercera extinción (B) afectan la consolidación de la extinción. ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados indican que la CI participa no sólo en la consolidación sino también en la reconsolidación de la extinción del CAS. La PR y el HC están involucrados en la consolidación de la extinción y los núcleos de la amígdala (ACe y ABL) no tienen participación alguna.

# CAPÍTULO V

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La memoria, para su almacenamiento a largo plazo, pasa por un proceso conocido como consolidación, proceso dependiente de la síntesis de nuevas proteínas (McGaugh, 2004). Hasta hace poco se pensaba que un trazo de memoria ya consolidado no era susceptible a cambios, sin embargo en 1968 Misanin y colaboradores describieron un proceso capaz de volver lábil el trazo ya consolidado y lo nombraron reconsolidación. Al respecto se ha propuesto que dicho proceso permite la actualización de la memoria (Sara, 2000; Rodríguez-Ortiz et al. 2005, 2008; Lee et al, 2008). Para dicha actualización se cree que la memoria previamente consolidada es desestabilizada y posteriormente estabilizada para permitir la incorporación de nueva información y su posterior mantenimiento a largo plazo (Lee, 2008).

En la tarea de reconocimiento de sabores, sabemos que la CI (Dunn y Everitt 1988; Rosenblum et al. 1993; Escobar et al. 1998; Yasoshima y Yamamoto 1998) y la amígdala (Yamamoto y Fujimoto 1991; Yamamoto 2007; Bahar et al. 2004) participan en la consolidación y en conjunto en la reconsolidación (García-delaTorre et al. 2009) del condicionamiento de aversión al sabor (CAS). Además, De la Cruz y colaboradores (2008) reportaron que tanto el hipocampo (HC) como la corteza perirrinal (PR) participan en la consolidación de la atenuación de la neofobia, una tarea de reconocimiento de sabores sin asociación aversiva. En este trabajo encontramos que la CI, PR e HC participan en la consolidación de la extinción del CAS por medio de la síntesis de nuevas proteínas. La extinción de esta tarea consiste en re-catalogar un sabor como seguro una vez que ya fue asociado a un estímulo aversivo.

Tanto la atenuación de la neofobia como la extinción del CAS son tareas de reconocimiento de un sabor seguro por lo que resulta lógico que existan similitudes en las estructuras que participan en ambas. Encontramos que la amígdala (ACe y ABL) no participa en la extinción del CAS; sin embargo, la CI, la corteza PR y el HC son esenciales para su consolidación. Además, encontramos que la CI tiene una participación sobre la desestabilización del trazo previo durante la incorporación

de información en la extinción del CAS. Este dato es sorprendente ya que hasta ahora no se ha reportado un proceso de reconsolidación durante la extinción de alguna tarea.

Cuando la reconsolidación de la extinción ocurre, un nuevo trazo tiene la capacidad de desestabilizarse y re-estabilizarse como sea necesario. Estos datos apoyan la idea de que la extinción y la reconsolidación no son procesos que compiten sino que pueden coexistir dependiendo de la experiencia conductual como lo han sugerido Perez-Cuesta y Maldonado (2009). Este grupo investigó si las ventanas temporales de la extinción y la reconsolidación podían ser afectadas en los cangrejos y encontraron que mientras que la asociación EC-EI se extingue, la memoria está en un estado lábil y susceptible de ser reconsolidado. Al respecto, nosotros encontramos que la extinción puede ser reconsolidada confirmado que estos procesos son diferentes y que ambos, la extinción y la reconsolidación son posibles.

Aunque este dato en particular requiere de más análisis, podemos explicarlo al separar a la extinción de la adquisición original. Se sabe que se requiere de la disminución de la calcineurina (CaN) y disminución del factor de transcripción Zif268 en la amígdala para la consolidación del CAS, mientras que la actividad de la CaN no se altera por la extinción de la tarea y la sobreexpresión de Zif268 tampoco afecta este proceso de la memoria (Baumgärtel et al. 2008). Los mecanismos responsables del establecimiento y extinción del CAS son distintos. La extinción entonces se puede explicar no sólo como un reaprendizaje sino que además es molecularmente distinto al aprendizaje original. De acuerdo a estos datos, la extinción podría en sí, sufrir de un proceso de reconsolidación cada vez que exista actualización de la memoria.

Cuando analizamos el papel de la amígdala en la extinción del CAS encontramos que no participa. Se sabe que esta estructura está muy involucrada en la adquisición y retención de memorias de experiencias emocionales (McGaugh, 2004). La participación de la amígdala se ha visto asociada a la consolidación y reconsolidación del CAS (Yamamoto & Fujimoto, 1991; Bahar *et al.*, 2004; Yamamoto, 2007; Garcia-Delatorre *et al.*, 2009) así como a otras tareas aversivas tal como el condicionamiento al miedo o prevención pasiva (Maren & Fanselow, 1996). De acuerdo a nuestros resultados, cuando el componente aversivo de la tarea ya no está presente (extinción), la



amígdala no parece participar. Sin embargo, Bahar y colaboradores (2004) encontraron que la ABL sí participa en la extinción del CAS; esta discrepancia puede deberse a las diferencias entre protocolos. Nosotros inyectamos anisomicina después de la primera o tercera adquisición de la extinción mientras que en su protocolo la inyección se dio antes de la primera extinción. Además, nosotros dimos dos adquisiciones de CAS en lugar de una, creando así una memoria más fuerte. Las infusiones de anisomicina después de la presentación de la sacarina garantizan que afectamos la consolidación y no la adquisición de la extinción.

La participación del HC en una memoria de sabores no es sorprendente ya que se ha relacionado con la modulación contextual y temporal en este tipo de tareas. Gallo y colaboradores encontraron que después del aprendizaje de aversión de un sabor salino en un contexto físico particular o en un tiempo particular del día, la extinción dependía de tanto el lugar como el momento del aprendizaje (Moron et al. 2002). Compararon la habilidad de cambios de lugar y cambios de hora del día para modular de manera separada el fenómeno de la memoria de la aversión a la salina aprendida en ratas. En otro estudio por el mismo grupo (Molero et al. 2005) se encontró que el HC está selectivamente involucrado en claves temporales de la memoria de sabores seguros. Este grupo reportó que lesiones excitotóxicas inducidas en el HC dorsal eliminaban el efecto del cambio de contexto entre pre exposición y condicionamiento. Estos estudios apoyan la idea de que el contexto está íntimamente involucrado en las memorias de sabores y sugiere una participación particular del HC en el reconocimiento de contextos.

De manera similar, Corcoran et al. (2005) describió una relación entre el HC y el contexto en la extinción de una tarea de condicionamiento al miedo por medio de la inactivación de esta estructura. Este grupo encontró que la inactivación del HC durante el entrenamiento de extinción de esta tarea, afecta la codificación contextual de la memoria de extinción. De manera conjunta, estos datos sugieren que el papel del HC en la extinción de memorias aversivas, está relacionada con el contexto.

La CI está involucrada en cada aspecto de la memoria de reconocimiento del sabor, ya sea que el sabor sea catalogado como aversivo (Dunn & Everitt, 1988; Rosenblum et al., 1997; Escobar

et al., 1998; Yasoshima & Yamamoto, 1998) o como seguro (Berman & Dudai, 2001; De la Cruz et al., 2008), así como durante la consolidación o reconsolidación de ambas memorias de sabores. Por otra parte, otras estructuras tienen funciones distintas en la memoria de reconocimiento de sabores; la amígdala parece participar únicamente cuando el sabor está asociado a lo aversivo y el HC o PR cuando otras características relacionadas al sabor están siendo consolidadas. El HC y la PR parecen complementar la función de la CI al procesar componentes relacionados al sabor incluyendo la definición del sabor como seguro o aversivo.

Al respecto, se ha propuesto una teoría de múltiples trazos (Nadel y Moscovitch, 1997; Bontempi et al. 1999) que estipula que la estabilidad de la memoria a largo plazo debe estar sustentada por la proliferación de múltiples trazos de memorias dentro del lóbulo temporal. Nosotros encontramos que la consolidación de la extinción del CAS depende al menos de dos estructuras corticales (CI y PR) así como del HC. El almacenamiento y actualización de la memoria de reconocimiento de sabores requiere de la participación de varias estructuras. Ya sea para una asociación de aversión (García-delaTorre et al., 2009; CI, ACe), para su extinción (CI, PR, HC) o para el reconocimiento de un sabor como seguro (De la Cruz et al., 2009; CI, PR, HC).

Aunque los procesos moleculares estudiados en este trabajo se limitan a la síntesis de nuevas proteínas, trabajos recientes sugieren la participación diferencial de receptores durante los procesos de la memoria, atribuyéndole principalmente a los receptores AMPA (receptores a glutamato) la función de mantener la homeostasis del sistema.

PKM $\zeta$  se ha relacionado con el incremento de los receptores AMPA en la membrana sináptica, su inactivación afecta por completo la memoria ya consolidada sin importar el tiempo que haya transcurrido entre el aprendizaje y la evocación de la misma (revisado por Sacktor, 2011). En estudios preliminares, nosotros hemos encontrado que la infusión de un antagonista de receptores AMPA durante la evocación de la memoria del CAS impide la expresión de la memoria pero no afecta su permanencia a largo plazo.

En conjunto, estos resultados sugieren que la homeostasis del sistema, regulado por el tráfico de receptores AMPA en la membrana sináptica, y los procesos de la memoria están

íntimamente relacionados. Las diferentes estructuras involucradas en la memoria de reconocimiento de sabores podrían tener una participación diferencial en el intercambio de receptores post-sinápticos explicando de manera más detallada el modelo cíclico propuesto por Dudai.

De este trabajo en particular, podemos concluir que el HC, la CI y la PR participan en la consolidación de la extinción del CAS, estructuras que coinciden con la tarea de la atenuación de neofobia, una tarea en la que también se identifica al sabor como seguro. Además, encontramos que la extinción del CAS puede ser reconsolidada por medio de la síntesis de nuevas proteínas en la CI, un resultado que apoya la idea de que la extinción es un proceso independiente con la capacidad de ser desestabilizado para incorporar información novedosa. El estudio de procesos moleculares específicos que subyacen la extinción de la memoria es necesario ya que sin la descripción precisa de proteínas, neurotransmisores, receptores, etc. es imposible tratar de definir la función de cada una de las estructuras involucradas.

