



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CARACTERIZACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE ARC EN LA
FORMACIÓN DE LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO AL SABOR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Jean-Pascal Morin

DIRECTOR DE TESIS: FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio de Redes Neuronales Plásticas en el Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México. Fue dirigido por el Dr. Federico Bermúdez Rattoni y el Dr. Víctor Ramírez Amaya; con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectos: 60478 (FBR) y 130802 (VRA) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) proyectos: IN216709 (FBR) y IN216510-22 (VRA).

Quiero agradecer infinitamente al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por su enseñanza, sus consejos, su confianza y su gran paciencia. Agradezco muchísimo también al Dr. Víctor Ramírez Amaya por su valiosa y energética tutoría, por su confianza en mí y sobre todo por despertar ávidamente mi interés en varios temas de las neurociencias. Muchísimas gracias también a la Dra. Lourdes Massieu por su tutoría y sus valiosos consejos a lo largo del desarrollo de este proyecto. Adicionalmente, quisiera ofrecer un agradecimiento muy particular a las Técnicas Académicas Perla del Rocío Moreno Castilla y Ariana Israela Balderas Moreno por su apasionada dedicación al laboratorio e invaluable ayuda para la realización de este proyecto. Igualmente gracias a Lucía Mendoza Viveros y a Aketzali García por haber sido alumnas brillantes y muy dedicadas.

Agradezco también a los Técnicos Académicos Gabriel Orozco Hoyuela y Elsa Nydia Hernández Ríos de las Unidades de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular y del Instituto de Neurobiología respectivamente por su asistencia técnica de gran calidad y sus enseñanzas acerca del uso del microscopio confocal y a Claudia Jimena Sandoval Arroyo del laboratorio del Dr. Ramírez-Amaya por su ayuda constante e incondicional. Gracias también al Técnico Académico Francisco Pérez Eugenio, a Oreste Carbajal y a Patricia Delgado del Instituto de Fisiología Celular así como a Cutberto Dorado del Instituto de Neurobiología por su trabajo de calidad que sin duda ayudaron altamente al éxito de la presente empresa.

Muchas gracias finalmente a los miembros de mi jurado, los doctores Martha Escobar, Rosalinda Guevara, Roberto Prado y Ranier Gutiérrez por la revisión de la presente tesis y al Lic. Luis Ángel Muñoz Gutiérrez por la corrección del estilo.

À ma mère

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I: Breve introducción histórica al estudio de la plasticidad y la memoria en el mamífero adulto	7
CAPÍTULO II: Caracterización de la expresión de Arc durante la formación de la memoria de reconocimiento al sabor seguro	
Antecedentes	13
Problema de investigación y alcance del proyecto	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
Resultados	30
Discusión	43
CAPÍTULO III: Expresión de Arc en la CI inducida por un cambio en el valor hedónico del estímulo gustativo	58
Antecedentes	58
Hipótesis	59
Objetivo	59
Resultados	60
Discusión	63
CAPÍTULO IV: Conclusiones y perspectivas	67
REFERENCIAS	69
APÉNDICE	79

RESUMEN

El gen de expresión inmediata (GEI) *Arc* juega un papel importante en la plasticidad sináptica; su proteína está localmente traducida en la dendrita, donde ha sido reportado que participa en varios mecanismos de plasticidad. Gracias a su estrecha relación con la actividad neuronal, la expresión de *Arc* ha sido usada ampliamente como herramienta para marcar redes neuronales activadas por una gama de tareas conductuales. Sin embargo, los estudios que han examinado la modulación de la expresión de *Arc* por el aprendizaje y la memoria produjeron resultados a veces contradictorios. En efecto, algunos estudios han reportado que la adquisición inicial de una tarea induce mayores niveles de *Arc* que el evocar una tarea consolidada. Por otro lado otros han reportado que la expresión de *Arc* no regresa a niveles basales después del sobreentrenamiento o con sucesivas presentaciones del mismo estímulo; es decir que evocar una memoria consolidada induce niveles semejantes de *Arc* que la adquisición de la misma. Además, la mayoría de estos estudios han analizado el mRNA y sorprendentemente, poco se sabe sobre cómo el aprendizaje afecta los niveles de la proteína *Arc*. En este estudio, usamos la tarea de memoria de reconocimiento al sabor y analizamos la acumulación de la proteína *Arc* en la corteza insular en distintos tiempos durante la formación de la memoria al sabor seguro. Interesantemente, encontramos que se inducen mayores niveles de *Arc* por la presentación de un sabor familiar que por uno novedoso. Además, este aumento con la familiarización se atenúa al inyectar anisomicina en el hipocampo dorsal, un tratamiento que se sabe inhibe la formación de la memoria de reconocimiento al sabor seguro. Adicionalmente, análisis de inmunofluorescencia con microscopía confocal revelaron que la proporción de neuronas expresando la proteína *Arc* era la misma después de consumir un sabor novedoso y uno familiar, pero la cantidad de *Arc* en la dendrita era dramáticamente más alta en la condición familiar. También la inmunoreactividad de *Arc* en el soma, medida con intensidad integrada así como la correlación entre la inmunoreactividad a *Arc* y al marcador dendrítico MAP-2, mostró que el grado de familiaridad de un sabor afecta su capacidad en inducir *Arc* únicamente en la dendrita sin afectar significativamente la acumulación de la proteína en otras estructuras citoarquitectónicas. Estos resultados brindan nueva información acerca de cómo la experiencia afecta la plasticidad cortical.

En un estudio paralelo, mostramos cómo el valor hedónico de un estímulo gustativo puede afectar la expresión de la proteína *Arc* en la corteza insular, la corteza gustativa primaria. La ingestión de quinina segura (a la que no se asoció ninguna consecuencia de malestar gástrico) no produjo incrementos similares en la expresión de *Arc*, como la que observamos con la sacarina, en comparación con niveles controles. Además, hacer que un estímulo de sacarina segura se vuelva aversivo, con inyecciones de 0.15M LiCl, hizo que bajaran drásticamente los niveles de *Arc* inducidos por el sabor. Estos últimos datos muestran que un cambio en el valor hedónico de un estímulo gustativo produce también un cambio en los mecanismos plásticos a largo plazo en la corteza insular.

ABSTRACT

The immediate early gene (IEG) *Arc* is known to play an important role in synaptic plasticity; its protein is locally translated in the dendrites where it has been involved in several types of plasticity mechanisms. Because of its tight coupling with neuronal activity, *Arc* has been widely used as a tool to tag behaviorally activated networks. However, studies examining the modulation of *Arc* expression during and after learning have yielded somewhat contradictory results. Although some have reported that higher levels of *Arc* were induced by initial acquisition of a task rather than by reinstating a learned behavior, others have found that acquisition of a novel behavior and retrieval of a consolidated one induced similar levels of *Arc* mRNA. Moreover, most of these studies have focused on the mRNA and, surprisingly, relatively little is known about how learning can affect *Arc* protein expression levels. Here we used taste recognition memory and examined *Arc* protein expression in the insular cortex of rats at distinct times during taste memory formation. Interestingly, we found that more *Arc* protein was induced by a familiar rather than by a novel taste. Moreover, this increase was inhibited by post-trial intrahippocampal anisomycin injections, a treatment known to inhibit safe-taste memory consolidation. In addition, confocal microscopy analysis of immunofluorescence stained tissue revealed that the proportion of IC neurons expressing *Arc* was the same in animals exposed to novel and familiar taste, but *Arc* immunoreactivity in dendrites was dramatically higher in rats exposed to the familiar taste. Moreover, *Arc* immunoreactivity in the soma, measured by integrated intensity, as well as correlation coefficient with dendritic marker MAP-2, measured by Manders' method showed that the increase in *Arc* protein was specific to the dendrites and did not vary in other cytoarchitectonic structures. These results provide novel insights on how experience affects cortical plasticity.

In a parallel study, we show how the hedonic nature of the taste stimulus can affect *Arc* protein expression in the insular cortex, the primary gustatory cortex. Ingestion of safe quinine (to which no noxious gastric consequence was associated) failed to produce similar increases in *Arc* as we observed with saccharin, compared to control levels. Moreover, rendering safe saccharin aversive by intraperitoneal 0.15M LiCl injections made taste induced *Arc* levels in the IC drop drastically. These results show that a shift in the hedonic value of a gustatory stimulus also produce a shift in long-term plasticity mechanisms in the insular cortex.

CAPÍTULO I: Breve introducción histórica al estudio de la plasticidad y la memoria en el mamífero adulto

En el año 1949 se publicó el trabajo que posiblemente ha sido el más crucial para el avance de las neurociencias conductuales modernas. Ese año, el neurocientífico canadiense Donald Hebb publicó “The Organization of Behavior” que constituye, junto con “On the Origins of Species” uno de los libros más importantes de la historia de la biología gracias a las ideas, simples y poderosas que proponen (Adams, 1998). Si bien “nada en la biología tiene sentido excepto a la luz de la evolución” (Dobzhansky 1973), podríamos argumentar también que en la neurobiología de la memoria, muy poco tiene sentido si no se considera que el aprendizaje induce modificaciones en las conexiones de ciertas células, y que la información se almacena en ensambles neuronales, cuyas unidades sufrieron dichas modificaciones al activarse juntas. A grandes rasgos, esto es precisamente lo que se entiende hoy en día por “plasticidad neuronal” o la habilidad que tienen los circuitos neuronales de cambiar en respuesta al uso y la experiencia (Feldman 2009). Elucidar los mecanismos celulares y sinápticos de plasticidad responsables del aprendizaje y el almacenamiento de información en el cerebro constituye un reto central de las neurociencias modernas.

Por otro lado, el estudio moderno de la neurobiología de la memoria se ha aprovechado ampliamente de la descripción de pacientes con daño cerebral en regiones circunscritas, más recientemente con la ayuda de poderosas técnicas de imagenología cerebral. Durante la primera mitad del siglo XX, se creía que las funciones mnémicas estaban integradas con funciones perceptuales e intelectuales y ninguna región del cerebro se consideraba como

desproporcionadamente dedicada a la memoria (Squire & Wixted 2011). Sin embargo, desde la descripción del caso H.M. (Scoville & Milner 1957; Corkin et al. 1997; Squire 2009) se ha establecido que el lóbulo temporal medial está especializado para almacenar memorias declarativas, es decir, la memoria que puede ser recordada conscientemente, como hechos y eventos (Squire et al. 2007). Dentro del lóbulo temporal medial, con base en estudios realizados en humanos, monos y roedores, se ha propuesto que la corteza perirhinal se encarga de la familiarización con los estímulos [o “sentimiento de familiaridad” (Morris et al. 2008)], mientras que el hecho de recordar hechos y eventos sería lo propio del hipocampo (Brown & Aggleton, 2001; Balderas et al., 2008). Estudios en ratas sugieren que la corteza insular, un área adyacente al lóbulo temporal medial (Paxinos & Watson 2007), también juega un papel en la familiarización (Bermudez-Rattoni 2004; Bermudez-Rattoni et al. 2005; Balderas et al. 2008). Una visión alterna sostiene que tanto el hipocampo como la corteza perirhinal se encargan a la vez de la familiarización y del recuerdo (Squire et al. 2007; Squire & Wixted 2011). Sin embargo, los estudios en pacientes, además de una gran abundancia de estudios con lesiones reversibles (Thompson 2005), han generado un claro consenso en el sentido de que ciertas zonas del cerebro están especializadas para la memoria y éstas se encuentran en el lóbulo temporal medial, que incluye áreas corticales y subcorticales (Fig 1).

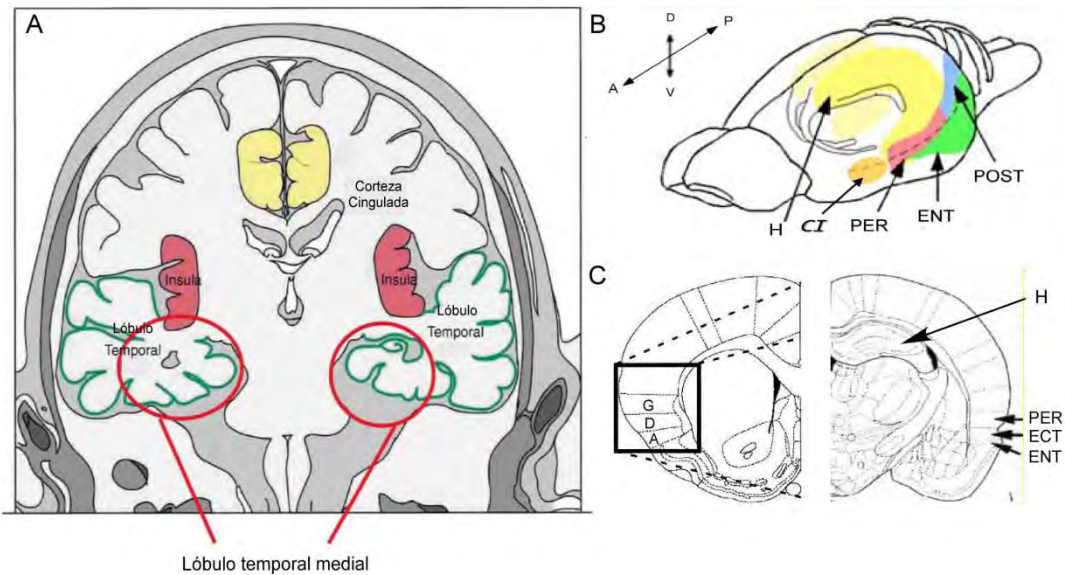


Figura 1: (A) Representación esquemática del lóbulo temporal medial (LTM) y de la corteza insular (CI) en el humano. (B) Esquema de un cerebro de rata con regiones del LTM y la CI resaltadas. H: hipocampo (en amarillo), CI: corteza insular (en naranja), PER: corteza perirhinal (en rojo), ENT: corteza entorhinal (en verde), POST: corteza postrhinal (en azul). (C, *hemisección izquierda*) Corte coronal de un hemisferio cerebral de rata ubicado en Bregma +1.20 mm. En cuadro representa la CI y sus subdivisiones. G: CI granular. D: CI disgranular. A: CI agranular. (C, *hemisección derecha*) Corte coronal de rata ubicado en Bregma -3.14 mm en el cual se observan estructuras del LTM. H: hipocampo, PER: corteza perirhinal, ECT: corteza ecto-rhinal, ENT: corteza entorhinal. Los dibujos no están a escala.

Desde la descripción de la potenciación a largo plazo en el giro dentado del hipocampo de conejo (Bliss & Lomo, 1973), que fue la primera evidencia de que modificaciones a largo plazo podían ser inducidas experimentalmente en sinapsis de mamíferos, la mayoría de los estudios sobre la plasticidad en el animal adulto se han enfocado a esta estructura. No obstante, abundante evidencia, tanto clínica como experimental, apoya un modelo en el cual, en acuerdo con la teoría de los ensamblajes neuronales de Hebb, los trazos mnésicos o las redes neuronales que los constituyen están generalmente distribuidos en varias áreas, corticales y subcorticales (Squire & Wixted 2011). En los últimos años, varios estudios,

utilizando distintas técnicas y modelos, han mostrado mecanismos plásticos relacionados con la conducta que suceden en la corteza cerebral (ej.: Escobar et al. 1998; Jones et al. 1999; Escobar & Bermúdez-Rattoni 2000; Polyn et al. 2005; Wang et al. 2006; Griffiths et al. 2008; Grossman et al. 2008, Feldman 2009).

A nivel molecular, es generalmente aceptado ahora que para que el fortalecimiento en las conexiones de las neuronas que permite la formación y estabilización del trazo de memoria suceda, es necesaria la síntesis de nuevas proteínas (Kandel 2001; Dudai 2004; Miyashita et al. 2008; Flavell & Greenberg 2008). Estas proteínas son, directa e indirectamente responsables de los cambios plásticos y su mantenimiento a largo plazo para la estabilización del trazo de memoria. Algunas de estas proteínas son productos de genes de expresión inmediata (GEIs). Estos son genes que se transcriben *de novo* en respuesta a patrones característicos de actividad sináptica (Worley et al. 1993; Miyashita et al. 2008). En las líneas que siguen, discutiremos su relevancia, en particular la de uno de ellos, *Arc*, para el estudio de la plasticidad y la memoria en mamíferos.

La expresión de algún GEI en una neurona “refleja la actividad reciente de esta neurona” y por lo tanto “detectar el mRNA o la proteína de un GEI provee información sobre dónde y cuándo -y cuales- neuronas fueron activadas” (Okuno 2011) por ejemplo durante la adquisición o la formación de una memoria, o bien por tareas conductuales en general (Rosen et al. 1992; Brennan et al. 1992; Zhu et al. 1995; Montag-Sallaz et al. 1999; Vann et al. 2000; Kubik et al., 2007; Miyashita et al., 2008). Por lo tanto, la detección de la expresión de GEIs constituye una poderosa *herramienta* para el estudio de las neurociencias de sistemas, en

particular para el estudio del aprendizaje y la memoria. A nivel funcional, los GEIs se agrupan en dos categorías: los que codifican factores de transcripción (ej. *c-fos*, *zenk*) y los *efectores* que codifican por ejemplo neurotrofinas como el *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), enzimas que participan en el metabolismo como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y proteínas involucradas en la dinámica estructural como el *Activity regulated cytoskeletal associated protein* o *Arc* (Lyford et al. 1995) también llamado *Activity-regulated gene 3.1* o *Arg3.1* (Link et al. 1995). De los GEIs generalmente usados como herramienta para marcar poblaciones de neuronas activadas por un evento conductual, *Arc* parece ser el más sensible a demandas específicas de la tarea conductual (Guzowski et al. 2001). Se ha visto que la misma proporción de neuronas piramidales de CA1 activadas por una tarea de exploración espacial durante registros electrofisiológicos, expresa el mRNA de *Arc* (Guzowski et al. 1999), mostrando que dicho IEG es un excelente marcador de actividad, por lo menos en esta región. Se ha visto también que el tiempo de exploración requerido para inducir la expresión de *Arc* es breve (Guzowski et al. 1999; Steward 2002). Además, a los ~2 min post-activación, el mRNA de *Arc* puede ser detectado en el núcleo de las neuronas activadas, y a los ~25 minutos, se encuentra exclusivamente en el soma. Una neurona activada tanto por un evento que sucedió 25 minutos antes como por otro evento que ocurrió 2 minutos antes del sacrificio expresará el mRNA de *Arc* tanto en el núcleo como en el soma. Este fenómeno permitió el desarrollo de una técnica especial de hibridación *in situ*, el *CatFISH*, que permite discriminar la historia de activación neuronal en dos puntos temporales distintos (Guzowski et al. 1999). Importantemente, se ha reportado que la gran mayoría de las células que expresan el mRNA de *Arc*

después de una tarea de exploración espacial también expresan la proteína (Ramirez-Amaya et al. 2005), aunque varios estudios han demostrado un posible control a nivel de la traducción (Dong et al. 2003; McIntyre et al. 2005; Waung et al. 2008; Park et al. 2008). Por otro lado, *Arc* es un GEI efector que participa directamente en cambios plásticos en el animal adulto que subyacen a la formación de memorias (Revisiones: Bramham et al. 2008, 2010). La proteína *Arc* se expresa tanto en el soma como en las dendritas de las neuronas activadas (Lyford et al., 1995). Su mRNA viaja preferentemente a las regiones dendríticas estimuladas por sinapsis excitatorias (Steward et al. 1998; Wallace et al. 1998), un fenómeno que es dependiente de la actividad de los receptores NMDA (Steward & Worley 2001). También se ha visto que la traducción del mRNA de *Arc* es localmente regulada (Dong et al., 2003; Bloomer et al., 2008), donde su proteína participa en eventos de plasticidad sináptica relevantes para la formación de *memorias* (Soulé et al. 2006; Rial Verde et al. 2006; Chowdhury et al. 2006; Shepherd et al. 2006; Messaoudi et al. 2007). Consecuentemente, se ha mostrado que la inhibición de la traducción de la proteína *Arc* por medio de antisentidos afectaba la fase de mantenimiento de la LTP, así como la consolidación de la tarea de laberinto acuático de Morris (Guzowski et al. 2000). Además, ratones *knock-outs* para *Arc* muestran déficits en la memoria de largo plazo en varias tareas ampliamente usadas en las neurociencias conductuales, tales como el laberinto acuático, la tarea de reconocimiento a objetos y el condicionamiento aversivo al sabor (CAS), aunque la memoria de corto plazo no se ve afectada (Plath et al. 2006).