## REFERENCIAS

- Accolla R. y Carleton A., (2008) Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex, *PNAS* 105(10); 4010–4015.
- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y. (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci.*, 17(7):1527-30.
- Bahar, A., Dorfman, N. & Dudai, Y. (2004) Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 1115–1118.
- Barondes S. H. y Cohen H. D., 1967, Comparative effects of cycloheximide and puromycin on cerebral protein synthesis and consolidation of memory in mice, *Brain Research*, 4(1):44-51.
- Baumgärtel K, Genoux D, Welzl H, Tweedie-Cullen RY, Koshibu K, Livingstone-Zatchej M, Mamie C, Mansuy IM. (2008) Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nat Neurosci.*, 11(5):572-8.
- Berman, D.E. & Dudai, Y. (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291, 2417–2419.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 209–217.
- Bermúdez Rattoni, F. y Prado-Alcalá R. (2001) Memoria: Dónde reside y Cómo se forma. 1st edition, Mexico DF, Trillas.
- Bontempi B., Laurent-Demir C., Destrade C. y Jaffard R., Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage, *Nature*, 400(6745):671-675.
- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998) Conditioned taste aversion: memory of a special kind. Oxford University Press, New York.
- Corcoran, K.A., Desmond, T.J., Frey, K.A. & Maren, S. (2005) Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J. Neurosci.*, 25, 8978–8987.
- Davis, H.P. & Squire, L.R. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.*, 96, 518–559.
- De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C.J., Balderas, I. & Bermudez-Rattoni, F. (2008) Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur. J. Neurosci.*, 28, 1377–1381.

- Dudai Y. (1996) Consolidation: fragility on the road to the engram, *Neuron*, 17(3):367-70.
- Dudai Y. (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol.* 12(2):211-6.
- Dudai Y. y Eisenberg M. (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis, *Neuron*, 44(1):93-100.
- Dudai Y. (2006) Reconsolidation: the advantage of being refocused, *Current Opinion in Neurobiology*, 16(2):174-8.
- Dudai Y. (2009) Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 364(1521):1255-62.
- Duncan C.P. (1949) The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol.*, 42(1):32-44.
- Dunn, L.T. & Everitt, B.J. (1988) Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav. Neurosci.*, 102, 3–23.
- Escobar, M.L., Chao, V. & Bermudez-Rattoni, F. (1998) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.*, 779, 314–319.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.*, 852(1):208-12.
- Ferreira G, Miranda MI, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F. (2005) Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci.*, 22(10):2596-604.
- Flexner LB, Flexner JB, De La Haba G, Roberts RB., 1965, Loss of memory as related to inhibition of cerebral protein synthesis, *Journal of Neurochemistry*, 12(7):535-41.
- Garcia-Delatorre, P., Rodriguez-Ortiz, C.J., Arreguin-Martinez, J.L., Cruz-Castaneda, P. & Bermudez-Rattoni, F. (2009) Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn. Mem.*, 16, 514–519.
- Gutiérrez H, Gutiérrez R, Silva-Gandarias R, Estrada J, Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. (1999) Differential effects of 192IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation. *Brain Res.*, 834(1-2):136-41.

- Höistad M, Barbas H. (2008) Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. *Neuroimage.*, 40(3):1016-33
- Kandel E., Schwartz J. y Jessel T. (2000) Principles of Neural Science, 4<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, New York.
- Koh MT, Bernstein IL. (2003) Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport.*, 14(3):405-7.
- Lee J. L., Everitt B. J. y Thomas K. L., 2004, Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation, *Science*, 304(5672):839-43.
- Lee S. H., Choi J. H., Lee N., Lee H. R., Kim J. I., Yu N. K., , Choi S. L., Lee S. H., Kim H. y Kaang B. K., 2008, Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory, *Science*, 319:1253–6.
- Lee, J.L. (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.*, 11, 1264–1266.
- Maren, S. & Fanselow, M.S. (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*, 16, 237–240.
- Marsicano G., Wotjak C. T., Azad S. C., Bisogno T., Rammes G., Cascio M. G., Hermann H., Tang J., Hofmann C., Zieglgänsberger W., Di Marzo V. y Lutz B. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories, *Nature* 418:530 –534.
- McGaugh, J.L. (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153, 1351–1358.
- McGaugh J. L. (2000) Memory--a century of consolidation, *Science*, 287(5451):248-51.
- McGaugh, J.L. (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 1–28.
- Misanin, J.R., Miller, R.R. & Lewis, D.J. (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, 160, 554–555.
- Moguel-González M, Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. (2008) BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem.*, 584-7.
- Molero, A., Moron, I., Ballesteros, M.A., Manrique, T., Fenton, A. & Gallo, M. (2005) Hippocampus, temporal context and taste memories. *Chem. Senses*, 30 (Suppl 1), i160–i161.
- Moron, I., Manrique, T., Molero, A., Ballesteros, M.A., Gallo, M. & Fenton, A. (2002) The contextual modulation of conditioned taste aversions by the physical environment and time of day is similar. *Learn. Mem.*, 9, 218–223.

- Myers, K.M. & Davis, M. (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36, 567–584.
- Nadel, L. & Moscovitch, M. (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7, 217–227.
- Nader, K., Schafe, G.E. & Le Doux, J.E. (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722–726.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4<sup>th</sup> Edn., Academic Press, San Diego.
- Perez-Cuesta, L.M. & Maldonado, H. (2009) Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn. Mem.*, 16, 714–721.
- Quirk G. J. y Mueller D., 2008, Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval, *Neuropsychopharmacology* 33(1): 56–72.
- Rodriguez-Ortiz C. J., Garcia-DeLaTorre P., Benavidez E., Ballesteros M. A. y Bermudez-Rattoni F., (2008) Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated, *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3):352-9
- Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutierrez, R. & Bermudez-Rattoni, F. (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn. Mem.*, 12, 533–537.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol.* 59(1):49-56.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, S., Lamprecht, R. & Dudai, Y. (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J. Neurosci.*, 17, 5129–5135.
- Sara, S.J. (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.*, 7, 73–84.
- Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*, 317(5840):951-3.
- Sacktor TC. (2011) How does PKM $\zeta$  maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci.*, 12(1):9-15.
- Squire L.R. y Kandel E.R. (2009) *Memory from mind to molecules*. 2<sup>nd</sup> edition, Roberts and Company Publishers, Singapore.
- Squire LR, Zola-Morgan S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253(5026):1380-6

Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J. & Kida, S. (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.*, 24, 4787–4795.

Winters B. D., Tucci M. C. y DaCosta-Furtado M., 2009, Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information, *Learning and Memory* 16: 545-553.

Yamamoto, T. & Fujimoto, Y. (1991) Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res. Bull.*, 27, 403–406.

Yamamoto, T. (2007) Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem. Senses*, 32, 105–109.

Yang C. H., Huang C. C. y Hsu K. S. (2011) Generalization of Fear Inhibition by Disrupting Hippocampal Protein Synthesis-Dependent Reconsolidation Process, *Neuropsychopharmacology*, 36(10):1992-2008.

Yasoshima, Y. & Yamamoto, T. (1998) Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neuroscience*, 84, 1–5.



# ANEXOS



## Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated

Paola García-DeLaTorre, Carlos J. Rodríguez-Ortiz, Jose L. Arreguin-Martinez, et al.

*Learn. Mem.* 2009 16: 514-519

Access the most recent version at doi:[10.1101/lm.1356509](https://doi.org/10.1101/lm.1356509)

---

**Supplemental Material** <http://learnmem.cshlp.org/content/suppl/2009/09/04/16.9.514.DC1.html>

**References** This article cites 42 articles, 16 of which can be accessed free at:  
<http://learnmem.cshlp.org/content/16/9/514.full.html#ref-list-1>

**Email alerting service** Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

---

---

To subscribe to *Learning & Memory* go to:  
<http://learnmem.cshlp.org/subscriptions>

---

## Research

# Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated

Paola García-DeLaTorre, Carlos J. Rodríguez-Ortiz, Jose L. Arreguin-Martinez, Paulina Cruz-Castañeda, and Federico Bermúdez-Rattoni<sup>1</sup>

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal 04510, México*

Reconsolidation has been described as a process where a consolidated memory returns to a labile state when retrieved. Growing evidence suggests that reconsolidation is, in fact, a destabilization/stabilization process that incorporates updated information to a previously consolidated memory. We used the conditioned taste aversion (CTA) task in order to test this theory. On the first trial, the conditioned stimulus (CS) (saccharin) was associated to the unconditioned stimulus (US) (LiCl injection), and as a result, aversion to saccharin was obtained. The following day, animals were injected with anisomycin in either the insular cortex (IC), central amygdala (CeA), basolateral amygdala (BLA), or simultaneously in IC and CeA or IC and BLA, and a second CTA trial was carried out in which updated information was acquired. Animals were tested 24 h later. When protein synthesis was inhibited in either the IC or CeA, consolidation was affected and previously consolidated memory was unimpaired. However, when both the IC and CeA were simultaneously anisomycin injected, the previously consolidated memory was affected. After repeated association trials, protein synthesis inhibition in the IC and CeA did not have an effect on taste memory. These results suggest that the IC and the CeA are necessary for taste-aversion consolidation, and that both share the previously consolidated memory trace. In addition, our data demonstrated that protein synthesis in either the IC or the CeA suffices to stabilize previously consolidated taste memory when destabilized by incorporation of updated information.

[Supplemental material is available online at <http://www.learnmem.org>.]

The consolidation theory proposes that through new protein synthesis recently acquired memories are strengthened over time into a stable long-term memory trace (McGaugh 1966, 2000; Davis and Squire 1984). Nevertheless, it had been implied that after consolidation, amnesic agents could no longer affect memory. However, it is now known that when reactivated, consolidated memory regains sensitivity to these agents and requires of protein synthesis once again to be retained in long-term storage (Sara 2000; Suzuki et al. 2004). This process is known as reconsolidation (Nader et al. 2000) and has been studied in various memory tasks and brain structures (for review, see Dudai and Eisenberg 2004). The term reconsolidation has been challenged and seems inadequate, since recent evidence indicates that this process is not a faithful recapitulation of consolidation (Dudai 2006). On this matter, it has been demonstrated that consolidation and reconsolidation share some molecular mechanisms but differ in many others (for review, see Dudai and Eisenberg 2004). For example, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) in the hippocampus is required for consolidation of contextual fear conditioning, but not for reconsolidation (Lee et al. 2004). On the other hand, PKA in the basolateral amygdala (BLA) is required for both mechanisms in a conditioned taste aversion (CTA) task (Koh and Bernstein 2003).