CAPÍTULO II: Caracterización de la expresión de Arc durante la formación de la memoria de reconocimiento al sabor seguro

Antecedentes: Breve introducción al procesamiento y almacenamiento de la información gustativa

La Atenuación de la neofobia (AN) es una tarea de memoria gustativa que ha sido descrita como perteneciente a la categoría de “memoria de reconocimiento” (Bermudez-Rattoni 2004), y que de acuerdo al modelo de procesamiento dual está dividida en dos modos cualitativamente distintos: la familiaridad y el recuerdo (Brown & Aggleton 2001). La AN recluta el primer tipo de memoria de reconocimiento, la evaluación del grado de familiaridad. Es decir, cuando un animal se encuentra con un sabor nuevo, duda en consumirlo, pues no sabe si le hará daño. Este fenómeno conocido como neofobia se observa experimentalmente como una disminución drástica con respecto a la línea basal de agua, que le fue administrada en días anteriores (Domjan 1976). Una de las ventajas de la AN es que las vías neuronales y algunos mecanismos moleculares que subyacen el procesamiento del sabor han sido bien caracterizados (Bermudez-Rattoni 2004). Además se puede obtener una apreciación cuantitativa, simple y precisa del comportamiento del animal, medido en volumen de solución consumido (Fig. 2). Finalmente, se trata de un protocolo experimental simple para la modalidad gustativa que induce poco estrés y demanda una actividad locomotora mínima y que se puede medir fácilmente (Montag-Sallaz et al. 1999). La estructura cortical principal en participar en la familiarización a un sabor es la

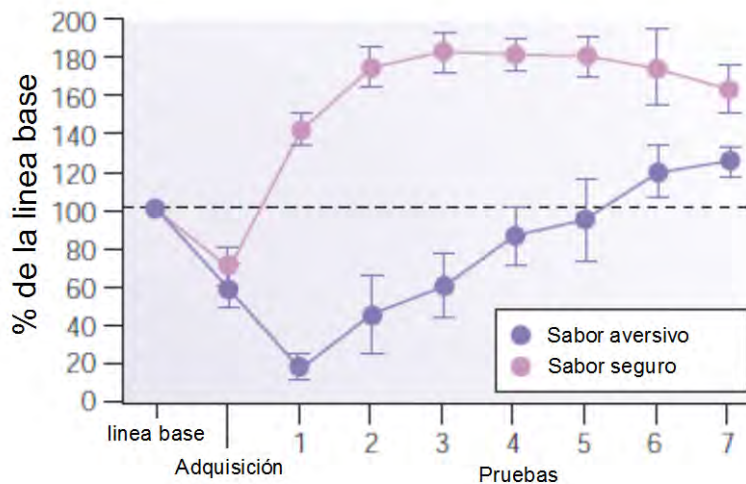


Figura 2: Curvas expresando el consumo de sacarina en porcentaje de la línea base de agua en la primera (adquisición) y subsecuentes presentaciones de una solución de sacarina. Nótese el decremento en el consumo en la primera presentación de sacarina. Los círculos morados representan un grupo que recibió inyecciones intraperitoneales de un agente que produce malestar estomacal (LiCl) después de la primera presentación de sacarina, lo que ocasiona condicionamiento aversivo al sabor. Los círculos rosas representan un grupo que no recibió inyecciones de LiCl y por lo tanto presenta atenuación de la neofobia. (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

corteza insular (para revisiones: Bermudez-Rattoni 2004; Núñez-Jaramillo et al. 2010; Yamamoto & Ueji 2011). Y en efecto, se ha visto que ratas carentes de corteza insular no distinguían entre un sabor novedoso y uno familiar (Kiefer & Braun 1977). Posteriormente, se ha mostrado con experimentos de inhibición latente (IL) que la síntesis proteica en la corteza insular era esencial para la familiarización con un sabor (Rosenblum et al. 1993). Más recientemente se ha visto que la CI es esencial no sólo para la consolidación sino también para la reconsolidación de la formación de la memoria de reconocimiento al sabor, tanto seguro como aversivo (Rodríguez-Ortiz et al. 2005). Desde entonces, se han reportado otras estructuras del lóbulo temporal medial que participan en la familiarización a largo plazo con un sabor. En el caso de un sabor que *no* es

asociado con una consecuencia de malestar gástrico, como es el caso en la AN, estas son principalmente la corteza perirhinal (Gutiérrez et al. 2004, De la Cruz et al., 2008) y el hipocampo dorsal (Molero et al. 2005; Yefet et al. 2006; De la Cruz et al. 2008). Sin embargo y sin lugar a duda el área telencefálica en donde la mayoría de los eventos moleculares y neuroquímicos relacionados con la presentación de un estímulo gustativo novedoso se han identificado, sigue siendo la CI. (Bermúdez-Rattoni, 2004, Núñez-Jaramillo et al., 2010, Yamamoto & Ueji, 2011). En el siguiente párrafo se describirán algunos de los mecanismos moleculares que ocurren en la CI durante la familiarización a un sabor.

A nivel neuroquímico, una serie de estudios con *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mostró un aumento en la liberación de la acetilcolina después de la presentación de una solución de sacarina novedosa pero no la familiar, fenómeno que se pudo replicar usando un estímulo de quinina novedosa (Miranda et al. 2000), demostrando que dicha liberación se debía al carácter novedoso del estímulo y no a características hedónicas propias al estímulo gustativo. Además, un estudio posterior demostró que la actividad de los receptores muscarínicos, que son receptores colinérgicos metabotrópicos, es esencial para que un sabor novedoso se vuelva familiar (Gutierrez et al. 2003). Por otro lado, se ha observado que un sabor novedoso, pero no uno familiar, induce un aumento en la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA, la activación de Erk (Berman et al. 1998, 2000), la expresión del factor de transcripción *c-fos* (Bernstein & Koh 2007) y la expresión de la proteína de andamiaje PSD-95, dependiente de pErk (Elkobi et al. 2008). Este aumento en la

expresión de PSD-95, al igual que la fosforilación de la subunidad NR2B y la activación de la vía de mTOR, son esenciales para la formación de la memoria gustativa (Elkobi et al. 2008; Barki-Harrington et al. 2009; Belelovsky et al. 2009).

Importantemente, como mencionamos previamente, la síntesis proteica en la CI es indispensable tanto para la consolidación como para la reconsolidación de la tarea de AN (Rodríguez-Ortiz et al. 2005). Es decir que cada presentación subsecuente de un sabor seguro es dependiente de síntesis proteica hasta alcanzar una meseta conductual (Fig. 3). Este dato, al igual que las características conductuales de la tarea de AN (ver Fig. 2), en la cual el consumo va incrementando en cada presentación del sabor, en días posteriores sugiere un establecimiento gradual del trazo a medida que el animal se familiariza con el sabor (Domjan 1976; Bermudez-Rattoni 2004; Rodríguez-ortiz et al. 2005). Por otro lado, una visión alterna propone que la presentación de un sabor novedoso representa un aprendizaje de un ensayo (*One-trial learning paradigm*, Yefet et al. 2006). Regresaremos sobre estas alternativas en la discusión. Finalmente, se reportó que un sabor novedoso incrementaba la fosforilación de CREB en Ser₁₃₃ y Akt en el HD pero no en la CI, sugiriendo que al menos algunos mecanismos moleculares difieren entre zonas corticales y arquicorticales durante la AN. En breve, todos estos estudios han ayudado a elucidar las bases estructurales y moleculares de la formación de la memoria de reconocimiento al sabor seguro.

Es importante mencionar que una particularidad de la modalidad gustativa respecto a otras modalidades es que el estímulo gustativo es administrado en forma voluntaria por el animal. Específicamente, a nivel integrativo, esto significa

que las respuestas de las neuronas del núcleo del tracto solitario (NTS) del bulbo raquídeo, así como las del hipotálamo que reciben aferencias del mismo, son moduladas de distinta manera por regiones distales. Por ejemplo la actividad del NTS es modulada de manera *bottom-up* por el vago y *top-down* por regiones más integrativas como la corteza orbito-frontal (Brodal 2003). Por lo tanto, un mismo sabor debería de inducir respuestas neuronales distintas dependiendo de las expectativas del animal (Fontanini & Katz 2009). Éstas pueden depender de experiencias previas almacenadas en la corteza y que actúan de manera *top-down* para modular la percepción de los estímulos gustativos previamente encontrados. Este fenómeno ha sido estudiado entre otros con la ayuda de dos tareas de memoria de reconocimiento al sabor que son la AN y el CAS. Para ambas tareas, las vías responsables del procesamiento y del almacenamiento de la información gustativa, esenciales para la consolidación de estas tareas, son bien conocidas a nivel neuroanatómico. A nivel central, que es lo que nos interesa aquí, se sabe por ejemplo que el aprendizaje del CAS induce un incremento en la conectividad funcional entre el amígdala y la CI (Grossman et al. 2008). Además se ha visto que la consolidación del CAS es dependiente de síntesis proteica en ambas estructuras (De la Cruz et al. 2008). Otro grupo, usando mapeo de actividad

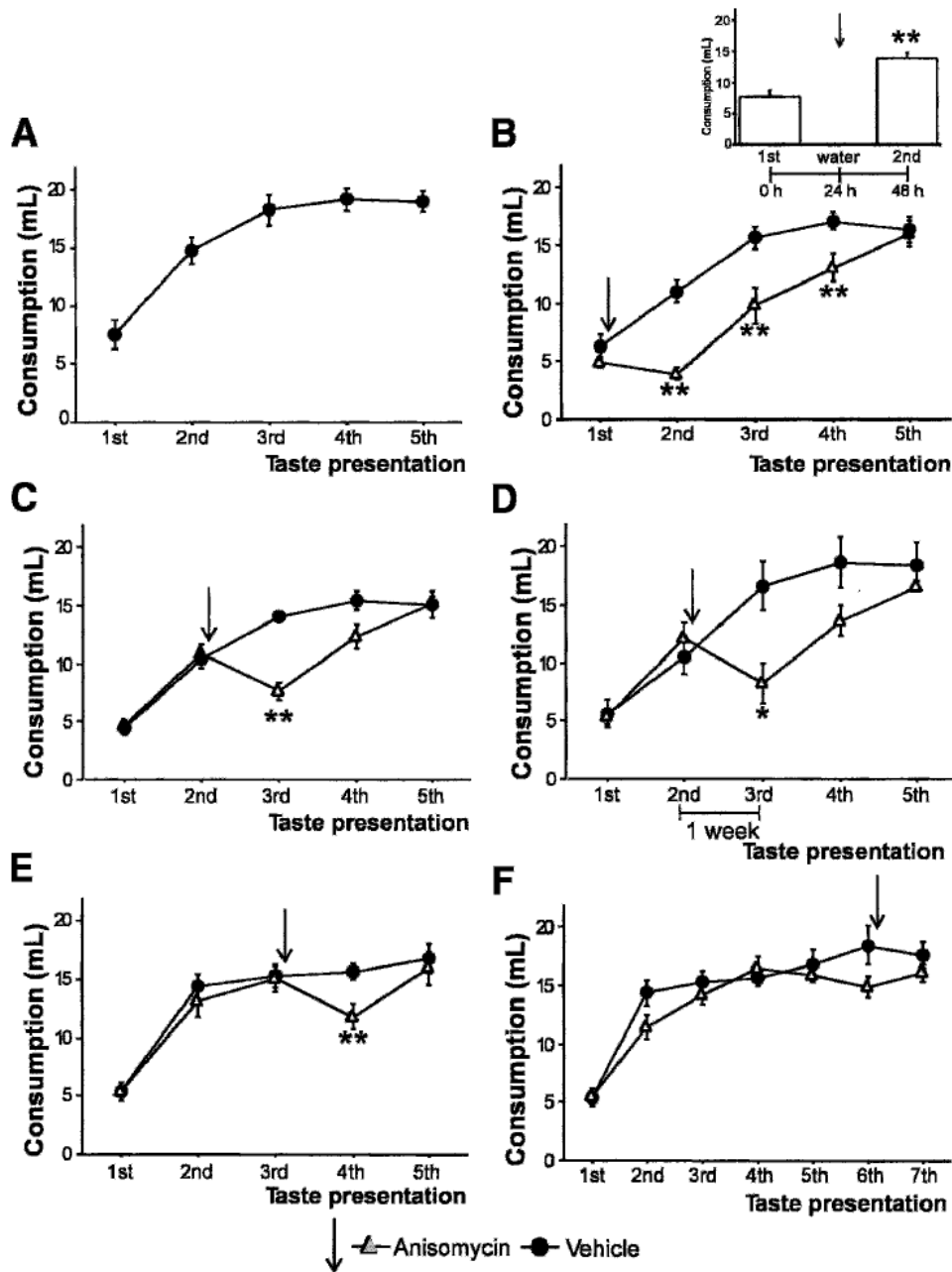


Figura 3: Comportamiento típico de la curva de AN y efecto que tiene la inhibición de la síntesis proteica en esta tarea. (A) Promedio \pm E.E.M. del consumo (en mL) de sacarina 0.3% en ratas intactas. (B) La infusión de anisomicina inmediatamente después del primer consumo pero no 24h más tarde impidió la consolidación de la memoria de reconocimiento al sabor. (C, D) La infusión de anisomicina después de la segunda ingesta afecta parcialmente la AN previamente consolidada, aún si la tercera presentación es retrasada de una semana. (E) Infusiones de anisomicina después del tercer consumo afectó la última consolidación de la AN. (F) Infusiones de anisomicina después de la sexta presentación del sabor no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento subsecuente de la curva de AN. (Círculos sólidos) Vehículo; (triángulos abiertos) anisomicina. Las flechas indican infusión del fármaco. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ entre los grupos que recibieron anisomicina y los grupos vehículo correspondientes. (Adaptado de Rodríguez-Ortiz et al., 2005).

neuronal basada en la expresión de GEI con resolución temporal (CatFISH) en el CAS, mostró que neuronas de la amígdala basolateral, pero no de la CI, podían integrar la información del estímulo condicionado (sabor) con la del estímulo incondicionado (malestar gástrico) (Barot et al. 2008). En el estudio presente, nos enfocamos en ayudar a elucidar los mecanismos plásticos que ocurren durante la AN, es decir, durante la familiarización con un sabor que no es apareado con una consecuencia de malestar gástrico (sabor seguro).

A grandes rasgos, la información gustativa viaja desde la boca vía el nervio intermedio (que inerva la parte anterior de la lengua) y el glossofaríngeo (que inerva el resto de la boca) (Brodal, 2004). Estas fibras hacen sinapsis en el núcleo del tracto solitario (NTS). En la rata, las neuronas del NTS mandan aferencias al núcleo parabraquial del puente troncoencefálico, que a su vez proyecta hacia la parte parvocelular de núcleo talámico ventroposteromedial. Estas neuronas parvocelulares o “células-P” sirven de relevo para llegar a la *ínsula*, conocida como “corteza insular” en ratas. En los primates, la información viaja directamente del NTS hacia el tálamo, vía el haz tegmental central, sin hacer sinapsis en el núcleo parabraquial (Simon et al. 2006). Estudios neuroanatómicos y electrofisiológicos identificaron la parte disgranular de la CI como corteza gustativa primaria (Kosar et al., 1986a, 1986b). Luego, experimentos con imagenología intrínseca *in vivo* mostraron que al igual que en el humano (Flynn 1999; Brodal 2003), la parte anterior de la corteza insular responde de manera más robusta a las modalidades gustativas (Accolla et al. 2007). Ahí, se ha observado con electrofisiología que las neuronas de las capas IV/V son las que mejor responden ante la estimulación con

un sabor (Yamamoto et al. 1989). Un estudio más reciente, usando mapeo de actividad neuronal con GEI (Arc en este caso), mostró además que la parte anterior de la CI disgranular contiene unidades que integran y almacenan información relacionada al sabor (Saddoris et al. 2009). En este mismo estudio encontraron que el mismo porcentaje de neuronas (~25%) expresaban *Arc* cuando se presentaba un estímulo gustativo apetitivo (sacarosa) por primera o segunda ocasión. Este dato concordaba con un estudio anterior de mapeo de actividad neuronal con GEIs (*Arc* y *c-fos*), en el cual no observaron diferencias en el número de unidades activadas por la sacarina presentada por primera o por séptima vez (Montag-Sallaz et al. 1999).

Al igual que lo que sucede en otras modalidades sensoriales (Feldman 2009), evidencia reciente apunta a que las representaciones sensoriales en la corteza gustativa primaria (en la CI) pueden ser modificadas por la experiencia (Accolla & Carleton 2008). En un estudio anterior (Accolla et al. 2007), este grupo observó con imagenología intrínseca que distintas áreas de la CI se activaban con sabores distintos. Vieron que la sacarosa producía mayor actividad que la quinina en la CI y que la actividad inducida por el estímulo dulce se encontraba anterior a la arteria cerebro-medial, mientras la quinina inducía mayor actividad en la región de la CI que se encuentra posterior a dicha arteria. Interesantemente, al volver aversiva la sacarosa con inducción de CAS, la región activada al evocar la sacarosa cambiaba de lugar hasta traslaparse con la región que representa la quinina, sugiriendo que la sacarosa aversiva adquiriría un valor hedónico semejante a la quinina, lo que explicaría el traslape de la representación cerebral de la

sacarosa condicionada y de la quinina. Además, al extinguir el CAS, la representación de la sacaros regresaba al lugar donde se encontraba previamente al condicionamiento (Accolla & Carleton 2008). Estos datos produjeron fuerte evidencia a favor de que las representaciones cerebrales de los estímulos gustativos en la CI son altamente plásticas y que la CI parece ser mejor para discriminar el valor hedónico de los estímulos gustativos que los estímulos *per se*. Por otro lado, usando registros unitarios en la CI, otro grupo mostró que la tasa de disparo promedio de las neuronas de la CI era mayor cuando el sabor presentado era familiar que cuando era novedoso (Bahar et al. 2004). Este aumento se observó únicamente en la fase tardía (entre 2 y 7 segundos post respuesta) que interesantemente había sido sugerida por estudios anteriores (Katz et al. 2001) como responsable de la apreciación del valor hedónico de los estímulos gustativos, aunque la fase tardía analizada en este último estudio fue distinta (1.5-2.5 segundos).

Problema de investigación y alcance del proyecto

En este estudio, con el fin de ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos plásticos que suceden en la corteza en consecuencia de la formación de la memoria de reconocimiento al sabor, nos propusimos analizar la expresión de la proteína Arc en la CI durante el proceso de AN tomando en cuenta 1) la cantidad total de proteína expresada después de estímulos gustativos con distintos grados de familiaridad, 2) la proporción de neuronas que expresan la proteína en dichas condiciones y 3) la compartimentalización de dicha expresión, es decir, la cantidad de Arc detectada en las dendritas en las diferentes

condiciones. Este tercero y último punto, fue con el fin de observar si una tarea sencilla puede modular los niveles de la proteína Arc para así ver si al igual que se ha reportado con distintos modelos (Steward et al. 1998; Steward & Worley 2001; Waung et al. 2008), dicho fenómeno sucede normalmente, en condiciones fisiológicas. Además, la mayoría de los estudios que relacionaban la proteína Arc con la conducta, hasta la fecha se habían realizado en el hipocampo. El hecho de que la AN dependa de la CI permitió brindar más información acerca de cómo la conducta afecta los niveles de Arc en áreas corticales.

Hipótesis

La plasticidad en la CI es esencial para la formación de la AN, la cual es dependiente de síntesis proteica en esta región. Por lo tanto, a través del proceso de familiarización a un sabor (AN), se deberían de observar cambios en la expresión de Arc en la CI, tanto a niveles global como subcelular.