Furthermore, we have proposed that reconsolidation is a process that incorporates relevant information to a previously consolidated memory trace (Sara 2000; Rodríguez-Ortiz et al. 2005,

2008). When memory updating occurs, previously stored memory is destabilized (Lee 2008) and can therefore be affected by protein synthesis blockers. Thus, when behavior has reached an asymptotic level and no further learning is evident, previously consolidated memory remains stable and is resistant to amnesic treatments (Rodríguez-Ortiz et al. 2005).

CTA is a convenient task to investigate reconsolidation mechanisms in an aversive motivated learning protocol. In this paradigm, rats are presented with a taste (saccharin), which acts as the conditioned stimulus (CS). Then, gastric malaise is induced with a lithium chloride injection acting as the unconditioned stimulus (US). The outcome is a decreased consumption of saccharin on the test day as a result of the CS-US association. The task can be acquired in a single trial, and the resulting aversive memory can be tested several days later. Several reports indicate that CTA is subserved by the insular cortex (IC) (Dunn and Everitt 1988; Rosenblum et al. 1993; Escobar et al. 1998; Yasoshima and Yamamoto 1998) and the amygdala (Yamamoto and Fujimoto 1991; Bahar et al. 2004; Yamamoto 2007).

It has been postulated that memories depend on a neural representation of the taste that probably remains stored in several brain regions in parallel; this neural representation has been called the taste memory trace (Bures et al. 1998). In this regard, we have previously demonstrated that for taste aversion memory trace formation the cholinergic activity in both the IC and amygdala is necessary. Thus, N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced lesions into the nucleus basalis magnocellularis have a significant disruption in the acquisition of taste aversion, causing a considerable cholinergic activity reduction in both the amygdala and the IC

<sup>1</sup>Corresponding author.

E-mail [fbermude@ifc.unam.mx](mailto:fbermude@ifc.unam.mx); fax (525) 622-5607.

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.1356509>.

(Gutiérrez et al. 1999). Interconnection between the amygdala and the IC have been described using retrograde and bidirectional tracers. It was found that the agranular and dysgranular parts of the insula have prominent connections with the amygdala, which could be mediating aversively motivated behaviors (Höistad and Barbas 2008). In this regard, Escobar and Bermúdez-Rattoni (2000) reported that tetanic stimulation of the BLA induces long-term potentiation (LTP) in the IC, which enhances the retention of CTA. Similarly, it has been demonstrated that intra-amygdala applications of glutamate enhances taste aversion memory, and this effect is blocked by infusions of an NMDA antagonist in the IC (Miranda et al. 2002; Ferreira et al. 2005). Protein synthesis has been found to be a necessary process in the IC and amygdala in order for CTA memory consolidation to occur. Bahar et al. (2003, 2004) found that protein synthesis inhibition in the CeA, but not in the BLA, disrupted CTA consolidation, but infusions in either of these nuclei of the amygdala did not affect CTA memory reconsolidation. All of these results suggest that for the formation and consolidation of aversive taste memory a dynamic interaction between the amygdala and the IC is required.

Therefore, the following experiments were designed to reveal the contribution of the IC and the amygdala in consolidation and reconsolidation of CTA. We used a repeated trials protocol that allows incoming information to be incorporated in each acquisition trial (Duvarci and Nader 2004). In all experiments, protein synthesis inhibition was obtained by microinfusions of anisomycin in the IC, BLA, or CeA, as well as simultaneous injections in the IC and CeA or IC and BLA.

## Results

### Histological analysis

After histological analysis, the following *n* for each group resulted from the correct implants: IC-V, *n* = 30, IC-A, *n* = 32; CeA-V, *n* = 26, CeA-A, *n* = 27; BLA-V, *n* = 12, BLA-A, *n* = 12 (see Fig. 2, below); IC+CeA-V, *n* = 22, IC+CeA-A, *n* = 21; IC+BLA-V, *n* = 19, IC+BLA-A, *n* = 27 (see Fig. 3, below); and IC+CeA-V, *n* = 18, IC+CeA-A, *n* = 15 (see Fig. 4, below). Figure 1 shows a scheme of the cannula implants for the mentioned groups.

### Anisomycin infusions in the IC or CeA but not in the BLA, impair CTA consolidation

To determine whether the IC, CeA, or BLA participate in stabilization of CTA memory under updating conditions, we used the protein synthesis inhibitor anisomycin as the consolidation

blocker. The drug was infused 1 h before the second CTA acquisition. A control group was infused with ACSF for each structure tested. An ANOVA having repeated measures analysis showed differences among groups ( $F_{(5,133)} = 3.70$ ;  $P < 0.05$ ), and days ( $F_{(5,10)} = 372.92$ ;  $P < 0.01$ ), and a significant day per group interaction ( $F_{(5,266)} = 5.82$ ;  $P < 0.01$ ).

When protein synthesis was quenched in the IC, consolidation of CTA was impaired (Fig. 2). A post-hoc analysis showed intake differences between IC-V and IC-A groups ( $P < 0.05$ ). Furthermore, a paired *t*-test revealed an expected reduction in consumption between injection and test days ( $t_{(29)} = 3.71$ ,  $P < 0.05$ ) in IC-V rats, while no intake differences were found in the IC-A group ( $t_{(31)} = 1.59$ ,  $P = 0.1213$ ), reflecting memory consolidation impairment.

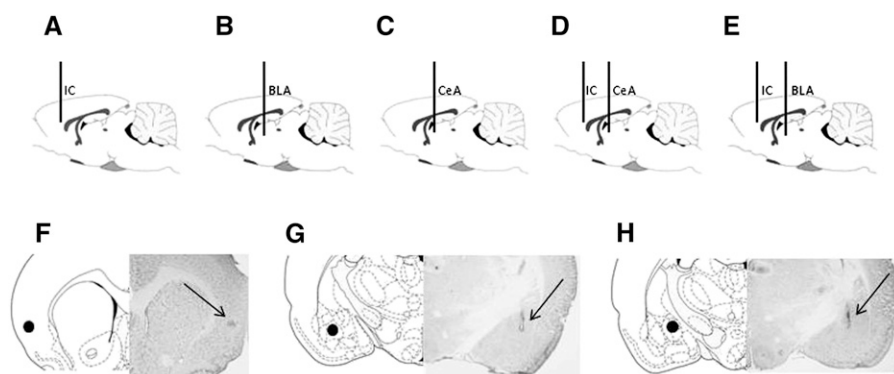
Similarly, when anisomycin was applied into the CeA, memory consolidation was impaired (Fig. 2). Significant differences were found in the test day between CeA-V and CeA-A animals as shown by a post-hoc analysis ( $P < 0.05$ ). Similar to the results obtained for the IC, a paired *t*-test for injection and test days revealed no differences for the CeA-A group ( $t_{(26)} = -0.12$ , NS), and a significant lower intake for the CeA-V group on test day ( $t_{(25)} = 7.42$ ,  $P < 0.01$ ).

Finally, when anisomycin was administered in the BLA, there was no impairment of long-term memory (Fig. 2). Control and anisomycin-infused animals showed strong taste aversion; a post-hoc analysis test showed no significant differences on test day (NS). Consistently, a paired *t*-test for injection and test days revealed that BLA-V and BLA-A groups had a significant intake reduction ( $t_{(11)} = 5.04$ ,  $P < 0.05$ ;  $t_{(11)} = 6.92$ ,  $P < 0.01$ , respectively).

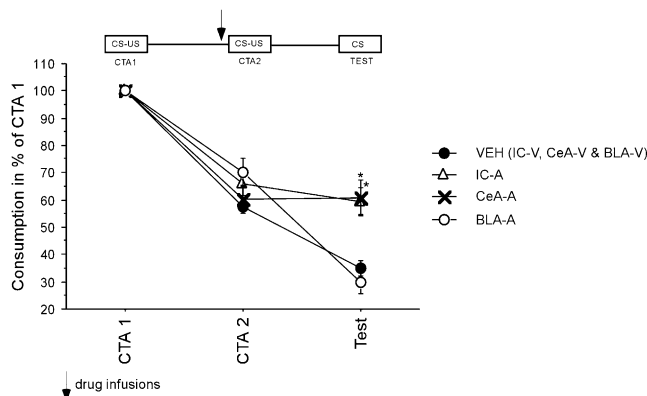
Data obtained with protein synthesis inhibition in each region is shown in Figure 2. These results point to the fact that protein synthesis is required in either IC or CeA in order to consolidate information learned on a second taste aversion trial. However, protein synthesis in the BLA seems unnecessary to store CTA memory in the long term.

### Concurrent anisomycin infusions in the IC and CeA impair previously consolidated memory

We observed consolidation impairment when protein synthesis was inhibited in the IC or CeA, but we did not reveal an effect on previously consolidated memory under conditions where memory was updated. Therefore, in an attempt to reveal reconsolidation of CTA when learning is attained, we bilaterally microinfused anisomycin in the IC together with bilateral injections in the CeA or BLA (Fig. 3). An ANOVA with repeated measures showed differences among groups ( $F_{(3,85)} = 9.52$ ;  $P < 0.01$ ), days ( $F_{(3,6)} = 177.09$ ;  $P < 0.01$ ), and a significant day group interaction ( $F_{(3,170)} = 11.97$ ;  $P < 0.01$ ). The post-hoc analysis with Fisher's test revealed that consumptions of IC+CeA-A on test day were significantly higher when compared with IC+CeA-V ( $P < 0.01$ ) and IC+BLA-A ( $P = 0.0168$ ). The IC+BLA-A group itself showed a significant consumption increase when compared with IC+BLA-V ( $P < 0.01$ ) as seen in Figure 3. A paired *t*-test revealed an increase in consumption between the second acquisition and test days for the IC+CeA-A group ( $t_{(20)} = -2.187$ ,  $P < 0.05$ ) suggesting that the previously consolidated memory trace (CTA1) was affected. However, no difference in consumption was observed for the IC+BLA-A group ( $t_{(26)} = 0.0003$ ,  $P = 0.999$ ), which did not consolidate the second trial. A significant



**Figure 1.** Histology. Schematic drawings show the cannulae position for each group; the dots indicate the aimed at structure: insular cortex (IC) (A), basolateral amygdala (BLA) (B), central amygdala (CeA) (C), IC and CeA (D), and IC and BLA (E). Representative photomicrographs show the location of injection injector tips in the corresponding structures: IC (F), BLA (G), and CeA (H).



**Figure 2.** Protein synthesis inhibition on single structures. The top of the figure has a schematic representation of the protocol used in these experiments. Intracerebral injections were given 1 h before the second acquisition of CTA, a test was performed 24 h after. Each acquisition consisted of a CS (saccharin)–US (LiCl) association. When injected in either the IC (triangles) or CeA (crosses), anisomycin impaired consolidation of CTA. Anisomycin injections in the BLA (white circles) did not affect aversive memory. VEH (black circles) group represents injections of vehicle solution (ACSF) in either of the studied structures. (\*)  $P < 0.05$ .

decrease in consumption was observed in the IC+CeA-V and IC+BLA-V groups ( $t_{(21)} = 7.26$ ,  $P < 0.01$ ;  $t_{(18)} = 7.22$ ,  $P < 0.01$ , respectively), indicating that the second trial was acquired.

### Anisomycin injections in both the IC and CeA in a behavioral asymptote do not affect memory

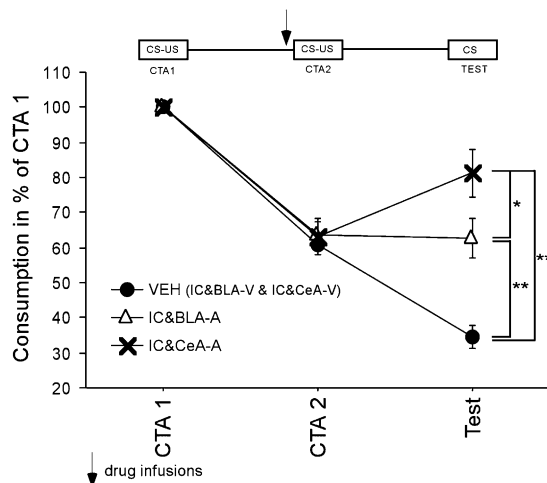
In order to demonstrate that protein synthesis inhibition in the IC and CeA can only impair memory when new information is acquired, we infused anisomycin before the fifth CTA acquisition, when aversive behavior has reached an asymptotic level. Thus, as shown in Figure 4, inhibition of protein synthesis at this point did not affect taste memory at all. A repeated-measures ANOVA showed no differences between groups ( $F_{(1,30)} = 0.11$ ;  $P = 0.7389$ ), although there were differences among days ( $F_{(1,5)} = 733.25$ ;  $P < 0.01$ ), but no interaction ( $F_{(1,150)} = 0.69$ ;  $P = 0.6252$ ). Post-hoc analysis with Fisher's test revealed that consumptions on the fifth acquisition and test days were similar and revealed no significant differences between groups. The body weight for all animals across the experimental days increased, since at the beginning the mean for all animals was 300.8 g, and at the end the mean was 351.3 g.

## Discussion

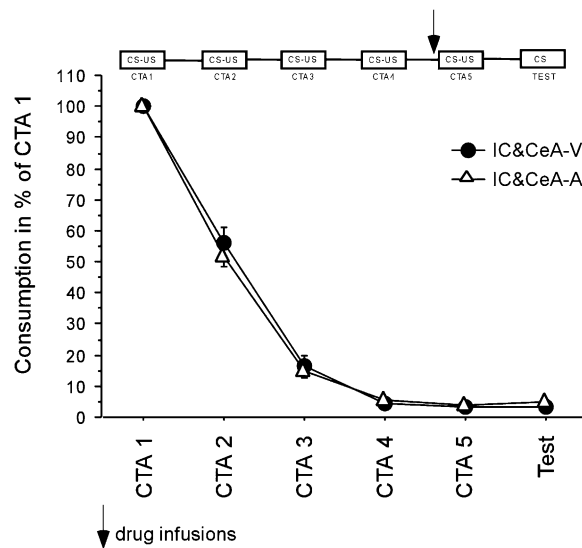
Protein synthesis inhibitors are known to block memory consolidation in a variety of memory paradigms (Dudai 2002). Furthermore, it has been suggested that protein synthesis occurs more than once for long-term memory maintenance; this process when dependent on reactivation, has been referred to as reconsolidation (Nader et al. 2000; Dudai 2004; Tronson and Taylor 2007). As mentioned, reconsolidation is not a faithful recapitulation of consolidation, and it has been demonstrated that this process incorporates new information to a previously consolidated trace (Rodríguez-Ortiz et al. 2005, 2008; Eschenko et al. 2006; Morris et al. 2006; Hupbach et al. 2007; Rossato et al. 2007; Lee 2008). The present study describes memory reconsolidation as part of the updating process of CTA memory. In this regard, it has recently been reported that previously consolidated memory undergoes a temporal destabilization that allows new incoming information to be integrated to the memory through a protein degradation and protein synthesis-dependent process (Lee 2008).

We have proposed that when new information is capable of strengthening or altering previously consolidated memory, a protein synthesis-dependent process is initiated to allow incoming material to be integrated to a previous memory trace (Rodríguez-Ortiz et al. 2005, 2008). For incorporation of information, previously consolidated memory is destabilized, making memory temporarily susceptible to disruption by amnesic treatments. On the other hand, when no new information is presented, memory cannot be disrupted. Accordingly, in the present study, after repeated association trials, protein synthesis inhibition in the IC and CeA did not have an effect on taste memory. Nevertheless, it should be pointed out that with overtrained memories it can be more difficult to trigger reconsolidation (Nader and Hardt 2009). For example, in contextual fear conditioning, strong memories require a longer reactivation in order for reconsolidation to be triggered (Suzuki et al. 2004). Accordingly, it cannot be stated that overtrained memories are a true boundary condition for reconsolidation induction. Thus, further experiments are needed to determine whether an asymptotic level of behavior in CTA does prevent reconsolidation or not.

Previous reports have shown that anisomycin infusions into the IC or CeA disrupt memory consolidation of CTA (Rosenblum et al. 1993; Bahar et al. 2003). However, independent anisomycin injections in the CeA or BLA do not impair reconsolidation of CTA (Bahar et al. 2004), although systemic anisomycin injections do (Gruest et al. 2004). This latter result could be explained by the fact that both structures, the IC and CeA, have to be protein synthesis inhibited at the same time to impair stabilization of the previously consolidated trace when reactivated. Our results could explain why systemic injections disrupt CTA reconsolidation and not independent infusions in either nucleus of the amygdala. However, it has been suggested that anisomycin when applied into the IC can affect CTA memory reconsolidation (Eisenberg et al. 2003; Rodríguez-Ortiz et al. 2005). In the latter study, anisomycin was injected in the IC when saccharin was associated to aversion after several presentations of the same taste without noxious



**Figure 3.** Protein synthesis inhibition in two structures at the same time. On top of the figure is a representation of the protocol used in these experiments. Intracerebral infusions were performed 1 h before the second CTA acquisition. The test consisted of saccharin presentation 24 h after injections. CS (saccharin)–US (LiCl) association was given in each acquisition. Anisomycin injections in the IC and CeA (crosses) disrupted the previously consolidated trace. When anisomycin was infused in the IC and BLA (triangles) only incoming aversion was affected. VEH group stands for injections of vehicle solution (ACSF) at the same time in the IC and one of the nuclei of the amygdala. (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*)  $P < 0.05$ .



**Figure 4.** Protein synthesis inhibition in IC and CeA on behavioral asymptote. A schematic representation of the protocol used in this experiment is presented on top of the figure. Anisomycin (IC+CeA-A) or ACSF solution (IC+CeA-V) was injected 1 h before the fifth acquisition and a test was performed 24 h later. CS (saccharin)–US (LiCl) association was given on every acquisition day. When anisomycin was infused after behavior had reached a plateau, memory was not affected. No differences were observed between vehicle (black circles) and anisomycin-treated (triangles) animals.

consequences. Under that protocol, competition for the control of behavior was established between safe and aversive taste memory traces. In the test, rats drank significantly more saccharin solution compared with the previous presentation reflecting disruption of aversive taste memory. However, it is not clear whether the observed increment in consumption was due to impairment of reconsolidation or to disruption of incoming aversive memory that allowed overcoming expression of the dominant memory trace, i.e., safe saccharin. Similarly, Eisenberg et al. (2003) trained rats to choose between water and an aversive taste. After aversive memory reactivation the authors infused anisomycin in the IC and on test animals displayed disruption of the aversive trace by drinking more of the familiar water. However, in that study it is not possible to differentiate between effects on reconsolidation or overexpression of the dominant behavior (water preference).

In the present study, we confirmed that protein synthesis in the IC and CeA are indispensable to consolidate taste aversion memory, revealing that both structures participate in the formation of the aversive taste memory trace. Moreover, protein synthesis blockade in the CeA, BLA, or IC, independently, did not disrupt reconsolidation. The remarkable point from our results is that when both the IC and CeA were infused with anisomycin at the same time, on behavioral updating conditions, the previously consolidated trace was partially disrupted. These results suggest that taste aversion memory is simultaneously stored in the IC and CeA, and that protein synthesis in one of these structures is enough to maintain the previously consolidated memory over time when destabilized by incorporation of updated information.

It is not new that several structures participate in taste memory consolidation. Concordantly, in our laboratory we have demonstrated behavioral enhancement of taste aversion by cortical LTP induction (high-frequency stimulation in the amygdala) or pharmacological (intra-amygdala applications of glutamate) stimulation of the amygdala. The observed facilitation of CTA induced by amygdala electrical or chemical stimulation was reversed by cortical infusions of NMDA receptor antagonist (Escobar et al.

2002; Miranda et al. 2002; Ferreira et al. 2005). Furthermore, it has been demonstrated that simultaneous electrical recordings of the amygdala and IC during CTA encoding show significant enhancement of functional connectivity between these two structures (Grossman et al. 2008). Accordingly, the present results suggest that both the amygdala and IC are important to consolidate and maintain the aversive taste memory trace for a long term when updated. Thus, it seems that a putative dialog between the amygdala and the IC is involved in CTA memory formation and updating. Similarly, it has been shown that contextual fear conditioning reconsolidation depends on more than one structure, i.e., the hippocampus and BLA (Huff and Rudy 2004). Thus, protein synthesis inhibition in only one of these structures is enough to damage reconsolidation, whereas for CTA, both the CeA and the IC are required. In this regard, a multiple-trace theory has been proposed (Nadel and Moscovitch 1997; Bontempi et al. 1999), which states the creation of multiple traces from a single memory that are interacting between structures. Our results suggest that a multiple-trace consolidation of CTA in the IC and CeA could be taking place. This theory could explain why protein synthesis in both structures is required when memory is reactivated.