Objetivos

1. Comparar los niveles de Arc en estructuras relevantes para el aprendizaje gustativo seguro, que son el HD y la CI a través del proceso de familiarización con un sabor.
2. Determinar la proporción de neuronas que expresan la proteína Arc en la CI después de la presentación de un estímulo novedoso y uno familiar.

3. Determinar si cambia la acumulación dendrítica de Arc en la CI a través del proceso de familiarización con un sabor.

Materiales y Métodos

Procedimientos conductuales:

Curva de AN

Ratas Wistar adultas jóvenes de 270-300g fueron colocadas en jaulas individuales y privadas de agua *hasta el día siguiente*. Después, se les dio agua durante 15 minutos en la mañana y en la tarde, en un bebedero graduado y lo mismo fue hecho durante cuatro días consecutivos. Se midió el promedio del volumen de agua consumido en la sesión matutina para los últimos 3 días. Después, en el día seis, la ración de agua matutina fue sustituida con una solución de sacarina al 0.5%. Se siguió administrando la misma solución durante una semana después de lo cual se sacrificó a los animales. Se midió el volumen consumido por las ratas en el turno matutino para cada día y se analizaron los datos con una ANOVA de medidas repetidas.

AN e IL con volumen restringido

Para determinar si la restricción del volumen de sabor (a 5 mL) afecta la AN, se realizó un experimento de AN en el cual las pre-exposiciones al sabor fueron restringidas a 5mL. Cuatro grupos fueron incluidos en este análisis: 0 pre-exposición (S1), 1 pre-exposición (S2), 4 pre-exposiciones (S5) y 6 pre-exposiciones (S7). Los resultados fueron analizados con una ANOVA de una vía,

ya que en esta variante de la AN, estamos en presencia de grupos independientes. Para el experimento de inhibición latente, se realizaron 0 (S1), 1(S2), 4(S5) o 6(S7) antes de realizar CAS con una presentación de sacarina al 0.5%, seguida 30 minutos después de una inyección intraperitoneal de LiCl 0.15M. Al día siguiente se volvió a presentar la sacarina y para la medición de la evocación del CAS, los volúmenes ingeridos fueron registrados. De igual manera, los datos se analizaron con una ANOVA de una vía; aquí también estamos en presencia de grupos independientes.

Procedimientos conductuales para los experimentos evaluando la expresión de Arc

Se realizaron dos sesiones de acceso al líquido diarias, mañana y tarde de 15 min cada una, la sacarina, donde indicado, siempre fue administrada en el turno matutino. La sesión de la mañana fue restringida a 5mL y la de la tarde no fue restringida. Durante los primeros 5 días los animales tomaron únicamente agua con el fin de acostumbrarlos al horario de consumo. Las ratas fueron separadas en 3 grupos: N, F2 y F5. El grupo N recibió agua del día 6 al día 9 y sacarina el día 10. El grupo F2 recibió agua del día 6 a 8 y sacarina los días 9 y 10. El grupo F5 recibió sacarina del día 6 al 10. Todos los animales fueron sacrificados una hora después del inicio del consumo de sacarina del día 10 y procesados para inmunoblot o Inmunohistoquímica.

Procedimientos conductuales para los experimentos con microinyecciones de anisomicina en el hipocampo dorsal (HD)

Los animales para este experimento fueron divididos en 3 grupos. Un primer grupo recibió anisomicina o vehículo después del quinto día de la línea basal de agua. Un segundo grupo recibió anisomicina o vehículo justo después de la presentación de sacarina novedosa. Un tercer grupo recibió anisomicina o vehículo después de la ingestión de sacarina presentada por quinta vez. En el día después de la inyección los animales fueron presentados con sacarina. Una hora después se sacrificaron, las CI fueron removidas y procesadas para inmunoblot.

Inmunoblot

Ratas Wistar adultas jóvenes de 270-300g fueron usadas para este experimento. Los animales fueron decapitados 1h después del inicio del consumo y las CI de cada hemisferio fueron removidas y homogenizadas. Los homogenados fueron centrifugados durante 10 minutos a 1500 g a 4°C y congeladas a -80°C hasta su uso. Las proteínas fueron cuantificadas usando el método de Lowry y se cargaron 10µg/pozo en un gel de poliacrilamida al 10%. Las muestras fueron corridas durante 65 minutos a 120 voltios con corriente constante a temperatura ambiente. Después fueron transferidas electroforéticamente a una membrana Immobilon-P (Bio-Rad) durante 40 minutos a 25 voltios en una cámara semi-seca. Las membranas fueron enjuagadas rápidamente con TBST e incubadas *overnight* a 4°C en TBST con albúmina sérica de bovino (BSA) al 5%. Al día siguiente fueron incubadas con Rabbit affinity purified anti-Arc (Synaptic Systems) 1:500 y 5% de BSA en TBST durante 90 minutos, a temperatura ambiente. Después, las membranas fueron enjuagadas 4 veces durante 7 minutos con TBST y se incubaron con *HRP-goat-anti-rabbit* (Invitrogen) al 1:10

000 durante 1h. Posteriormente se enjuagaron durante 7 minutos 5 veces y se incubaron en *mouse-anti-GAPDH* (Chemicon) durante 1h, se enjuagaron 4 veces por 7 minutos y se incubaron en *HRP-goat-anti-mouse* (Zymed). Después de otros cinco enjuagues de 7 minutos cada uno, la reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo con el kit de PierceScientific, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las membranas fueron fotografiadas con placas Kodak® las cuales fueron escaneadas y analizadas con el *software* ImageJ 1.38. Los datos están expresados como la densidad óptica integrada (DOI) de Arc dividida por la DOI de GAPDH.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Ratas Wistar adultas jóvenes de 270-300g fueron usadas para este experimento. Una hora después del inicio del consumo de la solución de sacarina, se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico y fueron perfundidas brevemente con solución salina 0.9% antes de cambiar la solución a paraformaldehído 4% en PB 0.1M. Los cerebros fueron disecados y crioprotegidos en gradientes de sacarosa en PBS. Anterior a la disección de las áreas de interés, se elaboró un esquema especificando la posición de cada uno de los tejidos en la laminilla representado cada uno una condición conductual distinta. Secciones de 25µm ubicadas entre 1 y 1.4 mm anterior a Bregma según un atlas de cerebro de rata (Paxinos & Watson 2007), fueron cortadas con un micrótopo, colectadas en PBS y procesados para la inmunotinción.

Brevemente, se lavaron los cortes flotando libremente en pozos y fueron tratados con NaBH_4 1% en PBS. Después de ser enjuagados 4 veces durante 8 minutos, se incubaron una hora en PBS con tritón 0.3% (PBSt) y BSA 5%. Sin enjuagarse, los cortes fueron cambiados a una solución al 1% BSA en PBSt conteniendo suero anti-Arc al 1:1000 (obsequio generoso del Dr. Paul Worley) y monoclonal *Mouse-anti-MAP-2* IgG 1:500 (Chemicon) y se incubaron 40 horas a 4°C. Las secciones fueron lavadas con PBSt e incubadas una hora a temperatura ambiente con *Alexa 594-goat-anti-rabbit* 1:500 y *FITC-goat-anti-mouse* 1:500. Finalmente se realizó una contra tinción con DAPI 300 nM en PBS durante 10 minutos seguida de 3 lavados con PBS después de los cuales fueron montados en laminillas con VectaShield (Vector Laboratories) y selladas con barniz de uñas.

Obtención y análisis de imágenes

Se hizo la captura de imágenes con microscopía confocal Zeiss 510 META equipado con un láser *Chameleon* (Coherent) a 750 nm, un láser HeNe a 561 nm y un láser Argón a 488 nm. Se obtuvieron secciones en Z de 0.55 μm de grosor, usando un objetivo de 40X (con *zoom* de 1.0) inmerso en aceite y manteniendo los parámetros estables entre cada condición en un mismo grupo (Hibbs 2004). Se aplicó el filtro “median” con radio de 1 pixel con fin de resaltar más adecuadamente las regiones de interés ej. somas y dendritas y tal como recomendado para el análisis de colocación en imágenes confocales gruesas (>20 μm) (Landmann & Marbet 2004). Por cada *stack* de imágenes en z, se determinó el número de núcleos completos que representan neuronas, preniendo únicamente el canal de DAPI. Los núcleos de neuronas tienen un patrón de tinción

distinto y pueden así diferenciarse de las células gliales (Vazdarjanova & Guzowski 2004). Sólo los núcleos correspondiendo a neuronas fueron incluidos en el análisis y se calculó la tasa de las neuronas que expresan Arc sobre el número total de neuronas calculadas según criterios previamente descritos (Ramirez-Amaya et al. 2005).

Para el análisis de la colocalización entre Arc y MAP-2, se midió el área de colocalización de cada proyección en z de los campos inmunoreactivos a Arc y MAP-2. Además, se obtuvo el coeficiente M_1 de las proyecciones para los canales de Arc+MAP-2. Se comparó también el área total de inmunoreactividad a MAP-2 entre las dos condiciones como control. Todos los análisis se realizaron con el *software* ImageJ del *National Institute of Health of the U.S.A.*

Para el análisis de la intensidad integrada (II), se seleccionaron los somas inmunoreactivos a Arc y se obtuvo la II, la cual representa el producto de la media de la intensidad de la señal en cada soma (en una escala de grises de 0 a 255) multiplicado por el área total del soma, con el *software* ImageJ. Un total de 307 neuronas fueron incluidas en el análisis para la condición N y 268 para la condición F (equivalente a la condición F5 de los experimentos de inmunoblot).

Procedimientos quirúrgicos

Para los experimentos de microinyección de anisomicina, las ratas fueron anestesiadas profundamente con ketamina: xylazina (22:2.6 mg/rata) y montadas sobre un aparato estereotáxico. Las cánulas fueron implantadas en el hipocampo dorsal siguiendo las siguientes coordenadas: P. 3.6, Lat. ± 3 , V. 1.3 mm a partir de

bregma siguiendo un atlas de rata (Paxinos and Watson 2007). Dos tornillos de 5-mm fueron fijados en el cráneo con cemento dental de acrílico para ayudar a la estabilización de las cánulas. Posteriormente los animales recuperaron durante un mínimo de una semana antes del inicio de los procedimientos conductuales. En el día de la inyección las puntas de los inyectores fueron colocados 2 mm abajo de la extremidad inferior de la cánula. 1 μ L de solución de anisomicina (120 μ g/ μ L en ACSF-HCl) o vehículo (ACSF-HCl sólo) fue inyectado en cada hemisferio a una velocidad de 1 μ L/min. Las ratas fueron manipuladas una vez al día durante 3 días precediendo el día de la inyección para minimizar el estrés.

Estadística

Todos los análisis se realizaron con el *software* StatView. Se realizaron pruebas de *Barlett* para probar la homogeneidad de varianzas entre grupos. Posteriormente se realizaron pruebas de ANOVA factoriales de una vía usando el test post hoc de Fisher y pruebas de *t* no pareadas considerado en ambos casos el umbral de significancia como $p < 0.05$. El análisis de la intensidad integrada no tenía distribución normal de los datos en una de las condiciones (F) por lo tanto, se compararon los grupos con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El experimento de AN sin restricción de volumen fue analizado con una ANOVA con medidas repetidas.

Resultados

Se analizó la curva de AN con una solución de sacarina del 0.5%. Tal como se esperaba, se observó una disminución drástica en el volumen consumido

cuando la solución de sacarina fue presentada por primera vez (Fig. 4A). El volumen consumido se vio aumentado en los días siguientes y se observó un aumento significativo en el volumen consumido con respecto a la línea base a partir del día 4, sugiriendo que a partir de este día, el valor hedónico de la sacarina superaba el del agua. Posteriormente, no se observaron diferencias significativas en el volumen consumido así que asumimos que en la quinta presentación, el sabor ya estaba familiarizado (Fig. 4A). Quisimos ver después si el restringir el volumen de solución consumido (manipulación esencial para la realización de los experimentos bioquímicos que se reportan posteriormente) afecta el desempeño de la tarea de AN. Establecimos los cuatro grupos siguientes: S1: sacarina novedosa, S2: sacarina dos días consecutivos, S5: sacarina 5 días consecutivos y S7: sacarina 7 días consecutivos. En cada caso, el último consumo de sacarina fue sin restringir y los consumos previos fueron restringidos a 5mL. Razonamos que si la restricción del volumen afecta la familiarización con el sabor, se debería de observar una diferencia en el volumen consumido entre los grupos S5 y S7, aunque no se observa dicha diferencia en la curva sin restricción (Fig. 4A). Sin embargo, los datos muestran un aumento en el volumen consumido entre S1 y S2 y un mayor aumento en S5 pero no mayor aumento en S7, indicando que restringir el volumen consumido a 5mL en las pre-exposiciones no afectaba el desempeño de la AN (Fig. 4B). Para corroborar que dicha restricción no afectaba la familiarización con el sabor, usamos la tarea de IL que se define como la atenuación de un aprendizaje (asociativo) cuando el estímulo (condicionado) es familiar versus cuando es novedoso (Roman et al. 2009). En el caso particular del aprendizaje gustativo, el protocolo de IL "cuantifica la familiaridad en términos del

efecto decremental de la(s) pre-exposición(es) sobre la habilidad de un sabor para entrar en asociación en un subsecuente condicionamiento aversivo al mismo sabor” (Bahar et al. 2004). Los datos obtenidos con la tarea de IL muestran que una sola pre-exposición no es suficiente para inducir IL (Fig. 4C, comparar S1 y S2), pero que cuatro pre exposiciones (S5) inducen una fuerte IL que comparable a la inducida por seis pre exposiciones (S7) (Fig. 4C). Estos datos muestran que la restricción del volumen no tiene un efecto significativo sobre la familiarización con un sabor seguro.

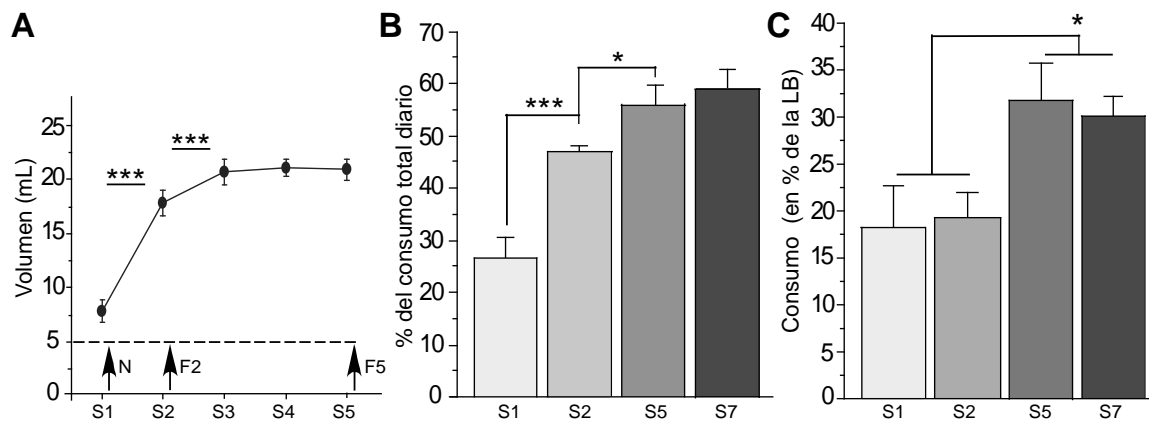


Figura 4: (A) Curva de AN con sacarina 0.5% en mL. Flechas: condiciones en las que se evaluó la expresión de Arc en los experimentos posteriores. (B) Experimento de AN con pre-exposiciones restringidas (C) Experimento de IL con pre-exposiciones restringidas. Nótese que no se observan diferencias en el nivel de IL de S5 versus S7. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.

Asimismo, para determinar los niveles de expresión de Arc en la CI a través del proceso de familiarización con el sabor, escogimos los tiempos siguientes: un grupo con sacarina novedosa, correspondiente a S1 en la gráfica anterior y que será denominado “N” por “novedoso”, un grupo de evocación del sabor seguro, correspondiente a S2 en la gráfica anterior y que será denominado “F2” por

“familiar, 2 días” y finalmente, un grupo consumiendo un sabor familiarizado, para el cual ya no suceden más atenuaciones que denominaremos “F5” por “familiar, 5 días” y que corresponde a S5 en la gráfica anterior (ver Fig. 4A, flechas). Para cuantificar los niveles de expresión de Arc en cada condición, mantuvimos el volumen consumido a 5 ml para cada condición (Fig. 4A, línea horizontal discontinua). Con el objetivo de determinar el tiempo requerido para poder observar un aumento en los niveles de Arc inducido por la ingestión de un fluido, presentamos sacarina novedosa a tres grupos de animales que fueron sacrificados 30, 60 o 240 minutos después del inicio de la ingesta de fluido. Un grupo control, consistiendo en animales privados según el mismo protocolo (ver materiales y métodos), pero que fueron sacrificados al salir de su caja sin que tomaran líquido, también fue incluido para obtener los niveles basales de Arc. El análisis de ANOVA reveló diferencias significativas entre grupos ($F_{(3, 21)} = 3.429$, $p < 0.05$). El análisis post-hoc de Fisher mostró que el grupo sacrificado a los 60 min tenía mayores niveles de Arc que todos los demás grupos ($p < 0.05$) indicando que la sacarina novedosa induce expresión de Arc en la CI a los 60 min (Fig. 5A, gráfica insertada). Por lo tanto en los experimentos siguientes, la expresión de Arc fue evaluada a los 60 min después de la primera (N), segunda (F2), o quinta (F5) presentación de sacarina. Otro grupo, que consistió de animales que tomaron sólo agua (A) también fue incluido. El análisis de ANOVA reveló diferencias entre grupos ($F_{(2, 15)} = 9.075$, $p < 0.001$). La prueba post-hoc de Fisher reveló niveles de Arc significativamente superiores en F2 versus Agua y N (p 's < 0.05). Además, los niveles de Arc en la condición F5 también fueron significativamente superiores a los de N y Agua (p 's < 0.01), pero la diferencia entre F2 y F5 no alcanzó

significancia ($p=0.16$), indicando que el aumento en los niveles de Arc visto en la condición familiar (F2) se mantiene con subsecuentes presentaciones del sabor (Fig. 5A, B).

Para determinar la especificidad anatómica del fenómeno previamente reportado, quisimos examinar cómo se comportan los niveles de Arc durante la AN en otra estructura importante para la formación de la memoria al sabor seguro. Estudios previos han mostrado que el HD tiene un papel importante en la formación de la memoria al sabor seguro [Molero et al. 2005; Yefet et al. 2006; De la Cruz et al. 2008 (Fig. 6)]. Por lo tanto quisimos ver si al igual que lo que pasa en la CI, los niveles de Arc se veían afectados por la tarea de AN. Notablemente, los niveles de Arc en el HD en las condiciones N y F5 no eran diferentes a los niveles basales ($F_{(2,13)}=0.414$, $p=0.67$), sugiriendo que mecanismos distintos suceden en esta estructura para la formación de la AN (ver Fig. 5C, D).