Numerous reports aimed to study consolidation or reconsolidation have used anisomycin as the protein synthesis inhibitor. In this regard, Gold (2007) has recently proposed that memory impairments observed when anisomycin is infused are not directly related to inhibition of protein synthesis, but rather to increments in neurotransmitters release. Although we cannot discard the fact that these alterations in neurotransmitters release did occur under our protocols and that they provide some contribution to our observed effects on memory, this possibility seems unlikely since we failed to see any effects on taste retention on the days of injection in anisomycin-infused animals. In addition, it could be argued that the observed disruption in consolidated memory by simultaneous anisomycin infusions in the IC and CeA was due to the larger volume of drug injected; however, similar injections in the IC and BLA did not produce the same effect; hence, this possibility seems unlikely.

In conclusion, we found that two important structures for CTA, the IC and CeA, are required to form the aversive memory trace. Both structures participate in CTA consolidation, and protein synthesis in only one of these regions is sufficient to stabilize previously consolidated CTA memory in the long term when relevant information is acquired. These results support our hypothesis that previously consolidated memory is destabilized to update memory, and only when new information is acquired can previously consolidated memory be altered.

## Materials and Methods

### Subjects

Male Wistar rats weighing 250–280 g, from the Instituto de Fisiología Celular breeding colony, were caged individually at  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  in a 12-h light/12-h dark cycle. Food was available ad libitum.

### Drugs

The protein synthesis inhibitor anisomycin was obtained from Sigma-Aldrich. The drug was dissolved in artificial cerebral spinal fluid (ACSF: NaCl 125 mM, KCl 5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.25 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  26 mM, glucose 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM) and adjusted to pH 7. Final anisomycin concentration was 120 mg/mL.

### Behavioral procedures

Saccharin (0.1% w/v) was used as the CS and i.p. injection of LiCl (0.15 M, 1% body weight) as the US. Rats were trained over 3 d to

get their daily water ration from a pipette within 15 min at a specific day time. On days 4 and 5, rats were presented with saccharin instead of water for 15 min. Fifteen minutes later they were injected i.p. with LiCl solution. Water was again presented for 15 min 4.5 h after the injection to prevent rats from dehydration. Saccharin was presented again on day 6 as a memory test. Anisomycin or ACSF (as control solution) was microinfused into the IC, BLA, CeA, IC and BLA, or IC and CeA, as indicated in the Results section, 60 min before the second acquisition (on the fifth day).

In addition, to test anisomycin effects on behavioral asymptotic levels, acquisition trials were repeated until day 8 (five CTA trials, one per day), the rest of the experimental protocol remained similar to the above. Anisomycin or ACSF was injected in both the IC and CeA 60 min before the fifth acquisition. Saccharin was presented 24 h after the last acquisition as a test trial. Because of the number of aversive association trials carried out in this protocol, all animals were monitored during the behavioral experiment.

### Surgery and microinfusions

Rats were anesthetized with ketamine-xylazine (76–78 mg/kg), positioned in a stereotaxic apparatus, and implanted bilaterally with stainless-steel guide cannulae (30 gauge) aimed 2 mm above the CeA, BLA, and/or IC. CeA: AP –2.2 mm, L ± 4 mm, DV –5.8 mm; BLA: AP –2.8 mm, L ± 5 mm, DV –6.5 mm; IC: AP +1.2 mm, L ± 5.5 mm, DV –4 mm; all relative to bregma (Paxinos and Watson 1998). Cannulae were anchored with dental acrylic cement to two surgical screws fixed to the skull. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent them from clogging. Behavioral procedures began at least 5 d after surgery.

Experimental groups according to cannulae implantation and drug infusions resulted as follows: IC-V (ACSF infused,  $n = 32$ ) and IC-A (anisomycin infused,  $n = 33$ ) implanted in the IC; CeA-V (ACSF infused,  $n = 28$ ) and CeA-A (anisomycin infused,  $n = 30$ ) implanted in the CeA; BLA-V (ACSF infused,  $n = 13$ ) and BLA-A (anisomycin infused,  $n = 15$ ) implanted in the BLA; IC+CeA-V (ACSF infused,  $n = 45$ ) and IC+CeA-A (anisomycin infused,  $n = 46$ ) implanted in both the IC and the CeA; IC+BLA-V (ACSF infused,  $n = 22$ ) and IC+BLA-A (anisomycin infused,  $n = 29$ ) implanted in both the IC and the BLA.

For the bilateral microinfusions, an injector was inserted into each guide cannulae extending 2 mm below the cannula tip. A volume of 0.5  $\mu$ L (0.5  $\mu$ L/min) was injected per hemisphere in the BLA and CeA and 1  $\mu$ L in the IC. Animals were handled for at least 3 d before injection day to minimize stress.

### Histology

When the experiments were finished, animals were injected with a lethal dose of pentobarbital and perfused with physiological saline solution. Brains were removed and stored in a paraformaldehyde (4%) solution and then transferred to a 30% buffered sucrose solution and stored at 4°C until they were cut. Forty-micrometer thick coronal section slices were obtained and stained with Cresyl violet; sites of injection were examined under a light microscope. Sample pictures of each structure with injection placement are shown in Figure 1.

### Statistical analysis

Statistical analysis was done with repeated-measures ANOVAs and post-hoc analysis with Fisher's *t*-test. For a better appreciation of the results, vehicle-injected animals are presented as a single group for Figures 2 and 3; representation of individual vehicle groups can be seen in Supplemental Figures A and B, respectively (online). However, statistical analysis was done with the corresponding control group. A probability level of  $P < 0.05$  was accepted as statistical significance. In the figures, the means consumption ± SEM are expressed as a percentage of the first CTA intake.

### Acknowledgments

We thank Oreste Carbajal for his technical assistance. This study was performed in partial fulfillment of the requirements of the

PhD degree in Biomedical Sciences of P.G.-D.T. at the Universidad Nacional Autónoma de México with a doctoral fellowship provided by CONACyT. This work was supported by CONACyT 60478 and DGAPA-UNAM IN220706-03.

### References

- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y. 2003. The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci* **17**: 1527–1530.
- Bahar A, Dorfman N, Dudai Y. 2004. Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* **19**: 1115–1118.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**: 671–675.
- Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T. 1998. *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind*. Oxford University Press, New York.
- Davis HP, Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: A review. *Psychol Bull* **96**: 518–559.
- Dudai Y. 2002. *Memory from A to Z. Keywords, concepts, and beyond*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**: 51–86.
- Dudai Y. 2006. Reconsolidation: The advantage of being refocused. *Curr Opin Neurol* **16**: 174–178.
- Dudai Y, Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**: 93–100.
- Dunn LT, Everitt BJ. 1988. Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav Neurosci* **102**: 3–23.
- Duvarci S, Nader K. 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* **24**: 9269–9275.
- Eisenberg M, Kobilo T, Dudai Y. 2003. Stability of retrieved memory: Inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**: 1102–1104.
- Eschenko O, Mölle M, Borne J, Sara SJ. 2006. Elevated sleep spindle density after learning or after retrieval in rats. *J Neurosci* **26**: 12914–12920.
- Escobar ML, Alcocer I, Chao V. 1998. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res* **812**: 246–251.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. 2000. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* **852**: 208–212.
- Escobar ML, Alcocer I, Bermúdez-Rattoni F. 2002. In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* **129**: 101–106.
- Ferreira G, Miranda MI, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F. 2005. Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci* **22**: 2595–2604.
- Gold PE. 2007. Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs. amnesia. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 201–211.
- Grossman SE, Fontanini A, Wieskopf JS, Katz DB. 2008. Learning-related plasticity of temporal coding in simultaneously recorded amygdala-cortical ensembles. *J Neurosci* **28**: 2864–2873.
- Gruest N, Richer P, Hars B. 2004. Memory consolidation and reconsolidation in the rat pup require protein synthesis. *J Neurosci* **24**: 10488–10492.
- Gutiérrez H, Ramírez-Trejo L, Silva-Gandarias R, Ormsby CE, Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. 1999. Redundant basal forebrain modulation in taste aversion memory formation. *J Neurosci* **19**: 7661–7669.
- Höistad M, Barbas H. 2008. Sequence of information processing for emotion through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. *Neuroimage* **40**: 1016–1033.
- Huff NC, Rudy JW. 2004. The amygdala modulates hippocampus-dependent context memory formation and stores cue-shock associations. *Behav Neurosci* **118**: 53–62.
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L. 2007. Reconsolidation of episodic memories: A subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* **14**: 47–53.
- Koh MT, Bernstein IL. 2003. Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: Interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* **14**: 405–407.
- Lee JL. 2008. Memory reconsolidation mediated the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* **11**: 1264–1266.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**: 839–843.

- McGaugh JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**: 1351–1358.
- McGaugh JL. 2000. Memory—a century of consolidation. *Science* **287**: 248–251.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. 2002. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 11417–11422.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y. 2006. Memory reconsolidation: Sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* **50**: 479–489.
- Nadel L, Moscovitch M. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 217–227.
- Nader K, Hardt O. 2009. A single standard for memory: The case for reconsolidation. *Natl Rev* **10**: 224–234.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdale for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–726.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R, Bermudez-Rattoni F. 2005. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* **12**: 533–537.
- Rodriguez-Ortiz CJ, Garcia-Delatorre P, Benavidez E, Ballesteros MA, Bermudez-Rattoni F. 2008. Intrahippocampal anisomycin infusions disrupts previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 352–359.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. 1993. Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* **59**: 49–56.
- Rossato JL, Bevilacqua LRM, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* **14**: 36–46.
- Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* **7**: 73–84.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* **24**: 4787–4795.
- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* **8**: 262–275.
- Yamamoto T. 2007. Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem Senses* **32**: 105–109.
- Yamamoto T, Fujimoto Y. 1991. Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res Bull* **27**: 403–406.
- Yasoshima Y, Yamamoto T. 1998. Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neuroscience* **84**: 1–5.

Received January 29, 2009; accepted in revised form July 2, 2009.



# Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction

Paola Garcia-delaTorre, Carlos J. Rodríguez-Ortiz, Israela Balderas and Federico Bermúdez-Rattoni  
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253, México D.F. 04510, México

**Keywords:** conditioned taste aversion, long-term memory, memory trace, temporal lobe

## Abstract

The extinction process has been described as the decline in the frequency or intensity of the conditioned response following the withdrawal of reinforcement. Hence, experimental extinction does not reflect loss of the original memory, but rather reflects new learning, which in turn requires consolidation in order to be maintained in the long term. During extinction of conditioned taste aversion (CTA), a taste previously associated with aversive consequences acquires a safe status through continuous presentations of the flavor with no aversive consequence. In addition, reconsolidation has been defined as the labile state of a consolidated memory after its reactivation by the presentation of relevant information. In this study, we analyzed structures from the temporal lobe that could be involved in consolidation and reconsolidation of extinction of CTA by means of new protein synthesis. Our results showed that protein synthesis in the hippocampus (HC), the perirhinal cortex (PR) and the insular cortex (IC) of rats participate in extinction consolidation, whereas the basolateral amygdala plays no part in this phenomenon. Furthermore, we found that inhibition of protein synthesis in the IC in a third extinction trial had an effect on reconsolidation of extinction. The participation of the HC in taste memory has been described as a downmodulator for CTA consolidation, and has been related to a context–taste association. Altogether, these data suggest that extinction of aversive taste memories are subserved by the IC, HC and PR, and that extinction can undergo reconsolidation, a process depending only on the IC.

## Introduction

Consolidation refers to the process by which memory becomes stored in the long term, and is known to be protein synthesis dependent (McGaugh, 1966, 2004; Davis & Squire, 1984). After consolidation, memory regains lability when retrieved (Misanin *et al.*, 1968), a process known as reconsolidation (Przybylski *et al.*, 1999; Nader *et al.*, 2000; Taubenfeld *et al.*, 2001). Reconsolidation has been shown to update memory when relevant information is presented (Sara, 2000; Duvarci & Nader, 2004; Lee, 2008). It has been reported that a brief exposure to the conditioned stimulus (CS) triggers a second wave of memory consolidation or reconsolidation, whereas prolonged exposure to the CS leads to the formation of a new memory that competes with the original: this is called extinction (Pedreira & Maldonado, 2003; Suzuki *et al.*, 2004).

Extinction has been described as a form of learning characterized by a decline in the frequency or intensity of the conditioned response following the withdrawal of reinforcement. Hence, experimental extinction does not reflect loss of the original memory, but rather reflects new learning (Myers & Davis, 2002). Even though reconsolidation and extinction are triggered by the same mechanism, they have

molecular differences and thus represent different memory processes. Berman & Dudai (2001) found that conditioned taste aversion (CTA) depends on muscarinic receptors and mitogen-activated protein kinase, whereas extinction of CTA does not. Baumgartel *et al.* (2008) found that the establishment of CTA was associated with the inhibition of endogenous calcineurin and increased expression of the transcription factor *Zif268* in the amygdala, whereas overactivation of calcineurin facilitated extinction of CTA.

Taste memory is a universally used paradigm, because of its simplicity. Neophobia describes a behavior resulting from the animal encountering a new taste, which becomes recognized as safe by further presentations (attenuation of neophobia) (Domjan, 1976; Bermudez-Rattoni, 2004). However, when the taste is followed by noxious consequences, subjects reduce their consumption and develop a taste aversion referred to as CTA (Bermudez-Rattoni, 2004), which relies on the amygdala (Yamamoto & Fujimoto, 1991; Bahar *et al.*, 2004; Yamamoto, 2007) and insular cortex (IC) (Dunn & Everitt, 1988; Rosenblum *et al.*, 1997; Escobar *et al.*, 1998; Yasoshima & Yamamoto, 1998). On the other hand, the extinction of CTA is known to depend on the IC (Berman & Dudai, 2001) and prefrontal cortex (Akirav *et al.*, 2006). The basolateral amygdala (BLA) (Bahar *et al.*, 2004) has also been reported to participate in the extinction of CTA by means of protein synthesis.

*Correspondence:* Federico Bermúdez-Rattoni, as above.  
E-mail: fbermude@ifc.unam.mx

Received 9 February 2010, accepted 2 June 2010

In a previous article, we described the participation of the IC, the hippocampus (HC) and the perirhinal cortex (PR) (De la Cruz *et al.*, 2008) in consolidation of taste neophobia attenuation. Taking into account that CTA extinction leads to recognition of the taste as safe, we decided to analyze these structures and describe their participation in this event. Since the extinction trace competes with the aversive trace for the expression of behavior, we also considered the BLA, which participates in CTA. On the view that extinction represents new learning, we studied the effect of inhibition of protein synthesis inhibition in these structures to examine its effect on extinction reconsolidation.

## Materials and methods

### Subjects

Male Wistar rats weighing 250–280 g, from the Instituto de Fisiología Celular breeding colony, were caged individually at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  on a 12-h light/12-h dark cycle. Food was available *ad libitum*. Experiments were performed in accordance with the Norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) and with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

### Drugs

The protein synthesis inhibitor anisomycin was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The drug was dissolved in artificial cerebrospinal fluid (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM glucose, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ), adjusted to pH 7. The final anisomycin concentration was 120 mg/mL.

### Behavioral procedures

Saccharin (0.1% w/v) was used as the CS, and intraperitoneal injection of LiCl (0.15 M, 1% body weight) as the unconditioned stimulus (US). Rats were trained over 3 days to obtain their daily water ration from a graduated cylinder during a period of 15 min at a specific time of day. On days 4 and 5, rats were presented with saccharin instead of water for 15 min. Fifteen minutes later they were injected intraperitoneally with LiCl solution. Water was again presented for 15 min 4.5 h after the injection to prevent the rats from becoming dehydrated. Saccharin was presented again on day 6 for the first extinction trial or on days 6–8 for three extinction trials; a memory test was performed on day 7 or day 9. Anisomycin or artificial cerebrospinal fluid (as control solution) was microinfused into the IC, BLA, HC or PR, as indicated in Results, 20 min before the first or third extinction acquisition. In addition, an extra control group was used as a reconsolidation control; on the day of infusion, these animals were presented with water instead of saccharin to avoid retrieval.

### Surgery and microinfusions

Rats were anesthetized with ketamine/xylazine (76 : 8 mg/kg), positioned in a stereotactic apparatus, and implanted bilaterally with stainless steel guide cannulae (30 gauge) aimed 2 mm above the IC, PR and BLA, or 1.5 mm above the HC. Coordinates were as follows: IC, AP + 1.2 mm, L  $\pm$  5.5 mm, DV – 4 mm; PR, AP – 3 mm, L  $\pm$  6.5 mm, DV – 5 mm; HC, AP – 3.4 mm, L  $\pm$  1.7 mm, DV – 2.7 mm; BLA, AP – 2.8 mm, L  $\pm$  5 mm, DV – 6.5 mm (all relative to bregma) (Paxinos & Watson, 1998). Cannulae were anchored with dental acrylic cement to two surgical screws fixed to the skull. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent them from clogging. Behavioral procedures were started at least 5 days after surgery.

Infusions were made immediately after saccharin consumption in the first or third extinction trial at a rate of 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The injectors were left in place for another 1 min to allow adequate diffusion of the drug.

### Histology

When the experiments were finished, rats were injected with a lethal dose of pentobarbital and perfused with physiological saline solution. Brains were removed and stored in a paraformaldehyde (4%) solution, and then transferred to a 30% buffered sucrose solution and stored at  $4^\circ\text{C}$  until they were cut. Forty-micrometer-thick coronal section slices were obtained and stained with Cresyl violet; sites of injection were examined under a light microscope.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with a  $2 \times 4$  (treatment  $\times$  structure) ANOVA to evaluate differences among groups infused with either vehicle solution or anisomycin; paired *t*-tests were used to compare consumption within groups, and unpaired *t*-tests for probe day between groups. The figures show the mean and SEM of the consumption scores during the test day. The scores were calculated as the differences in consumption between infusion day and test day and as percentage of the first saccharine intake.

## Results

### Histology

After histological analysis, the *n*-values for the groups were as follows. For the first experiment, where infusions were performed after the first extinction trial, IC-V = 10, IC-A = 10, PR-V = 7, PR-A = 7, HC-V = 10, HC-A = 10, BLA-V = 8, and BLA-A = 8. For groups injected after a third extinction trial, IC-V = 12, IC-A = 13, PR-V = 9, PR-A = 9, HC-V = 12, HC-A = 12, BLA-V = 9, and BLA-A = 9. Figure 1 shows representative pictures of cannulae

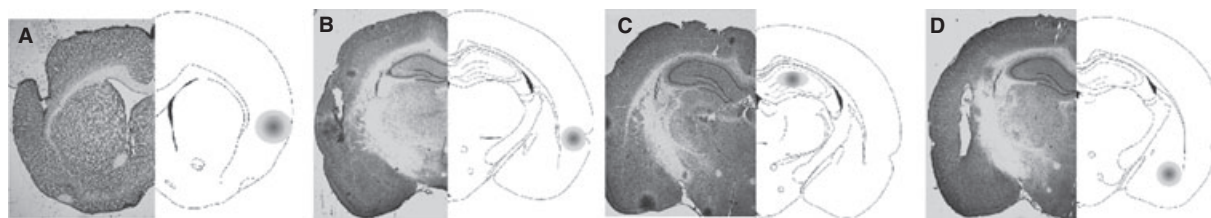


FIG. 1. Histology. Representative pictures of injector placement for each structure; the gray area represents the site where the majority of the injector tips were found. (A) IC. (B) PR. (C) HC. (D) BLA.

sites for each structure. Surgery was considered to be successful when injector tips were observed inside the gray area shown in Fig. 1.

#### Anisomycin infusions into the IC, PR or HC after the first extinction trial impair consolidation of extinction of CTA

To evaluate the participation of the IC, PR, HC and BLA in extinction consolidation, we infused anisomycin to inhibit protein synthesis in these structures (Fig. 2). A  $2 \times 4$  ANOVA showed differences between treatment ( $F_{1,60} = 13.56$ ;  $P < 0.05$ ), differences between structures ( $F_{3,60} = 5.78$ ;  $P < 0.05$ ) and a treatment  $\times$  structure interaction ( $F_{1,3} = 2.68$ ,  $P < 0.05$ ).