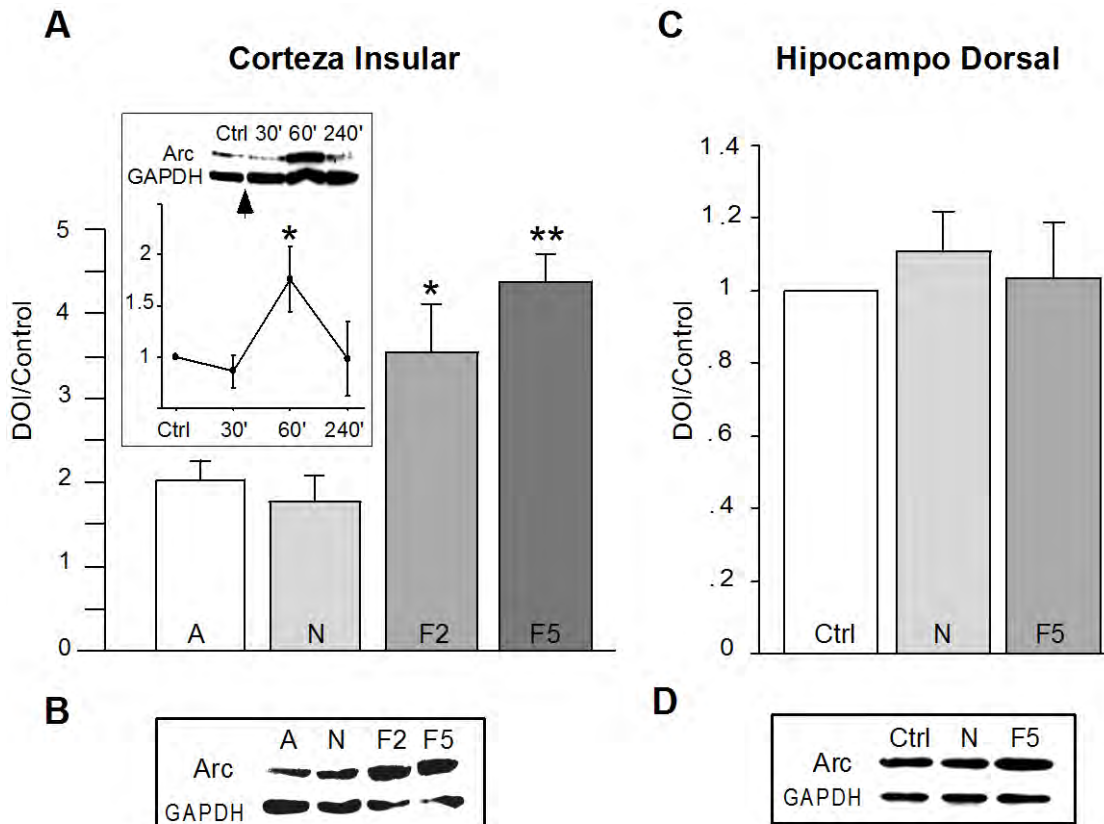


Figura 5: Comparación de la expresión de Arc en la CI (A, B) y en el hipocampo dorsal (C, D) a través del proceso de familiarización con sacarina. A: Agua, N: Sacarina novedosa, F2 y F5 segunda y quinta presentación de sacarina, respectivamente, Ctrl: animales controles. Inserto: curso temporal de la expresión de Arc en la CI después de la ingesta de sacarina novedosa (N). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. En todos los casos, los datos están expresados como densidad óptica integrada dividida/controles.

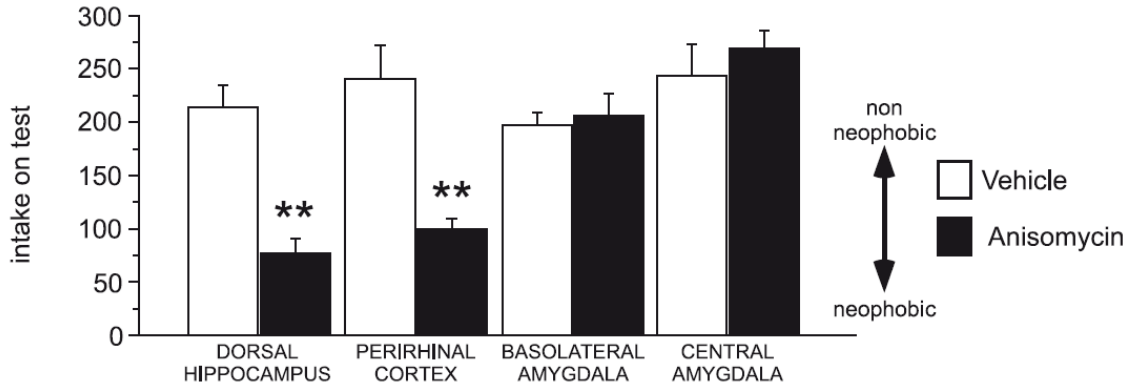


Figura 6: Porcentaje de consumo de sacarina en la segunda presentación para ratas a las que se les realizó microinyecciones de anisomicina/vehículo en diferentes estructuras inmediatamente después de la primera presentación de sacarina (el día anterior). **: $p < 0.01$. (Adaptado de De la Cruz et al., 2008).

Sin embargo, como la síntesis proteica en el HD es esencial para la formación de la AN (De la Cruz et al. 2008), deducimos que este tratamiento debería de atenuar el incremento de Arc en la CI que observamos en la condición F2 comparado con N. En efecto, si el incremento de Arc en la condición F2 es dependiente del establecimiento previo de un trazo mnémico, lo deberíamos de poder afectar por un tratamiento que inhibe la formación de dicho trazo. Efectivamente pues, cuando se compararon los niveles de Arc en la CI después de F2 en animales que fueron inyectados con anisomicina justo después de N, se observaron niveles inferiores en comparación de los animales inyectados con vehículo ($t_{(12)} = 2.263$, $p < 0.05$). Esto sugiere que la síntesis proteica en el HD después de la presentación de un sabor nuevo es esencial para que se lleve a cabo el fenómeno reportado. Además, la inyección de anisomicina 24h antes de N o después de F5 no afectó los niveles de Arc en la corteza observados después de la presentación de sacarina al día siguiente ($t_{(8)} = 0.003$, $p = 0.987$ y $t_{(8)} = 1.077$,

$p=0.313$ respectivamente), apuntando que el efecto de la anisomicina se debía a la inhibición de la formación de la memoria gustativa (Fig. 7). Más bien estos datos fortalecen el dato anterior mostrando que la expresión óptima de Arc en la CI inducida por el sabor es dependiente de una familiarización previa con este mismo sabor, la cual a su vez depende de fenómenos plásticos en el hipocampo.

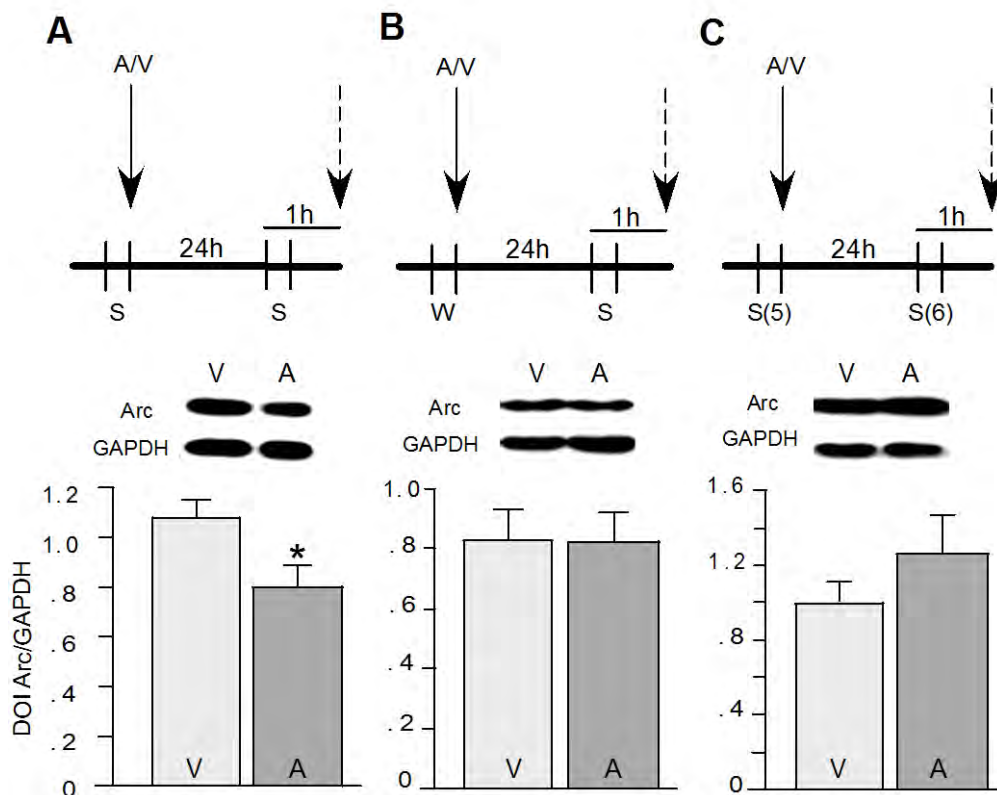


Figura 7: (A) Inyecciones intra-hipocampales bilaterales de anisomicina 24h antes de S1 no afecta los niveles de Arc en la CI inducidos por S1 (B) Cuando se inyecta la anisomicina después de S1, un tratamiento conocido por inhibir la formación de la AN, menos Arc es detectado en la CI a comparación del grupo vehículo (C) Las inyecciones de anisomicina después de S5 no afectaron los niveles de Arc inducidos por la sacarina presentada al día siguiente. A: Anisomicina. V: Vehículo, W: Agua, * $p < 0.05 \geq 5$ en cada grupo. Arriba: representación esquemática de los procedimientos conductuales, las flechas punteadas representan el momento del sacrificio después del cual las CI fueron procesadas para el análisis con inmunoblot.

Posteriormente examinamos las características de la expresión de Arc en la CI después de la presentación del estímulo gustativo familiar o novedoso a nivel subcelular. Para ello, usamos inmunohistoquímica doble vs. Arc y MAP-2 con contra-tinción nuclear con DAPI para comparar (1) la proporción de neuronas expresando Arc y (2) los niveles de expresión dendrítica de Arc en ambas condiciones. Como la diferencia más dramática que detectamos en los experimentos de inmunoblot fue entre N y F5 (que llamaremos simplemente “F” de ahora en adelante), nos enfocamos en estas dos condiciones para el análisis inmunohistoquímico. Además, guiados por estudios de neuroanatomía funcional discutidos en la introducción (ver p.16), nos enfocamos en las capas internas de la CI disgranular anterior para este análisis. La Figura 8 muestra un ejemplo de rebanada de cerebro que fue usada en el presente estudio. Para el primer análisis, un promedio de 263 ± 44 neuronas por animal ($n=5$) para la condición N y de 288 ± 38 neuronas por animal ($n=5$) para la condición F fueron analizadas. Adicionalmente otro grupo sin estimulación gustativa se añadió como control (244 ± 42 neuronas por animal, $n=5$). La comparación de la proporción de neuronas expresando Arc reveló que en promedio, 22.28% de las neuronas eran Arc+ en N, 20.67% para F y 7.52% para el grupo control. Ninguna diferencia fue detectada entre las dos condiciones experimentales ($t_{(8)}=0.96$, $p=0.37$), sugiriendo que un estímulo novedoso activa la misma proporción de neuronas que un estímulo familiar (Fig. 9 C). Sin embargo, el área de colocación entre Arc y MAP-2 era significativamente mayor en la condición F ($t_{(8)}= 4.08$, $p<0.01$), indicando que un sabor familiar induce mayor expresión dendrítica de Arc en la CI (Fig. 9 D). Nótese que el área de inmunoreactividad a MAP-2 permanece igual entre ambas

condiciones ($t_{(8)} = 0.38$, $p > 0.71$) (Fig. 9 E). Finalmente usamos el índice de colocalización de Manders' M_1 (ver Materiales y Métodos) para confirmar que la diferencia de área de colocalización entre las dos condiciones se debía a una mayor expresión dendrítica y no a un aumento global e inespecífico de los niveles de Arc en toda el área analizada. Tal como esperado, el promedio de los coeficientes M_1 eran significativamente superiores en F ($t_{(8)} = 3.09$, $p < 0.05$) mostrando que en la condición familiar, una mayor *proporción* de la proteína Arc presente en la CI se encuentra en la dendrita (Fig. 9 F).

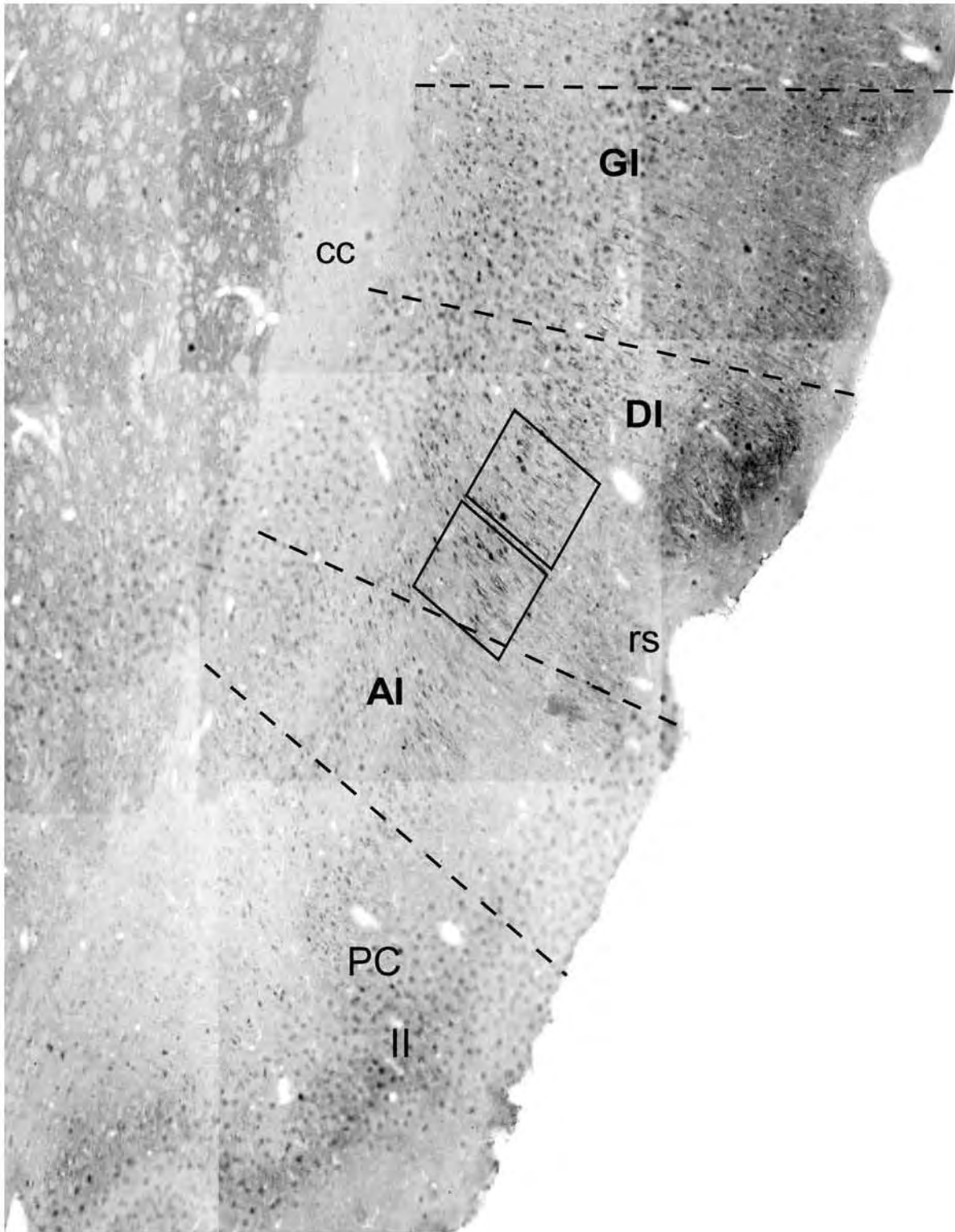


Figura 8: Mosaico de una rebanada de cerebro (~Bregma +1.7 mm AP) que fue usada para el análisis. Para fines de claridad, únicamente el canal de Arc es tá r epresentado. Los cuadros representan las zonas de la CI que fueron capturadas. GI: corteza insular granular. DI: corteza insular disgranular, AI: corteza insular agranular, PC: corteza perirhinal, II: capa II de la corteza perirhinal, rs: surco rhinal, cc: cuerpo calloso.

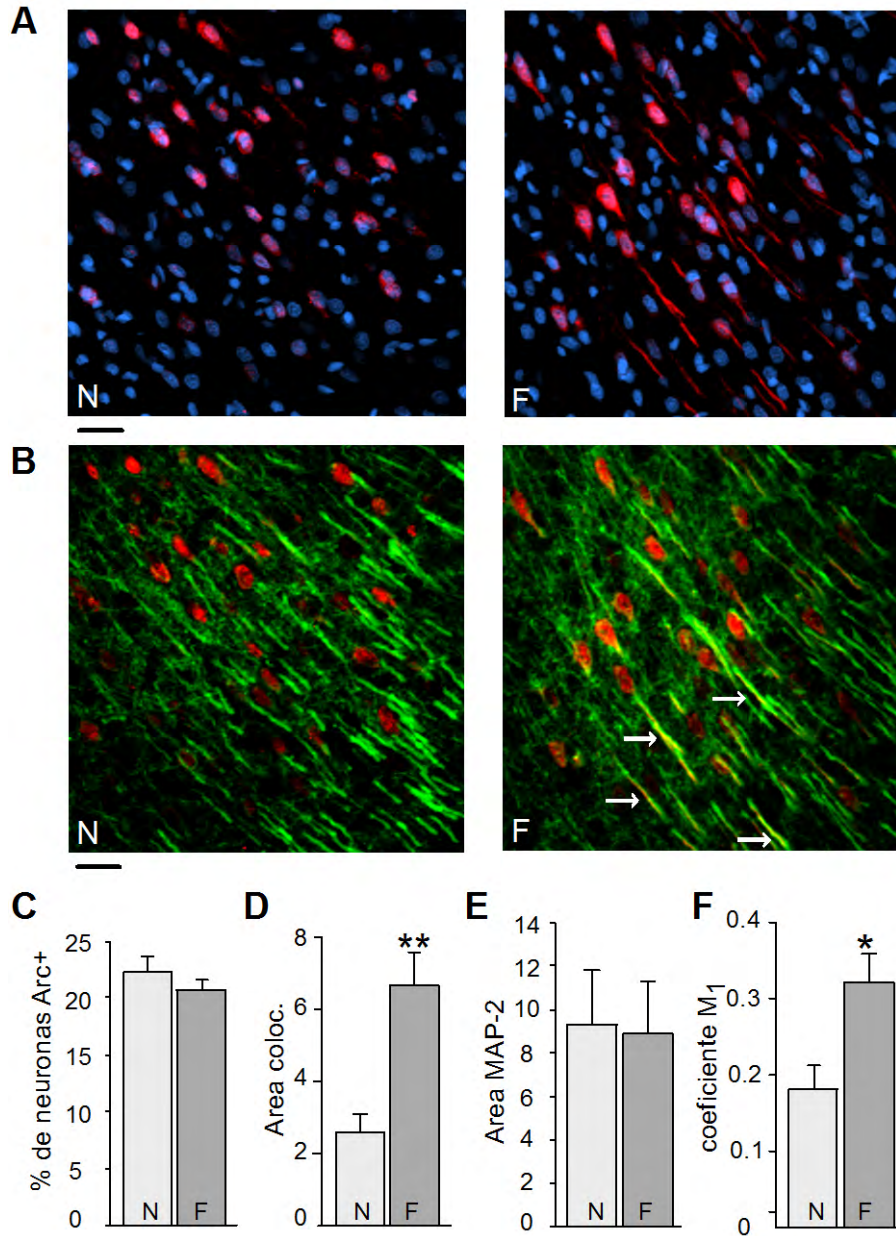


Figura 9: Colocalización entre Arc y MAP-2. (A, B) Imágenes representativas mostrando la expresión de Arc posterior a la presentación de un estímulo gustativo novedoso (N) o familiar (F). Azul: DAPI, Rojo: Arc, Verde MAP-2. Las regiones donde se observa colocalización entre Arc y MAP-2 aparecen en amarillo. Las flechas indican algunas dendritas donde se observa esta colocalización. (C) % de células expresando la proteína Arc por condición **: $p < 0.01$. (D) Área en pixeles^2 de colocalización entre Arc y MAP-2 **: $p < 0.01$. (E) Área inmunoreactiva a MAP-2 (F) coeficiente de correlación de Manders M_1 , *: $p < 0.05$. $n = 6$ animales por condición en todos los análisis.