To evaluate group differences for each structure during extinction, we used unpaired  $t$ -tests. There were significant differences ( $t_{18} = 5.65$ ;  $P < 0.01$ ) between IC-V and IC-A on the test day, and no differences on the infusion day [ $t_{18} = 0.67$ ;  $P = \text{not significant (NS)}$ ]. A paired  $t$ -test showed differences between the first and second extinction trials for CI-V ( $t_9 = -2.32$ ;  $P < 0.05$ ); an increase in consumption was expected for this group. No difference was found between the first and second consumptions for CI-A ( $t_9 = 0.88$ ;  $P = \text{NS}$ ). These results show consolidation impairment when protein synthesis is inhibited in the IC on a first extinction trial.

Infusions of anisomycin into the PR on a first extinction trial showed consolidation impairment. An unpaired  $t$ -test showed differences between PR-V and PR-A ( $t_{12} = 1.49$ ;  $P < 0.05$ ) on the test day and no differences on the day of infusion ( $t_{12} = 2.44$ ;  $P = \text{NS}$ ). A paired  $t$ -test for PR-V showed differences between the infusion and probe days ( $t_6 = -4.71$ ;  $P < 0.01$ ), but no differences for PR-A ( $t_6 = -1.12$ ;  $P = \text{NS}$ ), indicating consolidation impairment for the latter group.

When anisomycin was infused into the HC, an unpaired  $t$ -test showed significant differences ( $t_{18} = 2.29$ ;  $P < 0.05$ ) between HC-V and HC-A on the test day, confirming a consolidation deficit in the group injected with anisomycin, and no effect on the infusion day ( $t_{18} = 0.11$ ;  $P = \text{NS}$ ). A paired  $t$ -test for HC-V showed significant differences between the first and second extinction trials ( $t_9 = -4.15$ ;  $P < 0.01$ ) and no differences for HC-A ( $t_9 = 0.01$ ;  $P = \text{NS}$ ).

We found no differences between groups for infusions into the BLA. An unpaired  $t$ -test for BLA-V and BLA-A showed no

differences between groups ( $t_{14} = -0.05$ ;  $P = \text{NS}$ ;  $t_{14} = -0.74$ ;  $P = \text{NS}$ ) on the infusion day or test day, respectively.

#### Anisomycin infusions into the IC after the third extinction trial impair extinction reconsolidation, but only affect consolidation when applied to the HC

To evaluate the involvement of the IC, PR, HC or BLA in reconsolidation of extinction of CTA, we infused anisomycin into these structures after the third extinction trial (Fig. 3). Saccharin consumption in extinction trials 1 and 2 can be seen in Fig. S1. No differences were found between vehicle and anisomycin-infused groups for any structure (data not shown). A  $2 \times 4$  ANOVA showed differences between treatment ( $F_{1,77} = 7.25$ ;  $P < 0.01$ ), no differences between structures ( $F_{3,77} = 1.71$ ;  $P = \text{NS}$ ), and a treatment  $\times$  structure interaction ( $F_{1,3} = 3.81$ ;  $P < 0.05$ ).

The IC requires protein synthesis for extinction reconsolidation of CTA to occur. An unpaired  $t$ -test showed no differences between IC-V and IC-A on the third extinction trial ( $t_{23} = -0.54$ ;  $P = \text{NS}$ ), but significant differences ( $t_{23} = 3.49$ ;  $P < 0.01$ ) between groups on the probe day, indicating an extinction reconsolidation impairment for animals infused with anisomycin. A paired  $t$ -test for IC-V showed differences between the third and fourth extinction trials ( $t_{11} = 3.81$ ;  $P < 0.01$ ), indicating an increase in saccharin consumption. Differences were also found for IC-A ( $t_{12} = 2.14$ ;  $P < 0.05$ ), where consumption on the test day significantly decreased, indicating not only consolidation impairment in the last trial but also impairment of the previous memory trace, reconsolidation. After two extinction trials, infusions of anisomycin into the IC in a non-retrieval trial (water instead of saccharin) had no effect on memory (Fig. S2). An unpaired  $t$ -test showed no differences between IC-V and IC-A on the test day ( $t_{13} = -0.22$ ;  $P = \text{NS}$ ). These data support the idea that reconsolidation is affected when protein synthesis in the IC is impaired on an updating protocol, and cannot be affected when memory reactivation is absent.

On the other hand, infusions into the PR after the third extinction trial had no effect on consolidation, as indicated by an unpaired  $t$ -test, which showed no differences between groups either on the infusion day or on the test day ( $t_{16} = 0.58$ ;  $P = \text{NS}$ ;  $t_{16} = 1.44$ ;  $P = \text{NS}$ ). Paired

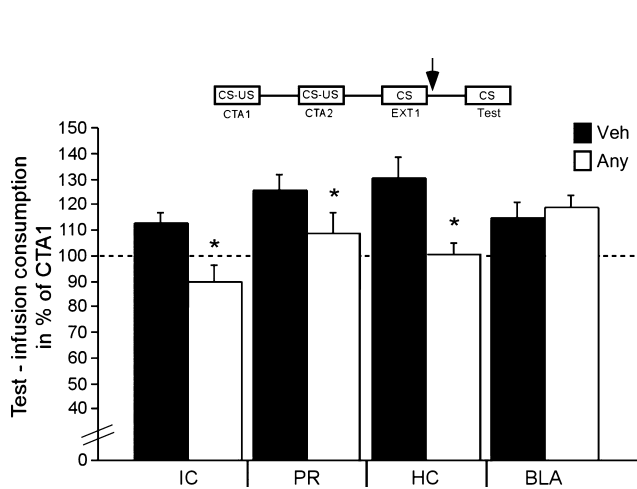


FIG. 2. Anisomycin infusions into the IC, PR or HC, after the first extinction day, impair extinction consolidation, but infusion into the BLA has no effect ( $*P < 0.05$ ). Data are given as the difference between test and infusion day consumption as percentage of the first acquisition consumption.

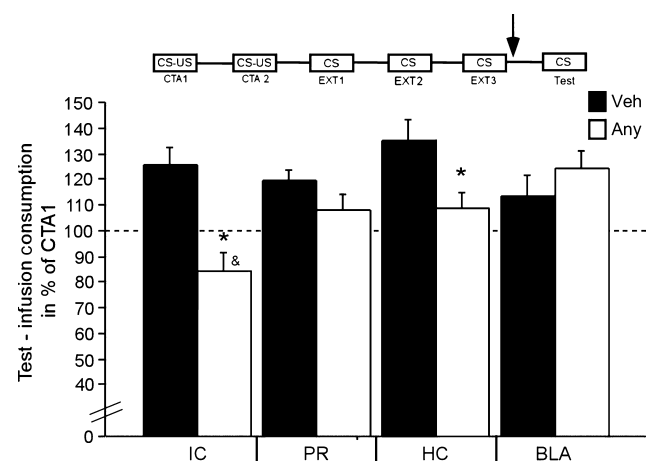


FIG. 3. Anisomycin infusions into the HC or PR, after the third extinction trial, impair consolidation; reconsolidation is impaired only with infusion into the IC ( $*P < 0.05$  and  $\&P < 0.05$  between infusion and test days for IC-A). Data are given as the difference between test and infusion day consumption as percentage of the first acquisition consumption.

*t*-tests for PR-V showed significant differences ( $t_8 = -4.76$ ;  $P < 0.01$ ) between days, indicating increased consumption. Nonetheless, no differences were found for PR-A ( $t_8 = -1.31$ ;  $P = \text{NS}$ ), indicating a consolidation deficit for this particular group.

For infusion after the third extinction trial, an unpaired *t*-test showed a significant difference between HC-V and HC-A ( $t_{22} = 2.30$ ;  $P < 0.05$ ), which can be seen in Fig. 3. A paired *t*-test for the test day showed differences for HC-V ( $t_{11} = -4.32$ ;  $P < 0.01$ ) but not for HC-A ( $t_{11} = -1.44$ ;  $P = \text{NS}$ ), again indicating a consolidation impairment. No differences were found in the third extinction trial ( $t_{22} = 1.06$ ;  $P = \text{NS}$ ).

Finally, when protein synthesis was inhibited after the third extinction trial for the BLA, no significant differences on the infusion or probe days were found, as shown by an unpaired *t*-test for BLA-V and BLA-A ( $t_{16} = -0.75$ ;  $P = \text{NS}$ ;  $t_{16} = -1.89$ ;  $P = \text{NS}$ ).

## Discussion

It has been proposed that the outcome of an extinction trial can be regarded as the sum of multiple time-dependent processes involving at least two traces: the excitatory original CS–US trace and the inhibitory new CS–no US trace (Eisenberg *et al.*, 2003). Hence, extinction of CTA is a relearning process, in which the taste is associated with the absence of a deleterious consequence (Bermudez-Rattoni, 2004). In this regard, Akirav *et al.* (2006) observed molecular differences between CTA consolidation and CTA extinction. This group found that infusion of anisomycin, but not of an NMDA antagonist, into the ventromedial prefrontal cortex impaired extinction of CTA, whereas anisomycin had no effect on CTA consolidation. These data, along with other evidence showing that these two processes depend on different structures (CTA on the IC and central amygdala; extinction on the IC, PR and HC), confirm that consolidation of extinction of CTA and consolidation of CTA are two different memory processes and can be differentiated.

Infusions of anisomycin into the IC after a first extinction trial affected consolidation of extinction. When we evaluated the effect of protein synthesis inhibition in an extinction reconsolidation protocol, we found that the IC participates in this particular process. The destabilization of a previous consolidated trial was observed when the IC was infused with anisomycin on a third extinction trial of CTA. As a new association is formed once extinction is learned, it is likely that memory undergoes a reconsolidation process. Thus, the IC seems to be responsible for consolidation and reconsolidation of extinction of CTA. When extinction reconsolidation occurs, the new trace has the capacity to be destabilized and restabilized as needed. These data support the idea that extinction and reconsolidation are not two competing processes, but rather that they can coexist, depending on behavioral experience, as recently suggested by Perez-Cuesta & Maldonado (2009). This group investigated whether the time windows of extinction and reconsolidation can be affected in crabs, and found that while CS–US association is being extinguished, memory is still labile and susceptible to reconsolidation. Accordingly, we found that extinction can undergo reconsolidation, confirming that these are different processes and that both extinction and reconsolidation are possible.

We found that the HC participates in consolidation of CTA extinction. The role of this structure has been suggested to be related to the contextual and temporal modulation of the taste memory. Gallo and coworkers found that after learning of a saline taste aversion in a particular physical context or at a particular time of day, the extinction of the taste aversion was dependent on both the place and the time of

learning (Moron *et al.*, 2002). They compared the ability of changes of place and changes of time of day to separately modulate learned saline-aversion memory phenomena in rats. In another study by the same group (Molero *et al.*, 2005), it was found that the HC is selectively involved in the time cues of safe taste memories. This group reported that induced excitotoxic lesions of the dorsal HC disrupted the effect of a context change between pre-exposure and conditioning. These studies support the idea that context is intimately involved in taste memories, and suggest particular participation of the HC in context recognition. Likewise, we were able to demonstrate that protein synthesis in the HC, but not in the IC or PR, is required to consolidate objects in context recognition memories. Conversely, protein synthesis in the IC or PR is necessary to consolidate object recognition memory (Balderas *et al.*, 2008). Similarly, Corcoran *et al.* (2005) described a relationship between the HC and context in extinction of fear conditioning by means of inactivation of this structure. This group found that inactivation of the HC during fear conditioning extinction training disrupted the contextual encoding of extinction memory. Altogether, these data suggest that the involvement of the HC in extinction of aversive memories is related to the context.

When we analyzed the role of the BLA, we found that it does not participate in CTA extinction. The amygdala is known to be critically involved in the acquisition and retention of lasting memories of emotional experiences (McGaugh, 2004). The participation of the amygdala has been associated with CTA consolidation and reconsolidation (Yamamoto & Fujimoto, 1991; Bahar *et al.*, 2004; Yamamoto, 2007; Garcia-Delatorre *et al.*, 2009) and other aversive tasks, such as fear conditioning or passive avoidance (Maren & Fanselow, 1996). According to our results, when the aversive component of the task is no longer present (extinction), the amygdala seems to have no participation. However, Bahar *et al.* (2004) found that the BLA does participate in extinction of CTA; this discrepancy may be attributable to differences between protocols. A post-saccharin anisomycin infusion guarantees that the effect is on consolidation and not on acquisition.

In relation to the participation of the amygdala in taste memories, our group previously found joint participation of the IC and central amygdala in reconsolidation of CTA. By means of protein synthesis inhibition, we found that these two structures share the aversive trace, even though a single structure (IC or central amygdala) can actually prevent destabilization of the previously consolidated trace (Garcia-Delatorre *et al.*, 2009). Also, it was previously reported that the HC, PR and IC are necessary for attenuation of neophobia consolidation (De la Cruz *et al.*, 2008). These results, along with the data presented here, support the multiple-trace theory proposed by Nadel & Moscovitch (1997), as multiple structures are participating in taste memory consolidation, extinction and reconsolidation. This theory proposes that long-term memory stability should be supported by proliferation of multiple memory traces within the temporal lobe. We found that extinction consolidation of CTA is dependent on at least two cortical structures (IC and PR) as well as on the HC.

The IC is thus involved in every aspect of taste memories, whether the flavor is catalogued as aversive (Dunn & Everitt, 1988; Rosenblum *et al.*, 1997; Escobar *et al.*, 1998; Yasoshima & Yamamoto, 1998) or as safe (Berman & Dudai, 2001; De la Cruz *et al.*, 2008), and when consolidation or reconsolidation of both taste memories takes place. On the other hand, other structures of the temporal lobe have different functions in taste memories; the amygdala seems to participate only when the taste is associated with aversion (Yamamoto & Fujimoto, 1991; Bahar *et al.*, 2004; Yamamoto, 2007), and the HC or PR when other features related to the taste are being consolidated (De la Cruz *et al.*, 2008). The HC and PR seem to complement the IC processing

of the taste and related components, including the definition of taste as safe or aversive.

Neophobia, another property of taste memory, has been described as a predisposition to limit the intake of a novel flavor until the animal learns that the flavor is not correlated with aversive consequences; the process of learning that a particular flavor is safe is known as attenuation of neophobia (Bermudez-Rattoni, 2004). This task is known to depend on the IC (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2005), the HC and the PR (De la Cruz *et al.*, 2008). Thus, the same structures that participate in attenuation of neophobia seem to be involved in extinction of CTA. This relationship can be easily explained in the following terms: in both tasks, extinction and attenuation of neophobia, the taste is being catalogued as safe; either as a unique trace (attenuation of neophobia) or as a new trace (extinction). As we concluded from the differences shown in this work, whereas the IC seems to be necessary for CTA extinction consolidation and reconsolidation, the PR and HC participate only during CTA extinction consolidation, and the BLA is not involved in extinction consolidation or reconsolidation.

In conclusion, the PR, IC and HC are three structures that participate in the consolidation of extinction of CTA, and they are the same structures that subservise attenuation of neophobia, a taste memory task that also identifies a particular flavor as safe. In addition, we found that extinction of CTA can undergo reconsolidation by means of protein synthesis in the IC, a result that supports the idea of extinction as an independent process with the capacity for destabilization in order for new information to be incorporated.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Consumption in extinction trials 1 and 2 is shown for every structure.

Fig. S2. Anisomycin infusions into the IC in a non-retrieval trial have no effect on memory.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset by Wiley-Blackwell. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

## Acknowledgements

We thank Cristina Zamorano Ng-Teajan and Consuelo Pérez-Sánchez for their experimental support, as well as Perla Moreno and Oreste Carbajal for their technical assistance. This study was performed in partial fulfillment of the requirements of the PhD degree in Biological Sciences of Paola García-delaTorre at the Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by CONACyT 60478, and DGAPA-UNAM IN216709.

## Abbreviations

BLA, basolateral amygdala; CS, conditioned stimulus; CTA, conditioned taste aversion; HC, hippocampus; IC, insular cortex; NS, not significant; PR, perirhinal cortex; US, unconditioned stimulus.

## References

Akirav, I., Khatsrinov, V., Vouimba, R.M., Merhav, M., Ferreira, G., Rosenblum, K. & Maroun, M. (2006) Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learn. Mem.*, **13**, 254–258.

- Bahar, A., Dorfman, N. & Dudai, Y. (2004) Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1115–1118.
- Balderas, I., Rodríguez-Ortiz, C.J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McLaugh, J.L. & Bermudez-Rattoni, F. (2008) The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn. Mem.*, **15**, 618–624.
- Baumgartel, K., Genoux, D., Welzl, H., Tweedie-Cullen, R.Y., Koshibu, K., Livingstone-Zatchej, M., Mamie, C. & Mansuy, I.M. (2008) Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nat. Neurosci.*, **11**, 572–578.
- Berman, D.E. & Dudai, Y. (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, **291**, 2417–2419.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 209–217.
- Corcoran, K.A., Desmond, T.J., Frey, K.A. & Maren, S. (2005) Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J. Neurosci.*, **25**, 8978–8987.
- Davis, H.P. & Squire, L.R. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.*, **96**, 518–559.
- De la Cruz, V., Rodríguez-Ortiz, C.J., Balderas, I. & Bermudez-Rattoni, F. (2008) Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur. J. Neurosci.*, **28**, 1377–1381.
- Domjan, M. (1976) Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J. Exp. Psychol.*, **2**, 17–27.
- Dunn, L.T. & Everitt, B.J. (1988) Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav. Neurosci.*, **102**, 3–23.
- Duvarci, S. & Nader, K. (2004) Characterization of fear memory reconsolidation. *J. Neurosci.*, **24**, 9269–9275.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D.E. & Dudai, Y. (2003) Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*, **301**, 1102–1104.
- Escobar, M.L., Chao, V. & Bermudez-Rattoni, F. (1998) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.*, **779**, 314–319.
- García-Delatorre, P., Rodríguez-Ortiz, C.J., Arreguin-Martínez, J.L., Cruz-Castaneda, P. & Bermudez-Rattoni, F. (2009) Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn. Mem.*, **16**, 514–519.
- Lee, J.L. (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.*, **11**, 1264–1266.
- Maren, S. & Fanselow, M.S. (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*, **16**, 237–240.
- McLaugh, J.L. (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science*, **153**, 1351–1358.
- McLaugh, J.L. (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 1–28.
- Misanin, J.R., Miller, R.R. & Lewis, D.J. (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, **160**, 554–555.
- Molero, A., Moron, I., Ballesteros, M.A., Manrique, T., Fenton, A. & Gallo, M. (2005) Hippocampus, temporal context and taste memories. *Chem. Senses*, **30**(Suppl 1), i160–i161.
- Moron, I., Manrique, T., Molero, A., Ballesteros, M.A., Gallo, M. & Fenton, A. (2002) The contextual modulation of conditioned taste aversions by the physical environment and time of day is similar. *Learn. Mem.*, **9**, 218–223.
- Myers, K.M. & Davis, M. (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, **36**, 567–584.
- Nadel, L. & Moscovitch, M. (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**, 217–227.
- Nader, K., Schafe, G.E. & Le Douarin, J.E. (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, **406**, 722–726.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th Edn., Academic Press, San Diego.
- Pedreira, M.E. & Maldonado, H. (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, **38**, 863–869.
- Perez-Cuesta, L.M. & Maldonado, H. (2009) Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn. Mem.*, **16**, 714–721.

- Przybylski, J., Roullet, P. & Sara, S.J. (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J. Neurosci.*, **19**, 6623–6628.
- Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutierrez, R. & Bermudez-Rattoni, F. (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn. Mem.*, **12**, 533–537.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, S., Lamprecht, R. & Dudai, Y. (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J. Neurosci.*, **17**, 5129–5135.
- Sara, S.J. (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.*, **7**, 73–84.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J. & Kida, S. (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.*, **24**, 4787–4795.
- Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B. & Alberini, C.M. (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat. Neurosci.*, **4**, 813–818.
- Yamamoto, T. (2007) Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem. Senses*, **32**, 105–109.
- Yamamoto, T. & Fujimoto, Y. (1991) Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res. Bull.*, **27**, 403–406.
- Yasoshima, Y. & Yamamoto, T. (1998) Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neuroscience*, **84**, 1–5.