Se ha reportado que el transporte del mRNA de Arc en las dendritas puede ser regulado (Steward et al. 1998; Steward & Worley 2001; Kobayashi et al. 2005; Dynes & Steward 2007; Huang et al. 2007; Gao et al. 2008). Nuestros datos indican que la misma proporción de células expresan Arc en las condiciones N y F (Fig. 9 A, C) y que una mayor proporción de la inmunoreactividad global de Arc se encuentra en la dendrita (Fig. 9 B, F). Estos datos juntos con nuestros datos de inmunoblot que muestran aumentos globales de la proteína Arc en la CI (Fig. 5 A,B) sugieren que lo que cambia en la condición familiar es la cantidad de Arc en la dendrita. Sin embargo, no podemos descartar que en la condición F, algunas de las células que expresan Arc sufrieron un mecanismo de transporte regulado hacia la dendrita. En este escenario, las células activadas en ambas condiciones expresarían más o menos la misma cantidad de mRNA, pero en la condición familiar, parte de estos transcritos habrían sido transportados activamente hacia la dendrita. Esto debería resultar en una disminución en la inmunoreactividad somática en la condición familiar. Para probar esta hipótesis, medimos la intensidad integrada de la tinción somática de Arc en las proyecciones de planos en z usadas en el análisis anterior. Nuestro criterio de inclusión para este análisis fue sencillamente el ser un soma que fue seleccionado como perteneciendo a una célula inmunoreactiva a Arc en el análisis anterior sobre el porcentaje de neuronas expresando Arc (Fig. 9 A, C). El análisis de la II desde un punto de vista cualitativo mostró distribuciones de frecuencia con un ligero sesgo a la derecha para los somas de la condición N. No obstante, a grandes rasgos, se observa un alto nivel de solapamiento entre las dos condiciones (Fig. 10). Esta apreciación fue confirmada por el análisis estadístico que reveló una muy ligera tendencia a

mayores IIs para la condición N que no alcanzó la significancia ($p=0.103$). Este resultado sugiere que en F se observan mayores niveles dendríticos de Arc que en N, sin que cambien los niveles somáticos. También, apoya a lo que encontramos con el inmunoblot, es decir que aumenta la cantidad total de Arc en F versus N.

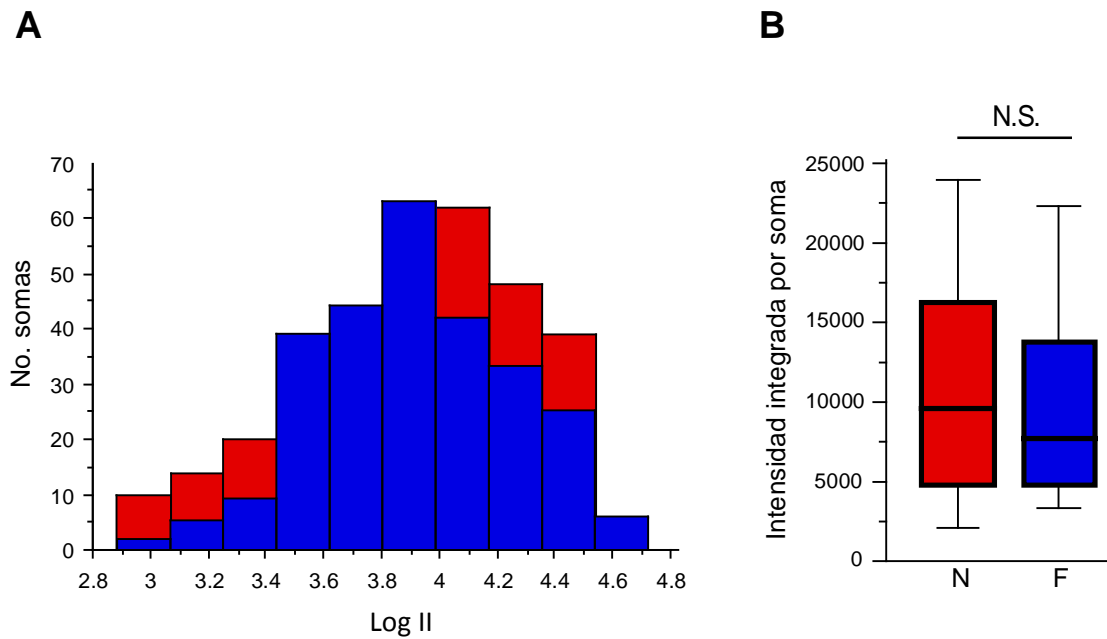


Figura 10: Análisis de la II de la expresión somática de la proteína Arc. (A) Análisis de distribución de frecuencia de la II de los somas que fueron incluidos en el análisis como inmunoreactivos a Arc. Rojo: sabor novedoso. Azul: sabor familiar. Se puede observar que la distribución es muy similar entre las dos condiciones. (B) Box Plot representando la distribución de los valores. N: sabor novedoso. F: sabor familiar. N.S.: No significativo.

Discusión

Un aumento de la proteína Arc en la CI es detectable una hora después de la ingesta de un fluido.

Nuestro análisis reveló que una hora después de la ingesta de sacarina novedosa, se puede detectar un alza en los niveles de Arc en la CI. A las 4h después del consumo, los niveles de Arc son comparables con los de animales controles. Notablemente, un estudio anterior mostró que la proporción de neuronas en la corteza parietal, en CA1 y en CA3 que expresaban Arc después de una exploración espacial, alcanzaba un pico a la hora después de la estimulación. También observaron que esta proporción era comparable a niveles basales cuando los animales se sacrificaban 3h después de la exploración (Ramirez-Amaya et al. 2005). También fue reportado que el pico de acumulación de Arc en el hipocampo inducido por la tarea de laberinto acuático de Morris ocurre a la hora (Miyashita et al. 2008). Estos datos junto con los nuestros indican que la cinética de acumulación de la proteína que ocurre después de una estimulación conductualmente relevante es similar entre distintas modalidades así como de una estructura telencefálica a otra.

Una solución de sacarina induce mayores niveles de Arc en la CI cuando es familiar que cuando es novedosa

La tarea de la AN, junto con un control estricto del volumen consumido, permitió comparar los niveles de expresión de Arc después de la presentación de estímulos entre los cuales lo único que cambiaba era el grado de familiaridad. Los

resultados obtenidos con la técnica de *immunoblot* muestran un aumento en la expresión de Arc cuando el estímulo gustativo es presentado por segunda vez (F2) con respecto a cuando el sabor es novedoso (N). Cuando el sabor es presentado por quinta ocasión (F5), los niveles de Arc también son significativamente superiores a los de N y la diferencia es aún más robusta que en el caso de F2 vs. N ($p < 0.01$ vs. $p < 0.05$), aunque la diferencia entre F2 y F5 no alcanza la significancia. En este quinto día nuestros datos conductuales de AN indican que el sabor ya está familiarizado; después de F5 ya no hay incremento en el volumen de solución consumido y se alcanza una meseta conductual (Fig. 5 A). Juntos, estos datos indican que la familiarización previa a un estímulo gustativo es necesaria para inducir una expresión óptima de la proteína Arc. Marcadamente, hemos observado que la inducción de Arc por la ingesta de un sabor novedoso se puede detectar de manera robusta a la hora después del inicio del consumo y regresa a niveles basales a las 4h. Esta característica temporal de la expresión de Arc hace improbable que la cantidad mayor de proteína vista en la condición familiar se deba a una acumulación progresiva de la proteína a lo largo de las sucesivas presentaciones del sabor o a una expresión sostenida del gen después de la presentación de un sabor novedoso. Si éste fuera el caso, niveles altos de Arc se seguirían observando varias horas después de la ingesta de un sabor novedoso y no fue lo que observamos (ver Fig. 5A, recuadro superior izquierdo). Sin embargo, se ha reportado que la exploración espacial podía inducir transcripción sostenida de Arc en el giro dentado (Chawla et al., 2012, manuscrito en preparación). Además, se ha visto que posterior a la exploración espacial y después de que los niveles de Arc regresen a niveles basales, hay una

reactivación *off-line* que hace que una proporción de las neuronas que expresan Arc a la hora lo vuelven a expresar 8 y 24h después (Ramírez-Amaya et al., 2005). Por lo tanto, no podemos excluir completamente la posibilidad de que al menos una parte del Arc detectado en la condición F5 se deba a una reactivación fuera de línea de su traducción, aunque consideramos poco probable que dicho fenómeno pudiera explicar a sí solo las diferencias obtenidas en nuestro estudio. Más bien, preferimos la idea de que un estímulo gustativo familiar induce un patrón distinto de actividad en la CI y que éste a su vez está relacionado con mayores niveles de Arc. Esta idea está apoyada por otros datos obtenidos durante este estudio y que discutiremos más adelante.

Aunque menos se sabe sobre las características de la expresión de Arc en la corteza, es interesante notar que el aumento reportado aquí en la condición familiar parece contra-intuitivo. En efecto, se ha reportado que la presentación de un sabor novedoso induce regulación a la alza de varios factores relacionados con plasticidad en la CI, tales como c-fos (Koh et al., 2003), C/EBP β (Merhav et al. 2006) y más recientemente PSD-95 (Elkobi et al. 2008). Todas estas observaciones concuerdan con un esquema “clásico” de la consolidación de la memoria, en el cual el trazo se estabiliza durante un periodo de unas cuantas horas después de la adquisición y que es dependiente de síntesis proteica (Dudai 2004). Abundantes evidencias han mostrado un papel de Arc en la consolidación (Guzowski et al. 2000; Plath et al. 2006; Ploski et al. 2008) y en la reconsolidación (Maddox & Schafe 2011) de la memoria. Más bien, como discutiremos más adelante, los datos reportados en este estudio apoyan más un modelo en el cual

re-exposiciones subsecuentes al estímulo reactivan los mecanismos plásticos involucrados en una consolidación previa.

La ingesta de fluido no afecta los niveles de Arc en el HD

Algunos estudios han mostrado un papel del HD en la familiarización a un sabor. Por ejemplo, se ha visto que lesiones excitotóxicas en el hipocampo afectan la capacidad de formar IL a un CAS (Molero et al. 2005). Además, otro estudio que examinó los correlatos moleculares de la ingesta de un sabor novedoso reportó la fosforilación del factor de transcripción relacionado con plasticidad CREB en el hipocampo pero no en la corteza insular (Yefet et al. 2006). El mismo estudio reportó que Akt, un regulador de la vía de CREB-CBP (Gu et al. 2001), también se activa en el hipocampo, mas no en la CI después del consumo de un sabor novedoso. Por otro lado, la activación de la vía de Erk por esta tarea parece ser específica a la CI (Berman et al. 1998; Yefet et al. 2006). Finalmente, inyecciones bilaterales de anisomicina, un potente inhibidor de la síntesis proteica, en el HD después de la ingesta de un sabor novedoso inhibe la familiarización con este sabor (De la Cruz et al. 2008, Fig 6). Sin embargo, nuestros datos muestran que un estímulo gustativo no induce expresión significativa de Arc en homogenados totales de HD comparado con niveles basales, independientemente de su grado de familiaridad. Esto sugiere que mecanismos distintos de plasticidad ocurren en el HD durante la familiarización a un sabor, posiblemente inducidos por la vía de Akt (Yefet et al. 2006). Empero, como la región que analizamos abarca todo el HD, no podemos descartar que sutiles variaciones en la expresión de Arc se hubieran

podido observar en algunas subregiones del HD, particularmente en CA3, dada su participación en el aprendizaje de un ensayo (Miyashita et al. 2009).

Inyecciones de anisomicina en el HD después de la ingesta de una solución de sacarina novedosa atenúan el incremento en la proteína de Arc observado después de la segunda presentación del sabor

La anisomicina inyectada en el HD después de la presentación del sabor novedoso afectó el incremento de la proteína Arc en la CI que reportamos después de la segunda presentación del sabor. Sin embargo, la anisomicina inyectada un día antes de N o de F6 no tuvo efecto sobre la expresión de Arc en la CI inducida por la presentación del sabor al día siguiente. Dado que ha sido demostrado que la inyección de esta droga en el HD afecta la consolidación de la AN, probablemente por su efecto de inhibición de la síntesis proteica (De la Cruz et al. 2008), estos datos fortalecen la idea que el aumento en la proteína Arc en la CI en la condición familiar *necesita* familiarización previa con el sabor. Es decir, los mayores niveles de Arc dependen del establecimiento previo de un trazo mnémico. Este dato también demuestra que eventos plásticos en la corteza, inducidos por la conducta, pueden ser alterados con un tratamiento que afecta la plasticidad en el hipocampo. Se han identificado eferencias directas de CA1 a áreas gustativas de la CI, vía el haz longitudinal de asociación (Cenquizca & Swanson 2007). Esta región tiene también densas conexiones directas e indirectas con la corteza perirhinal y con la amígdala (Cenquizca & Swanson 2007), dos regiones con conexiones a la CI (Shi & Cassell 1998) que tienen un papel en la formación de memorias gustativas y de manera más general con la

familiarización con los estímulos (Gutiérrez et al. 2004; Eichenbaum et al. 2007; Sauvage et al. 2008; Balderas et al. 2008; De la Cruz et al. 2008; Farovik et al. 2011). Aunque la relevancia funcional de dichas conexiones para la formación de la memoria gustativa ha sido poco estudiada, estas características neuroanatómicas concuerdan con un modelo, apoyado por nuestros datos, en el cual eventos plásticos en el HD afectan a largo plazo los que suceden en la corteza insular y son esenciales para la familiarización al sabor.

Alrededor del 20% de las neuronas de la CI disgranular se activan con la ingesta de una solución de sacarina tanto cuando es novedosa cuando es familiar. No obstante, en esta última condición, se observan mayores niveles dendríticos de la proteína Arc

Los datos de IHQ presentados en este trabajo sugieren que la mayor expresión de Arc en la condición familiar observada por inmunoblot se debe a una mayor expresión dendrítica y no a un mayor número de neuronas que expresan la proteína. Ha sido demostrado que las unidades celulares inmunoreactivas a Arc, tanto en la corteza como en el hipocampo, son aquellas que respondieron ante una conducta dada (Ramirez-Amaya et al. 2005). Conjuntamente, se ha reportado que la proteína Arc se acumula en la dendrita en sinapsis excitatorias recientemente activadas (Steward et al. 1998; Moga et al. 2004), y que el mRNA de Arc recientemente sintetizado viaja específicamente a las sinapsis estimuladas por un protocolo de LTP, por un mecanismo que depende de receptores NMDA (Steward & Worley 2001). Por otro lado, se ha visto que el mRNA de Arc presente constitutivamente en la dendrita puede ser traducido localmente en la dendrita

mediante un protocolo de LTD (Waung et al. 2008). Sin embargo, ningún estudio hasta el nuestro había examinado cómo la conducta puede afectar la localización subcelular de la proteína Arc. Este trabajo es el primero que reporta una modulación de la expresión dendrítica de la proteína Arc por el aprendizaje.

Nuestro análisis de II sugiere que de las células Arc+, la cantidad de proteína detectada en el soma es similar entre las condiciones Familiar y Novedoso. Esto sugiere que lo único que cambia entre ambas condiciones es la cantidad de Arc en la dendrita. Cabe mencionar sin embargo que se observó una ligera tendencia ($p=0.1$) a que los somas en N tuvieran mayor inmunoreactividad a Arc. Dado el número limitado de somas que pudimos incluir en el análisis de (alrededor de 300 somas Arc+ por condición), no podemos excluir por lo tanto que dicha tendencia se pudiera concretizar, al incluir un número mayor de somas en el análisis. Recordemos que el objetivo principal del análisis de II era ver si hubiera podido suceder un control en el transporte dendrítico en la condición familiar que hubieran podido explicar las diferencias observada en la inmunoreactividad dendrítica. En efecto, bien podría ser el caso, pues como mencionamos anteriormente, varios trabajos han reportado un control en el transporte dendrítico del mRNA de Arc (Steward et al. 1998; Steward & Worley 2001; Kobayashi et al. 2005; Dynes & Steward 2007; Huang et al. 2007; Gao et al. 2008). En nuestro caso, el transporte dendrítico preferencial en la condición F hubiera dejado menos Arc disponible para la traducción en el soma y por lo tanto menor II en esta región. Aunque más estudios sobre la dinámica intracelular de la acumulación de Arc regulada por la conducta son requeridos, en nuestro estudio preferimos la

interpretación que sugieren nuestros datos de II, es decir que los niveles somáticos de Arc no cambian significativamente entre ambas condiciones.

Como mencionamos anteriormente, nuestros datos presentados en las Fig. 5 y 9 pueden parecer contra-intuitivos. Sin embargo, los estudios que han examinado la relación entre la expresión de Arc y el grado de familiaridad de un estímulo o una tarea conductual han aportado datos controversiales. Un estudio mostró en una tarea de condicionamiento operante que los niveles del mRNA de Arc en los campos CA1 y CA3 del hipocampo, en el subiculum, en la corteza cingulada anterior, las cortezas piriforme, infra/prelímica, perirhinal y entorhinal, subían significativamente en respuesta a la adquisición de la tarea, pero regresaban a niveles basales con el sobreentrenamiento (Kelly & Deadwyler 2002). El mismo grupo de igual forma reportó un comportamiento similar de la proteína en la corteza frontal usando la misma tarea (Kelly & Deadwyler 2003). Otro estudio demostró que, en el área cortical V1, la corteza visual primaria, el número de células que expresa Arc disminuye con la familiarización a distintas orientaciones (Wang et al. 2006). Incluso se ha mostrado que en varias áreas corticales, el número de neuronas que expresan el mRNA de Arc era mayor después de la presentación de un estímulo gustativo novedoso versus uno familiar (Montag-Sallaz et al., 1999). En cambio, otro grupo ha mostrado que el número de células del giro dentado del hipocampo que expresan Arc después de una exploración espacial es independiente del grado de familiarización a dicho ambiente (Chawla et al. 2005). Además, fue reportado que los niveles de expresión de la proteína Arc permanecen elevados en ratas sobreentrenadas

para la tarea de laberinto acuático de Morris (Miyashita et al. 2008). El mismo grupo reportó además que en CA3, el número de células expresando el mRNA de *Arc* no variaba en función del número de días en los cuales se repitió una tarea de aprendizaje de un ensayo. En CA1, vieron que la proporción de células expresando *Arc* era ligeramente mayor después de 4 días de entrenamiento, inclusive, y estas tenían mayor II que las que se activaban en respuesta al primer entrenamiento (Miyashita et al. 2009). También un estudio preliminar mostró que en CA1, la misma proporción de células expresaban *Arc* después de la exposición a un contexto familiar o a uno novedoso, pero que los niveles globales de mRNA detectados por qRT-PCR eran significativamente más altos en la condición familiar (Buzzetti et al., 2009). Estos estudios sugieren fuertemente que de las células que expresan *Arc* arriba de un cierto umbral, algunas tienen niveles de mRNA considerablemente mayores, lo que probablemente tenga una relevancia fisiológica como discutiremos más adelante. Adicionalmente, se publicó recientemente un estudio examinando las características de acumulación del mRNA mensajero de *Arc* en la corteza auditiva primaria al presentar un sonido novedoso y familiarizado (Ivanova et al. 2011). En este estudio, reportan un “trazo subcelular de la exposición previa a un sonido”; básicamente lo mismo que reportamos en este estudio en la modalidad gustativa (Morin et al. 2011). Específicamente, reportaron que un sonido presentado por segunda ocasión inducía una mayor proporción de neuronas con *Arc* en el citoplasma que un sonido novedoso (Fig. 11). Paralelamente, nuestros datos muestran que aunque la misma proporción de células expresan *Arc* en la CI

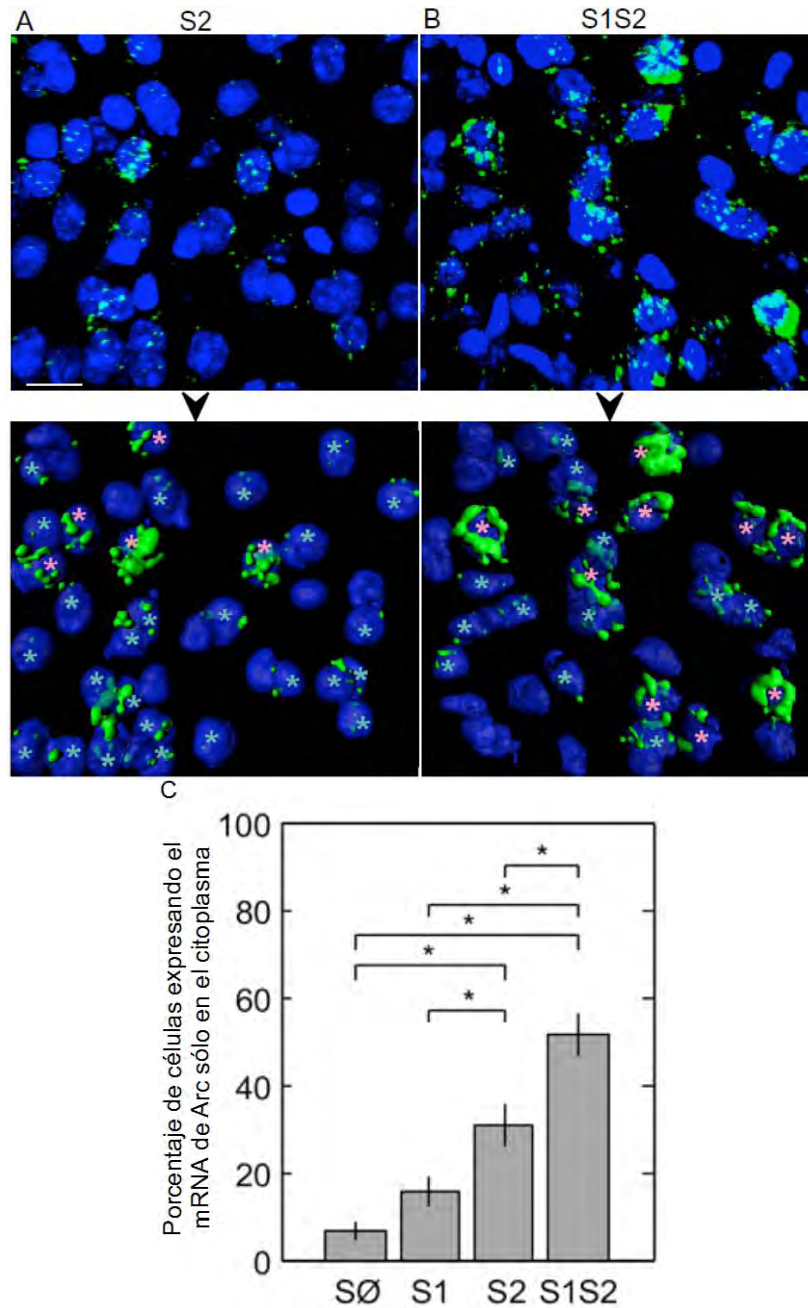


Figura 11: Expresión de *Arc* en la corteza auditiva primaria después de la presentación de un estímulo auditivo novedoso (A, imágenes de izquierda) y familiar (B, imágenes de derecha). Azul: DAPI (núcleos), verde: *Arc*. Arriba están representados “stacks” en z de tomas en 63X. Abajo están sus respectivas reconstrucciones en 3D. Estrellas rosas: neuronas con *Arc* en el citoplasma únicamente. Estrellas verdes: neuronas con *Arc* en el núcleo. La barra representa 15 μ m. (C) Promedio del porcentaje de células positivas para el mRNA de *Arc* únicamente en el citoplasma (sin expresión en el núcleo). Las estrellas representan significancia estadística de $p < 0.05$ por la prueba HSD de Tüker-Kramer. Las barras de error representan el E.E.M. (Modificado de Ivanova et al. 2011).

después de la presentación de un sabor novedoso o uno familiar, los niveles globales de la proteína, detectados por Western Blot son significativamente más altos en la condición familiar. Igualmente, nuestros estudios inmunohistoquímicos mostraron que la misma proporción de neuronas expresan Arc en ambas condiciones pero que la cantidad de proteína Arc por neurona era probablemente mayor en la condición familiar, dada la mayor inmunoreactividad detectada en procesos dendríticos. Estos resultados sugieren fuertemente que la proteína Arc no tiene un papel en un esquema clásico de consolidación en el cual los factores relacionados con plasticidad son inducidos después de la adquisición de una tarea y posteriormente regresa a niveles basales. De hecho, los primeros estudios sobre las características de la expresión de Arc a través del aprendizaje habían llevado a algunos autores a sugerir que los circuitos están consolidando información siempre que se evoca un estímulo o una tarea sin importar su grado de familiaridad (Miyashita et al. 2008). Este fenómeno podría servir para permitir la actualización del trazo e impedir la saturación de los circuitos.

Dada la proporción semejante de neuronas que se activaron en la condición familiar *versus* novedosa, es probable que las *mismas* unidades expresen Arc en ambas condiciones. Esta posibilidad está en acuerdo con una visión según la cual las mismas o parte de las mismas unidades que se reclutan al momento de la codificación de un estímulo se reactivan al evocarlo (Damasio 1989; Squire & Wixted 2011). Es probable entonces que un código *temporal* (por oposición a espacial) sea lo que señale al animal la familiaridad de un estímulo gustativo. Esta información se relacionaría con códigos poblacionales responsables de discriminar

entre sabores (Jones et al. 2006) y otros representando consecuencias post-ingestivas (Grossman et al. 2008; Sadoris et al. 2009) para generar un percepto completo de la experiencia gustativa. Asimismo, en nuestro caso y de manera hipotética, la presencia de Arc en la dendrita podría constituir una huella de la estimulación previa de estas neuronas. Eventos de plasticidad en la CI posterior a la presentación del sabor novedoso podrían modular los pesos sinápticos de ciertas neuronas en esta región de tal manera que su respuesta ante presentaciones subsecuentes del mismo sabor se vea potenciada. Esta respuesta potenciada induciría mayor cantidad de proteína Arc en cada neurona y por lo tanto más Arc en la dendrita. Esta posibilidad suena atractiva a la luz de los estudios en otras modalidades sensoriales discutidos previamente y que sugieren que la cantidad de transcrito de Arc en cada neurona puede variar a través de la experiencia (Buzzetti et al., 2009, Ivanova et al., 2011). Además, dadas las características funcionales de la proteína Arc (Bramham et al. 2008, 2010), esta acumulación dendrítica en las neuronas activadas es precisamente la que nos esperaríamos después de varias presentaciones de un mismo estímulo conductual.

Cabe mencionar que en nuestro estudio, al igual que en el de Ivanova y colaboradores, no tenemos manera directa de corroborar que en efecto, las mismas células se reactivaron con el estímulo familiar. Estudios a futuro, por ejemplo usando microscopía multifotónica (Wang et al. 2006), deberían de probar esta hipótesis. Además, aunque sabemos que la actividad sináptica dependiente de NMDA y arriba de un cierto umbral es esencial para la expresión de Arc

(Bramham et al. 2010), no se sabe si dentro de un cierto rango se pueden inducir cantidades variables de transcrito. Estudios posteriores tanto *in vivo* que *in vitro* deberían de correlacionar la estimulación pre-sináptica, los niveles intracelulares de calcio en la postsinapsis y los niveles de Arc, por ejemplo usando células transfectadas con eGFP en el promotor de Arc. De la misma forma, podremos correlacionar la expresión de Arc no sólo de manera cualitativa, representando una célula “reclutada” o no, sino de manera cuantitativa, usando la cantidad o la localización subcelular de Arc como indicador de la actividad de una neurona.

El patrón de acumulación observado en las dendritas apicales es relativamente homogéneo, es decir, se observa relativamente la misma intensidad de tinción a lo largo de la dendrita. Se ha descubierto recientemente un papel de Arc en el escalamiento sináptico homeostático (Shepherd et al. 2006; Rial Verde et al. 2006). En este modelo, Arc actuaría para regular a la baja las sinapsis a lo largo de la dendrita, manteniendo y potenciando los pesos relativos implementados en los patrones de actividad previos. El patrón constante y homogéneo de la expresión de Arc en la dendrita en nuestro estudio concuerda con un papel de Arc en el escalamiento sináptico de los receptores AMPA (Rial Verde et al., 2006). La inducción del gen *Arc* está estrechamente relacionada con la actividad sináptica (Kawashima et al. 2009; Bramham et al. 2010). Una secuencia ubicada a ~7kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción de *Arc*, SARE (por *Synaptic Activity Response Element*) fue identificada que induce un fuerte y rápido aumento en la transcripción del gen en respuesta a la actividad sináptica (Kawashima et al. 2009). Dado lo que se sabe sobre la cinética del

transporte dendrítico del mRNA de *Arc* (Steward et al. 1998; Steward & Worley 2001; Kobayashi et al. 2005; Dynes & Steward 2007; Huang et al. 2007; Gao et al. 2008) es posible que el *Arc* que detectamos a mayores niveles en la condición familiar provenga de expresión *de novo* de GEI.

Por otro lado, se ha visto que la LTD dependiente de mGLUR induce la traducción del mRNA de *Arc* que se encuentra, a bajos niveles, de manera constitutiva en la dendrita (Park et al. 2008). La expresión de *Arc* por la vía de mGLUR de grupo 1 es inducida rápidamente (dentro de 5 minutos) en la dendrita, es dependiente del factor de elongación eEF2 y de *Fragile X Mental retardation Protein* (FMRP) y es esencial para la expresión de este tipo de LTD (Park et al. 2008; Waung et al. 2008). Asimismo, una explicación alternativa podría ser que el *Arc* dendrítico en la condición familiar es producto de una estimulación de tipo LTD hacia las capas IV/V de la CI disgranular que provocó la traducción del mRNA (basal) de *Arc*. Por otro lado, ha sido reportado en la CI que los mGluR son importantes para el aprendizaje gustativo (Berman et al. 2000). Además, la LTD dependiente de NMDAR en la corteza perirhinal ha sido identificada recientemente como esencial para la formación de la memoria de reconocimiento a objetos (Griffiths et al. 2008), otro tipo de memoria de reconocimiento que también es dependiente de la CI (Balderas et al. 2008). Experimentos futuros deberían de evaluar si la acumulación dendrítica del mRNA de *Arc* presenta una modulación semejante a lo largo de la familiarización del sabor, lo que ayudaría a determinar qué tipo de mecanismo (pre o post transcripcional) está involucrado en el fenómeno que describimos aquí. Sería también interesante tratar de establecer

una relación entre la LTD dependiente de Arc/mGLUR y la formación de la AN, por ejemplo, inhibiendo los mGLUR en la CI para evaluar si afecta la traducción de Arc en esta estructura, así como el desempeño de la tarea de AN. Importantemente, estos estudios, más que elucidar los mecanismos que subyacen a la familiarización con un sabor, aprovecharían la simplicidad de la tarea de AN para elucidar preguntas más generales sobre cómo la experiencia modula las redes corticales a largo plazo.

CAPÍTULO III: Expresión de Arc en la CI inducida por un cambio en el valor hedónico del estímulo gustativo

Antecedentes

Es interesante notar que en el trabajo de Bahar y colaboradores discutido previamente, el efecto que reportan se presentaba únicamente en la parte tardía de la fase registrada (LP, *Late Phase*), fase útil para la discriminación del valor hedónico de los sabores (Katz et al. 2001). Importantemente, los datos reportados no permitieron distinguir si el aumento reportado se debía realmente a la familiarización con el sabor o más bien a un cambio en su valor hedónico. Durante la AN, sucede un cambio en el valor hedónico del estímulo gustativo que pasa de neofóbico a familiar y satisfactorio. Es posible entonces que el aumento en la tasa de disparo que reportan en la CI después de la familiarización con el estímulo gustativo se deba en realidad a un cambio en el valor hedónico del estímulo, no a la familiaridad *per se* de dicho estímulo. Para probar que se debía exclusivamente a la familiarización hubieran tenido que probar con un sabor con características hedónicas claramente opuestas, como la quinina y observar el mismo fenómeno. De igual manera los datos que reportamos en este estudio no permiten determinar si el cambio en la acumulación de Arc en la CI se debe a la familiarización con el sabor o a un cambio en el valor hedónico del mismo.

En otro estudio, se empleó imagenología óptica intrínseca para determinar si el aprendizaje afectaba la actividad global en la CI (Accolla & Carleton 2008). En un estudio anterior, el mismo grupo había determinado que la quinina, un estímulo gustativo aversivo para la rata, activaba una zona de la CI más posterior que la

que se activaba por sacarina (Accolla et al. 2007). Interesantemente, al volver la sacarina aversiva, la zona activada al evocar la memoria al sabor cambió de lugar, hasta traslapar con la de la quinina. Además, al extinguir el condicionamiento, el área activada por la sacarina regresaba al lugar donde estaba antes del condicionamiento. Estos datos demuestran que el mapeo de la actividad cortical inducida por la ingesta de un estímulo gustativo es sujeto a plasticidad. Adicionalmente, el estudio sugiere que la actividad global de la CI que es ocasionada por la percepción gustativa es predicha más adecuadamente por el valor hedónico de un estímulo (que pudo ser modulado a través del aprendizaje) que por sus características intrínsecas.

Hipótesis

La modulación de la expresión de Arc descrita en el capítulo anterior es consecuencia de la familiarización. Por lo tanto, la familiarización con un estímulo amargo o desagradable inducirá cambios semejantes en la expresión de Arc en la CI.

Objetivo

Determinar los niveles de Arc en la CI después de la presentación de quinina novedosa o familiar con respecto a los niveles controles

Materiales y Métodos

Los procedimientos conductuales para establecer la curva de AN con quinina fueron tales como descritos para los experimentos con sacarina. De igual

manera para determinar la expresión de Arc en la CI durante la familiarización a la quinina, los procedimientos conductuales fue el mismo que el usado para los experimentos de inmunoblot después de la presentación de sacarina discutidos anteriormente. Para el experimento que comparó los niveles de Arc en la CI después de la ingesta de sacarina segura *versus* aversiva, los procedimientos conductuales fueron los mismos que los descritos en el capítulo I salvo que las ratas de la condición aversiva recibieron inyecciones de 0.15 M LiCl ~30 minutos después de la cuarta ingesta de sacarina y fueron sacrificadas una hora después del inicio de la quinta presentación.

Resultados

Para observar si los cambios en la acumulación de Arc que reportamos se deben a un cambio en el valor hedónico del estímulo o si reflejan específicamente un cambio en la familiaridad del estímulo, se compararon los niveles de acumulación de la proteína en la familiarización con otro sabor, con carácter hedónico opuesto al de la sacarina. La quinina ha sido usada como sabor amargo aversivo de referencia (Accolla & Carleton 2008). Pero poco se sabe sobre el comportamiento de la curva de AN cuando se usa quinina como sabor. Por lo tanto, realizamos un experimento de AN usando quinina como sabor. Al primer día de consumo (Q1) se nota un claro decremento en la ingesta de fluido cuando la ración de agua matutina es substituida por una solución de quinina (Fig. 13). En los días siguientes, el volumen consumido aumenta indicando atenuación de la neofobia y a partir del tercer día en adelante se observa una meseta conductual. Sin embargo, aún cuando la quinina es muy familiar (i.e. en el séptimo día de

consumo), el volumen consumido se mantiene significativamente inferior al de la línea base de agua ($t_{(13)}=4.38$, $p<0.001$). Este resultado indica que, aunque en nuestros manos el fenómeno de neofobia y su atenuación parece ser independiente del valor hedónico al cual se familiarizan las ratas, el valor hedónico (medido en mL de solución consumidos) de la quinina en meseta permanece inferior al del agua, difiriendo drásticamente con lo que sucede con la sacarina (ver Fig. 2).

Curva AN Quinina

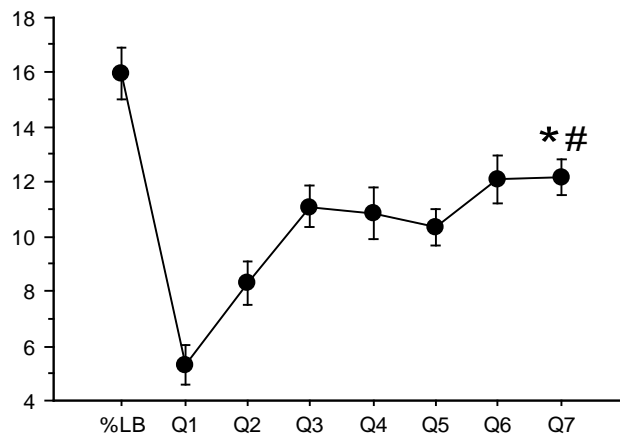


Figura 13: Atenuación de la neofobia con una solución de quinina al 0.005% (0.15mM). La gráfica muestra el promedio en mL del volumen consumido en la sesión matutina de consumo diario en la que se presentó la quinina. LB: línea base de agua, Q1-7: quinina, primer día, segundo, etc. *: $p<0.001$ #: $p<0.0001$. $n=14$. Las barras representan el error estándar de la media.

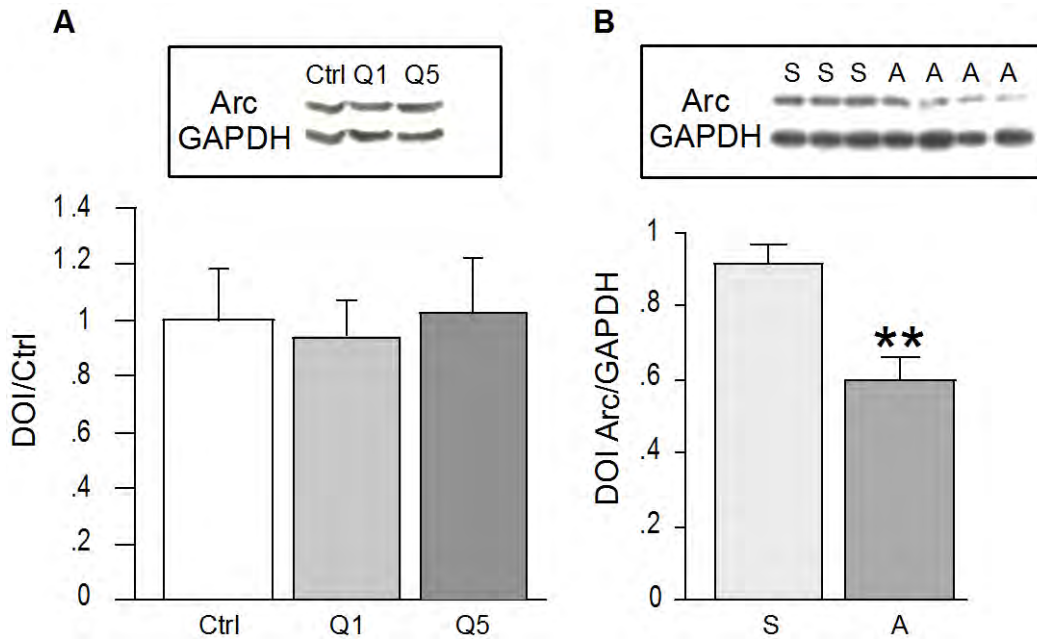


Figura 14: (A) Expresión de Arc inducida por la presentación de quinina novedosa (Q1) y familiar (Q5). Los datos están representados como densidad óptica integrada de Arc/GAPDH del grupo experimental (Q1 o Q5) dividida por la del grupo control (Ctrl). (B) La expresión de Arc en la CI relaciona con el valor hedónico del estímulo gustativo. S: Sacarina segura; solución de sacarina presentada por quinta vez. A: Sacarina aversiva; solución de sacarina presentada por quinta vez pero que fue apareada con malestar gástrico (0.15M LiCl i.p.) en la cuarta presentación. Los datos están representados como densidad óptica integrada de Arc/GAPDH. Las estrellas representan $p < 0.01$. Los rótulos de arriba son inmunoblots representativos. N.B.: No todos los blots están presentes en el rótulo presentado en (B).

Posteriormente, probamos los niveles de acumulación de Arc en la CI después de la presentación de quinina novedosa (Q1) o familiar (Q5). El protocolo conductual seguido fue el mismo que en el experimento con sacarina (ver materiales y métodos). El análisis por inmunoblot de los niveles de Arc en la CI no reveló diferencias entre un estímulo de quinina novedoso versus familiar y en ambos casos los niveles de Arc eran comparables los controles (Fig. 13). Esto indica que contrario a lo que sucede con la sacarina, la familiarización con un estímulo aversivo no afecta los niveles de Arc en el área estudiada. Razonamos

entonces que si los niveles de Arc reflejan el valor hedónico del estímulo gustativo, al cambiar el valor hedónico de la sacarina familiar (F5) a aversivo, los niveles de Arc deberían bajar. Para probar esta hipótesis, comparamos los niveles de expresión de Arc en la CI inducidos por un sabor familiar con los inducidos por un sabor familiar que presentamos también por quinta vez pero que volvimos aversivo inyectando LiCl después de la cuarta presentación. Efectivamente, los niveles de Arc detectados después de la presentación del sabor aversivo fueron significativamente menores que los inducidos por el sabor familiar seguro. Estos datos sugieren que la expresión de factores relacionados con plasticidad como Arc puede ser modulada por cambios en el valor hedónico de los estímulos gustativos y concuerdan con lo reportado por Accolla y colaboradores con imagenología óptica intrínseca, mostrando incluso que la expresión de GEI puede ser modulada por el aprendizaje.

Discusión

Es posible que la razón por la que vimos un aumento en los niveles globales de Arc es porque la región que analizamos era relativamente anterior (aproximadamente entre 1 y 2 mm anterior a bregma para los análisis de WB y entre 1.2 y 1.7 mm para los análisis de inmunohistoquímica). Ciertamente, el estudio de Accolla y colaboradores mostró que el área activada por el estímulo gustativo dulce es anterior al que es activado por uno amargo como la quinina que parecía más notable alrededor de 1.0 mm *posterior* a Bregma (Accolla et al. 2007). Un análisis de la expresión de Arc en la CI posterior hubiera podido dar resultados distintos. Encima, no hemos resuelto la pregunta a saber si la familiarización con

un sabor aversivo como la quinina también induce la acumulación de Arc en la dendrita. Tal vez el mismo fenómeno suceda, pero en este caso, en regiones más posteriores de la CI (~Bregma -0.5 y 0.5mm). Podría ser también que un patrón inverso, es decir mayor acumulación de Arc cuando el estímulo se vuelve aversivo, se observe en regiones posteriores de la CI. Un análisis más extenso de la expresión de Arc en la CI, tanto con inmunoblot que con IHQ, durante el aprendizaje del cambio del valor hedónico de un sabor podría ayudar a responder estas preguntas. De cualquier manera, nuestros datos muestran que el cambio en el valor hedónico del estímulo gustativo puede modular la actividad y la plasticidad cortical. Sería también interesante analizar el comportamiento de otros GEI, como c-fos y zif268 en las mismas condiciones.

Por otro lado, un estudio reciente demostró que la actividad en la CI interoceptiva era esencial para señalar el malestar ocasionado por la urgencia de consumir drogas de abuso (Contreras et al. 2007). La región de la analizada en ese estudio corresponde a la corteza interoceptiva primaria. El área de la CI analizada en nuestro estudio formaría más bien la corteza interoceptiva de segundo orden (CI anterior) (Contreras et al. 2008). Dada la extensiva interconexión entre estas dos áreas así que con la amígdala (Shi & Cassell 1998), es posible que actúen de concierto para evaluar y almacenar información emocionalmente relevante. Basado en estudios de condicionamiento contextual al miedo, unos autores propusieron un papel de la corteza prefrontal para establecer un trazo mnémico de lo seguro vía una inhibición indirecta de la amígdala. Es este modelo, la actividad de la corteza prefrontal “competiría” con la de la amígdala

para establecer la seguridad relativa de un contexto dado (Maren & Quirk 2004). Una posibilidad atractiva podría ser que la amígdala y la CI compiten de manera semejante para establecer el valor hedónico de un estímulo gustativo. Estudios actualmente en curso en nuestro laboratorio están probando la hipótesis que si la actividad neuronal relevante para la plasticidad, medida por inmunoreactividad a Arc, aumenta en la amígdala cuando el estímulo se vuelve aversivo, al contrario de lo que pasa en la CI. Combinados con estudios electrofisiológicos (ej. Grossman et al. 2008), estos estudios ayudarán a elucidar como la experiencia de carácter emocional modula las redes gustativas de alto nivel. Por otra parte, sería interesante comparar si la familiarización con un sabor seguro y agradable y la familiarización con drogas de abuso comparten mecanismos de plasticidad en la CI, ya que se ha visto que esta región es esencial para señalar la recompensa relacionada con el consumo de drogas de abuso (Geddes et al. 2008; Hollander et al. 2008).

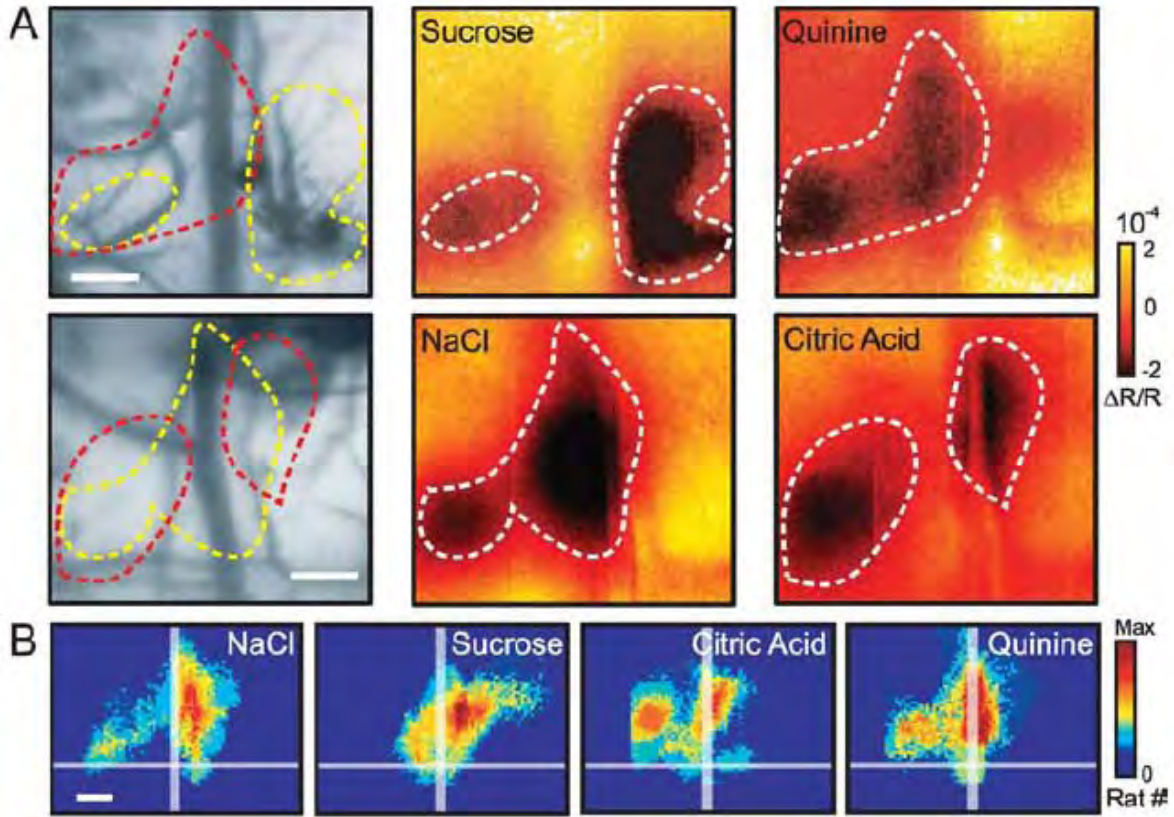


Figura 15: Zonas de la CI activadas por distintos sabores, visto por imagenología intrínseca. (A) Veintiocho presentaciones de cada uno de los estímulos están promediados. Nótese que las áreas activadas por la sacarosa y la quinina son claramente distintas (B) Mapas poblacionales para los 4 sabores básicos NaCl (n=18), sacarosa (n=15), ácido cítrico (n=8) y quinina (n=8). Las capturas de imágenes fueron realizadas sobre el "Max" en la escala de colores representa 60% de los animales. (Adaptado de Accola et al., 2007).

CAPÍTULO IV: Conclusiones y perspectivas

Fundamentalmente la serie de experimentos presentados en este trabajo proveen tres conclusiones principales. En primer lugar hemos demostrado que una tarea conductual puede modular los niveles dendríticos de la proteína Arc. Desde los años que siguieron la secuenciación del gen de Arc, varios estudios *in vitro* habían mostrado que tanto el viaje del mRNA de Arc hacia la dendrita así como su traducción local podían ser regulada por una serie de mecanismos de señalización celular (Wallace et al. 1998; Steward 2002; Bramham et al. 2010; Okuno 2011). Sin embargo, faltaba demostrar que dicha modulación sucedía en condiciones conductuales y fue lo que aportó nuestro trabajo.

Por otra parte, demostramos que mecanismos de plasticidad dependientes de Arc suceden en la corteza aún cuando un estímulo gustativo es familiar. Este dato va en contra de la teoría clásica de la consolidación que fue elaborada principalmente basándose en estudios con inhibidores de síntesis proteica (Dudai 2004), pero cuadra adecuadamente con propuestas modernas basadas mayoritariamente en estudios con GEIs (Miyashita et al. 2008). En este esquema, eventos de plasticidad sucederían cada vez que se evoca un recuerdo o que se realiza una tarea aprendida aún cuando ninguna actualización del trazo o aprendizaje adicional son necesarios.

Finalmente, nuestros datos sobre el cambio hedónico del estímulo gustativo sugieren que los estudios sobre la familiarización al sabor deberían de tener en

cuenta este parámetro, pues un estímulo gustativo tiene distinto valor hedónico dependientemente de su grado de familiaridad. Mostramos que la familiarización con un estímulo preferido como la sacarina no involucra los mismos mecanismos de plasticidad (y posiblemente regiones distintas) que la familiarización con un estímulo desagradable como la quinina. Mostramos además que al volver un estímulo de sacarina familiar aversivo, el incremento de Arc en la CI se revertía. Estos datos, junto con los de otros grupos (Accolla et al. 2007; Contreras et al. 2007; Accolla & Carleton 2008; Hollander et al. 2008) generan preguntas acerca de la compartimentalización del procesamiento de la experiencia gustativa y sugieren más estudios sobre cómo el cambio del valor hedónico de un estímulo, como sabores y drogas de abuso modifica las redes paleocorticales.

Referencias

- Accolla R, Bathellier B, Petersen CCH, and Carleton A. 2007. Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci* **27**: 1396-404.
- Accolla R, and Carleton A. 2008. Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 4010-5.
- Adams P. 1998. Hebb and Darwin. *J Theor Biol* **195**: 419-38.
- Bahar A, Dudai Y, and Ahissar E. 2004. Neural signature of taste familiarity in the gustatory cortex of the freely behaving rat. *J Neurophysiol* **92**: 3298-308.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, Mcgaugh JL, and Bermudez-Rattoni F. 2008. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* **15**: 618-624.
- Barki-Harrington L, Elkobi A, Tzabary T, and Rosenblum K. 2009. Tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the NMDA receptor is necessary for taste memory formation. *J Neurosci* **29**: 9219-26.
- Barot SK, Kyono Y, Clark EW, and Bernstein IL. 2008. Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20959-63.
- Belelovsky K, Kaphzan H, Elkobi A, and Rosenblum K. 2009. Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J Neurosci* **29**: 7424-31.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, and Dudai Y. 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* **20**: 7017-23.
- Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, and Dudai Y. 1998. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci* **18**: 10037-44.
- Bermudez-Rattoni F. 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* **5**: 209-17.
- Bermudez-Rattoni F, Okuda S, Roozendaal B, and McGaugh JL. 2005. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* **12**: 447-9.
- Bernstein IL., and Koh MT. 2007. Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses* **32**: 99.

- Bloomer WAC, VanDongen HMA, and VanDongen AMJ. 2008. Arc/Arg3.1 translation is controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways. *J Biol Chem* **283**: 582-92.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, et al. 2010. The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* **200**: 125-140.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, and Guzowski JF. 2008. The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* **28**: 11760-7.
- Brennan PA, Hancock D, and Keverne EB. 1992. The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience* **49**: 277-84.
- Brodal P. 2003. *The Central Nervous System: Structure and Function*. OUP USA
- Brown MW, and Aggleton JP. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* **2**: 51-61.
- Buzzetti R, Penner MR, Hoang LT, Lister JP. 2009. Arc transcriptional responses are modulated by degree of context familiarity. *Abstr Ann Meet Soc Neurosci* 481.26/GG38.
- Cenquizca LA, and Swanson LW. 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* **56**: 1-26.
- Chawla M, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V., Lipa P, Hoffman K, Marriott L, Worley PF, McNaughton BL, and Barnes CA. 2005. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* **15**: 579-586.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, and Worley PF. 2006. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* **52**: 445-59.
- Contreras M, Ceric F, and Torrealba F. 2008. El lado negativo de las emociones: adicción a drogas de abuso. *Rev Neurol* **47**: 471-476.
- Contreras M, Ceric F, and Torrealba F. 2007. Inactivation of the interoceptive insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium. *Science* **318**: 655-8.
- Corkin S, Amaral DG, González RG, Johnson KA, and Hyman BT. 1997. H.M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* **17**: 3964-79.

- De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, and Bermudez-Rattoni F. 2008. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci* **28**: 1377-81.
- Damasio AR. 1989. Time-locked multiregional retroactivation: a systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. *Cognition* **33**: 25-62.
- Dobzhansky. 1973. Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution. *The Am Biol Teach* **35**: 125-129.
- Domjan M. 1976. Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J Exp Psychol* **2**: 17-27.
- Dong E, Caruncho H, Liu WS, Smalheiser NR, Grayson DR, Costa E, and Guidotti A. 2003. A reelin-integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 5479-84.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**: 51-86.
- Dynes JL, and Steward O. 2007. Dynamics of Bidirectional Transport of Arc mRNA in Neuronal Dendrites. *J Comp Neurol* **447**: 433- 447.
- Eichenbaum H, Yonelinas a P, and Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* **30**: 123-52.
- Elkobi A, Ehrlich I, Belevovsky K, Barki-Harrington L, and Rosenblum K. 2008. ERK-dependent PSD-95 induction in the gustatory cortex is necessary for taste learning, but not retrieval. *Nat Neurosci* **11**: 1149-51.
- Escobar ML, Chao V, and Bermúdez-Rattoni F. 1998. In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res* **779**: 314-9.
- Escobar ML, and Bermudez-Rattoni F. 2000. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* **852**: 208-12.
- Farovik A, Place RJ, Miller DR, and Eichenbaum H. 2011. Amygdala lesions selectively impair familiarity in recognition memory. *Nat Neurosci* **14**: 1416-1417.
- Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* **32**: 33-55.
- Flavell SW, and Greenberg ME. 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **31**: 563-90.

- Flynn F. 1999. Anatomy of the insula functional and clinical correlates. *Aphasiology* **13**: 55-78.
- Fontanini A, and Katz DB. 2009. Behavioral modulation of gustatory cortical activity. *Ann NY Acad Sci* **1170**: 403-6.
- Gao Y, Tataavarty V, Korza G, Levin MK, and Carson JH. 2008. Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Mol Biol Cell* **19**: 2311-27.
- Geddes RI, Han L, Baldwin AE, Norgren R, and Grigson PS. 2008. Gustatory insular cortex lesions disrupt drug-induced, but not lithium chloride-induced, suppression of conditioned stimulus intake. *Behav Neurosci* **122**: 1038-50.
- Griffiths S, Scott H, Glover C, Bienemann A, Ghorbel MT, Uney J, Brown MW, Warburton EC, and Bashir ZI. 2008. Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. *Neuron* **58**: 186-94.
- Grossman SE, Fontanini A, Wieskopf JS, and Katz DB. 2008. Learning-related plasticity of temporal coding in simultaneously recorded amygdala-cortical ensembles. *J Neurosci* **28**: 2864-73.
- Gu WX, Stern PH, Madison LD, and Du GG. 2001. Mutual up-regulation of thyroid hormone and parathyroid hormone receptors in rat osteoblastic osteosarcoma 17/2.8 cells. *Endocrinology* **142**: 157-64.
- Gutierrez R, Tellez LA, and Bermudez-Rattoni F. 2003. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* **17**: 1556-1562.
- Gutiérrez R, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, and Bermudez-Rattoni F. 2004. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem* **11**: 95-101.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, and Barnes CA. 2000. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* **20**: 3993-4001.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, and McGaugh JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* **21**: 5089-98.

- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, and Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* **2**: 1120–1124.
- Hibbs AR. 2004. *Confocal microscopy for biologists*. Springer.
- Hollander JA, Lu Q, Cameron MD, Kamenecka TM, and Kenny PJ. 2008. Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 19480-5.
- Huang F, Chotiner JK, and Steward O. 2007. Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg3.1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites. *J Neurosci* **27**: 9054-67.
- Ivanova TN, Matthews A, Gross C, Mappus RC, Gollnick C, Swanson A, Bassell GJ, and Liu RC. 2011. Arc/Arg3.1 mRNA expression reveals a subcellular trace of prior sound exposure in adult primary auditory cortex. *Neuroscience* **181**: 117-26.
- Jones LM, Fontanini A, and Katz DB. 2006. Gustatory processing: a dynamic systems approach. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 420-8.
- Jones MW, French PJ, Bliss TV, and Rosenblum K. 1999. Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci* **19**: RC36.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**: 1030-8.
- Katz DB, Simon SA, and Nicolelis MA. 2001. Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J Neurosci* **21**: 4478-89.
- Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, and Okamura M. 2008. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling. *Proc Natl Acad Sci* **106-1**: 316-321.
- Kelly MP, and Deadwyler SA. 2002. Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* **110**: 617-26.
- Kelly MP, and Deadwyler SA. 2003. Experience-dependent regulation of the immediate-early gene arc differs across brain regions. *J Neurosci* **23**: 6443-51.
- Kiefer SW, and Braun JJ. 1977. Absence of differential associative responses to novel and familiar taste stimuli in rats lacking gustatory neocortex. *J Comp Physiol Psychol* **91**: 498-507.
- Kobayashi H, Yamamoto S, Maruo T, and Murakami F. 2005. Identification of a cis-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *Neuroscience* **22**: 2977-2984.

- Kosar E, Grill HJ, and Norgren R. 1986a. Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain Res* **379**: 329-41.
- Kosar E, Grill HJ, and Norgren R. 1986b. Gustatory cortex in the rat. II. Thalamocortical projections. *Brain Res* **379**: 342-52.
- Kubik S, Miyashita T, and Guzowski JF. 2007. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem* **14**: 758-70.
- Landmann L, and Marbet P. 2004. Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microsc Res Tech* **64**: 103-12.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, and Kuhl D. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 5734-8.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes C A, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, and Worley PF. 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**: 433-45.
- Maddox SA, and Schafe GE. 2011. The Activity-Regulated Cytoskeletal-Associated Protein (Arc/Arg3. 1) Is Required for Reconsolidation of a Pavlovian Fear Memory. *J Neurosci* **31**: 7073.
- Maren S, and Quirk GJ. 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* **5**: 844-52.
- Mcintyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF, and McGaugh JL. 2005. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* **102-30**: 10718-10723.
- Merhav M, Kuulmann-Vander S, Elkobi A, Jacobson-Pick S, Karni A, and Rosenblum K. 2006. Behavioral interference and C/EBPbeta expression in the insular-cortex reveal a prolonged time period for taste memory consolidation. *Learn Mem* **13**: 571-4.
- Messaoudi E, Kanhema T, Soule J, Tiron A, Dagyte G, Da Silva B, and Bramham CR. 2007. Sustained Arc/Arg3. 1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* **27**: 10445.
- Miranda MI, Ramírez-Lugo L, and Bermúdez-Rattoni F. 2000. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* **882**: 230-5.

- Miyashita T, Kubik S, Haghghi N, Steward O, and Guzowski JF. 2009. Rapid Activation of Plasticity-Associated Gene Transcription in Hippocampal Neurons Provides a Mechanism for Encoding of One-Trial Experience. *J Neurosci* **29**: 898 -906.
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, and Guzowski JF. 2008. Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 269-84.
- Moga DE, Calhoun ME, and Chowdhury A. 2004. Activity-regulated cytoskeletal-associated localized to recently activated excitatory synapses. *Neuroscience* **125**: 7-11.
- Molero A, Moron I, Angeles-Ballesteros M, Manrique T, Fenton A, and Gallo M. 2005. Hippocampus, temporal context and taste memories. *Chem Senses* **30 Suppl 1**: i160-1.
- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, and Schachner M. 1999. Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *J Neurobiol* **38**: 234-246.
- Morin J-P, Quiroz C, Mendoza-Viveros L, Ramirez-Amaya V, and Bermudez-Rattoni F. 2011. Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one. *Learn Mem* **18**: 610-6.
- Morris AL, Cleary AM, and Still ML. 2008. The role of autonomic arousal in feelings of familiarity. *Conscious Cogn* **17**: 1378-85.
- Núñez-Jaramillo L, Ramírez-Lugo L, Herrera-Morales W, and Miranda MI. 2010. Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav Brain Res* **207**: 232-48.
- Okuno H. 2011. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Res* **69**: 175-86.
- Park S, Park JM, Kim S, Kim J-A, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, Chowdhury S, Kaufmann W, Kuhl D, Ryazanov AG, et al. 2008. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* **59**: 70-83.
- Paxinos G, and Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, et al. 2006. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* **52**: 437-44.
- Ploski JE, Pierre VJ, Smucny J, Park K, Monsey MS, Overeem KA, and Schafe GE. 2008. The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci* **28**: 12383-12395.

- Polyn SM, Natu VS, Cohen JD, and Norman KA. 2005. Category-specific cortical activity precedes retrieval during memory search. *Science* **310**: 1963-6.
- Ramirez-Amaya V., Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, and Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* **25**: 1761.
- Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, and Cline HT. 2006. Increased expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* **52**: 461-74.
- Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutierrez R, and 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.
- Roman C, Lin J-Y, and Reilly S. 2009. Conditioned taste aversion and latent inhibition following extensive taste preexposure in rats with insular cortex lesions. *Brain Res* **1259**: 68-73.
- Rosen KM, McCormack MA, Villa-Komaroff L, and Mower GD. 1992. Brief visual experience induces immediate early gene expression in the cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 5437-41.
- Rosenblum K, Meiri N, and Dudai Y. 1993. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* **59**: 49-56.
- Scoville WB, and Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**: 11-21.
- Saddoris MP, Holland PC, and Gallagher M. 2009. Associatively learned representations of taste outcomes activate taste-encoding neural ensembles in gustatory cortex. *J Neurosci* **29**: 15386-96.
- Sauvage MM, Fortin NJ, Owens CB, Yonelinas AP, and Eichenbaum H. 2008. Recognition memory: opposite effects of hippocampal damage on recollection and familiarity. *Nat Neurosci* **11**: 16-8.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, and Worley PF. 2006. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* **52**: 475-84.
- Shi C-J, and Cassell MD. 1998. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol* **468**: 440-468.
- Simon SA, de Araujo IE, Gutierrez R, and Nicolelis MAL. 2006. The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci* **7**: 890-901.

- Soule J, Messaoudi E, and Bramham CR. 2006. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans* **34**: 600-4.
- Squire LR. 2009. The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* **61**: 6-9.
- Squire LR, Wixted JT, and Clark RE. 2007. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* **8**: 872-83.
- Squire LR, and Wixted JT. 2010. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* **34**: 259-288.
- Steward O. 2002. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem* **78**: 508-527.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, and Worley PF. 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* **21**: 741-51.
- Steward O, and Worley PF. 2001. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 7062-8.
- Steward O, and Worley PF. 2001. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* **30**: 227-240.
- Thompson RF. 2005. In search of memory traces. *Annu Rev Psychol* **56**: 1-23.
- Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, and Aggleton JP. 2000. Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J Neurosci* **20**: 2711-8.
- Vazdarjanova A, and Guzowski JF. 2004. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci* **24**: 6489-96.
- Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, and Steward O. 1998. Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci* **18**: 26-35.
- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, and Tonegawa S. 2006. In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* **126**: 389-402.
- Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, and Huber KM. 2008. Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* **59**: 84-97.

- Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, and Barnes CA. 1993. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* **13**: 4776-86.
- Yamamoto T, Matsuo R, Kiyomitsu Y, and Kitamura R. 1989. Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *J Neurophysiol* **61**: 1244-58.
- Yamamoto T, and Ueji K. 2011. Brain mechanisms of flavor learning. *Front Syst Neurosci* **5**: 76.
- Yefet K, Merhav M, Kuulmann-Vander S, Elkobi A, Bebelovsky K, Jacobson-Pick S, Meiri N, and Rosenblum K. 2006. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci* **24**: 1434-42.
- Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, and Aggleton JP. 1995. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* **69**: 821-9.

APÉNDICE

Una parte del trabajo descrito aquí fue publicado en forma de artículo de investigación original en la revista Learning & Memory, Molecules, Cells, Systems and Behavior de Cold Spring Harbor Laboratory Press, cuyo factor de impacto es de 4.6 para el 2010. Las páginas que siguen constituyen una reproducción del artículo, tal como fue publicado.



Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one

Jean-Pascal Morin, Cesar Quiroz, Lucia Mendoza-Viveros, et al.

Learn. Mem. 2011 18: 610-616

Access the most recent version at doi:[10.1101/lm.2323411](https://doi.org/10.1101/lm.2323411)

**Supplemental
Material**

<http://learnmem.cshlp.org/content/suppl/2011/09/15/18.10.610.DC1.html>

**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

Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one

Jean-Pascal Morin,¹ Cesar Quiroz,^{1,3} Lucia Mendoza-Viveros,¹ Victor Ramirez-Amaya,^{2,4} and Federico Bermudez-Rattoni^{1,4}

¹División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253, 04510 México D.F., México; ²Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro 76230, México

The immediate early gene (IEG) *Arc* is known to play an important role in synaptic plasticity; its protein is locally translated in the dendrites where it has been involved in several types of plasticity mechanisms. Because of its tight coupling with neuronal activity, *Arc* has been widely used as a tool to tag behaviorally activated networks. However, studies examining the modulation of *Arc* expression during and after learning have yielded somewhat contradictory results. Although some have reported that higher levels of *Arc* were induced by initial acquisition of a task rather than by reinstating a learned behavior, others have failed to observe such habituation of *Arc* transcription. Moreover, most of these studies have focused on the mRNA and, surprisingly, relatively little is known about how learning can affect *Arc* protein expression levels. Here we used taste recognition memory and examined *Arc* protein expression in the insular cortex of rats at distinct times during taste memory formation. Interestingly, we found that more *Arc* protein was induced by a familiar rather than by a novel taste. Moreover, this increase was inhibited by post-trial intrahippocampal anisomycin injections, a treatment known to inhibit safe-taste memory consolidation. In addition, confocal microscopy analysis of immunofluorescence stained tissue revealed that the proportion of IC neurons expressing *Arc* was the same in animals exposed to novel and familiar taste, but *Arc* immunoreactivity in dendrites was dramatically higher in rats exposed to the familiar taste. These results provide novel insights on how experience affects cortical plasticity.

[Supplemental material is available for this article.]

Neural activity relevant for stimuli encoding and processing has been closely associated with an increased expression of immediate early genes (IEGs) within activated neurons (e.g., Campeau et al. 1991; Koya et al. 2009). For this reason they have long been used as a tool to tag neuronal populations activated by specific behaviors (Guzowski et al. 2005). One of these IEGs, *Arc*, which encodes the activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Lyford et al. 1995) also known as Arg3.1 (Link et al. 1995), has been identified as an “effector” IEG whose expression is strongly induced by behaviorally relevant neural activity both in the hippocampus (Guzowski et al. 1999) and the cortex (Ramirez-Amaya et al. 2005). Importantly, it was shown that neurons that express *Arc* mRNA induced by a behavioral task also express the protein (Ramirez-Amaya et al. 2005). *Arc* protein is enriched in the neuronal soma and dendrites (Lyford et al. 1995) where it can be locally synthesized (Steward et al. 1998; Park et al. 2008). At the functional level, *Arc* has been shown to be essential for synaptic plasticity and memory consolidation (Guzowski et al. 2000;

Plath et al. 2006) and to participate in homeostatic plasticity (Shepherd et al. 2006), as well as mGluR1-dependent long-term depression (Park et al. 2008).

Evidence linking *Arc* mRNA expression and novelty/familiarity is rather unclear. Although some studies have directly linked increased *Arc* expression with the acquisition of a novel behavior (Kelly and Deadwyler 2002), many others failed to find such a relation. For example, one group found that *Arc* transcription did not habituate with overtraining in the spatial water-maze task (Guzowski et al. 2001). Yet another study found that the number of *Arc* expressing granule cells in the dentate gyrus were similar after the first or ninth exposure, suggesting that *Arc* mRNA expression in the dentate gyrus is not linked to the novelty of a sensorial experience (Chawla et al. 2005). Moreover, another study found that in CA3, the number of cells expressing *Arc* mRNA did not change regardless of the number of training trials or training days whereas in CA1, *Arc* mRNA was in fact increased once the trial had become familiar (Miyashita et al. 2009). Most strikingly, it was recently demonstrated that although *c-fos* expression was reduced after repeated pre-exposure to the same stressor, *Arc* responses failed to decrease in all but one of the studied areas (Ons et al. 2010). Fewer studies have focused on determining how much *Arc* protein levels can be affected by learning. One study reported that its levels went up in the frontal cortex after initial acquisition of a lever pressing task but were comparable to baseline after overtraining (Kelly and Deadwyler 2003). However, another group

³Present address: National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD 21224, USA.

⁴Corresponding authors.

E-mail fbermude@ifc.unam.mx.

E-mail vramirez1023@gmail.com.

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.2323411>.

using the Morris water maze found that Arc protein levels were still high after overtraining (Miyashita et al. 2008).

Familiarization with a gustatory stimulus that is not paired with gastric malaise is depending upon the formation of a safe taste memory trace (Bermudez-Rattoni 2004). Behaviorally, safe taste memory trace formation is observed by a gradual increase in the intake of flavored-water solution as a function of the number and the duration of prior periods of access to the solution and it was termed Attenuation of Neophobia (AN) (Domjan 1976) or safe Taste Recognition Memory (Bermudez-Rattoni 2004). Taste familiarization has been shown to be a gradual, updatable process dependent on several rounds of protein synthesis in the IC upon reactivation (Rodriguez-Ortiz et al. 2005). Also, it has been shown with a number of distinct methods that the activity of taste-responsive neurons in the IC can be modified with learning (Yasoshima and Yamamoto 1998; Bahar et al. 2004; Accolla and Carleton 2008). Furthermore, AN is a simple task that induces minimum stress and for which a range of molecular mechanisms have been identified (Bermudez-Rattoni 2004). To further elucidate the plasticity events in IC circuitry during taste learning, we investigated how Arc protein expression levels changed depending upon the novelty or the familiarity of a taste. We found that higher Arc protein levels are observed in the IC once the taste became familiar. This increase was dependent upon previous formation of safe taste memory and appeared to be limited to the dendrites. Our results contrast with the classical memory consolidation hypothesis but are in agreement with the ideas proposed more recently, suggesting that plasticity may occur constantly and continuously, coupled to the animal's experience (Miyashita et al. 2008).

Results

We sought to determine if the amount of Arc detected in the IC of rats after taste ingestion varied depending on how familiar they were with this taste. In order to determine the post-stimulus time required to observe a detectable Arc expression in the IC after fluid ingestion we presented rats with novel saccharin and sacrificed them at 30, 60, or 240 min after the onset of fluid ingestion. Comparisons with one-way ANOVA revealed significant differences between the groups ($F_{(3,21)} = 3.429$, $P < 0.05$). Fisher PLSD analysis showed that the 60 min group had significantly higher Arc levels than all others ($P < 0.05$ in all cases) (Fig. 1A, inset). Therefore, for the following experiments, comparisons were made at 60 min after the first (N), second (F2), and fifth (F5) saccharin presentation. Another group consisting of animals that drank water only (W) was also included. A one-way ANOVA revealed significant differences among the groups ($F_{(2,15)} = 9.075$, $P < 0.001$) (Fig. 1). Fisher post hoc analysis revealed that Arc levels were significantly superior in F2 group than in N and W groups ($P < 0.05$). Further, F5 Arc levels were also significantly higher than that of the N ($P < 0.01$) and W ($P < 0.01$) groups, although the difference between the F2 and F5 groups did not reach significance ($P = 0.16$). Together, these data indicate that familiar saccharin consumption induced higher Arc expression in the IC than novel taste did (Fig. 1A). On the other hand, Arc levels in the DH were similar after familiar and novel saccharin intake and both did not differ from control levels ($F_{(2,13)} = 0.414$, $P = 0.67$) (Fig. 1C).

Bilateral anisomycin injection in the DH after novel taste consumption has been shown to disrupt consolidation of AN (De la Cruz et al. 2008). We therefore wondered whether this treatment would also dampen the increment of Arc observed on the second day of saccharin presentation (see Fig. 1A). With this in mind, we performed post-trial intrahippocampal anisomycin

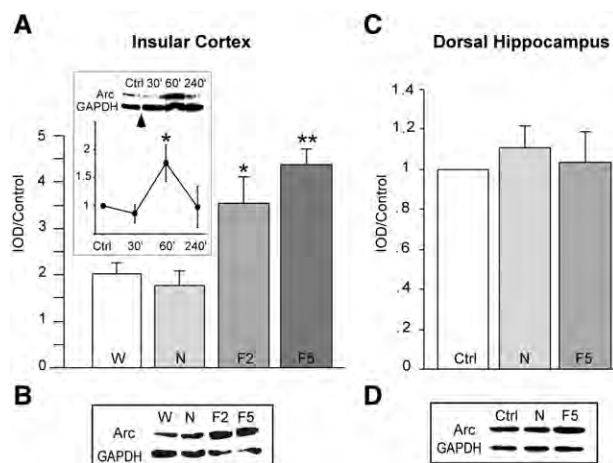


Figure 1. (A) Arc protein expression in the IC is higher after familiar (F2 and F5) rather than after novel (N) taste presentation, $n \geq 5$ per group; (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$. Inset: The time course of Arc protein expression following novel saccharin intake. (B) Representative blot of the analysis shown in A. (C) In the DH, Arc levels do not differ from control levels in both N and F5 groups. (D) Representative blot of the analysis shown in C. Values are mean \pm SEM, plotted as proportion of control.

injections immediately after the novel saccharin ingestion session and measured IC Arc levels 1 h after the second saccharin presentation (F2) on the following day. Students *t*-test revealed a significant difference between anisomycin injected rats and those injected with vehicle ($t_{(12)} = 2.263$, $P < 0.05$) (Fig. 2A). No difference was observed between the drug and vehicle groups when injections were performed the day before novel saccharin presentation ($t_{(8)} = 0.003$, $P = 0.99$) (Fig. 2B). Additionally, anisomycin injections after familiar (F5) saccharin did not alter taste-induced IC Arc levels on the following day ($t_{(8)} = 1.077$, $P = 0.313$) (Fig. 2C) indicating that DH anisomycin injections do not by themselves alter taste-induced IC Arc expression on the following day. Rather, these results suggest that optimal Arc expression in the IC after taste consumption is dependent upon previous familiarization with that same taste.

We next sought to evaluate: (1) the proportion of neurons in the IC expressing Arc after novel and familiar (fifth presentation) saccharin, and (2) the dendritic accumulation of the protein in both conditions. Early studies using neuroanatomical and electrophysiological techniques identified the dysgranular region of the IC as the gustatory cortex (Kosar et al. 1986a,b). Also, *in vivo* intrinsic imaging experiments showed that the anterior part of the IC responded best to taste modalities (Accolla et al. 2007). Further, a more recent study using neuronal activity mapping with Arc mRNA (Saddoris et al. 2009) indicates that the integration of taste-related information mostly occurs in the anterior dysgranular region of the IC. Finally, based on early electrophysiological evidence (Yamamoto et al. 1989), as well as in preliminary findings from our lab with Arc immunohistochemistry, we determined that layers IV/V best responded to taste stimulation. For these reasons, we decided to focus on the medial to deep layers of the dysgranular IC to perform our immunohistochemical analysis (Supplemental Fig. S2). We used double immunofluorescence vs. Arc and MAP-2 and nuclei counterstaining to compare (1) the proportions of Arc expressing neurons and (2) the dendritic expression of Arc in between the two conditions. Immunohistochemical detection of Arc in control animals revealed relatively low levels of staining (7.52% Arc+ neurons out of 244 ± 42 analyzed neurons/animal, $n = 5$). Sparse, discrete units were detected, sometimes with dendritic immunoreactivity

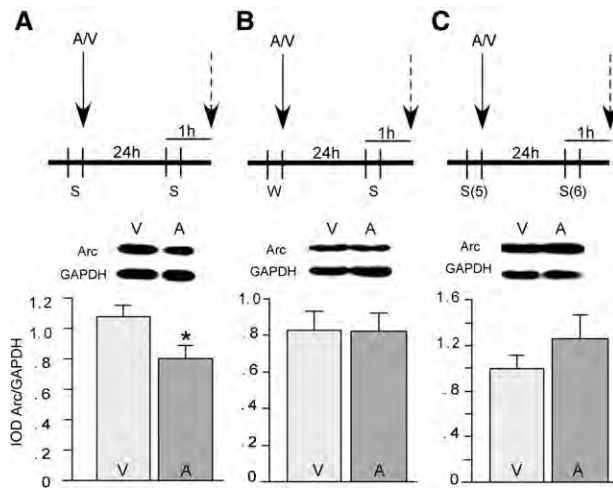


Figure 2. (A) Intrahippocampal bilateral anisomycin injections after novel taste consumption, a treatment known to inhibit AN, altered Arc expression in the IC induced by the second saccharin presentation (F2) (B) Intrahippocampal anisomycin injections 24 h before novel saccharin had no effect on IC Arc expression following Nov. (C) Injecting anisomycin in the hippocampus once the taste memory is consolidated (after F5) did not affect Arc expression in the IC induced by saccharin presentation on the following day. A, anisomycin; V, vehicle; W, water; S, saccharin; numbers between parentheses, days of saccharin presentation; (*) $P < 0.05$, $n \geq 5$ in all groups. (Above) Scheme of the behavioral procedures, the dashed arrow represents the moment of sacrifice after which IC were processed for WB analysis. Values are mean \pm SEM, plotted as IOD Arc/IOD GAPDH.

(data not shown). Cell counting analysis on saccharin-drinking animals revealed that on average, 22.28% of neurons were found to be Arc+ after novel (N) taste (263 ± 44 neurons/animal, $n = 5$) and 20.67% after familiar (F5) taste (288 ± 38 neurons/animal, $n = 5$), both figures being very similar to what has been reported in other studies on taste learning that evaluated Arc mRNA levels (Barot et al. 2008; Saddoris et al. 2009). When comparing the percentage of neurons expressing Arc protein in both conditions, no difference was detected between N and F5 ($t_{(8)} = 0.96$, $P = 0.37$), indicating that the same proportion of neurons were activated in the IC by a familiar and a novel taste stimulus (Fig. 3C). However, the area of Arc/MAP-2 colocalization was significantly greater in the familiar condition ($t_{(8)} = 4.08$, $P < 0.01$) suggesting that a familiar taste-induced higher dendritic Arc expression (Fig. 3D). Also, the immunoreactive area for MAP-2 did not vary significantly between conditions ($t_{(8)} = 0.38$, $P > 0.71$) (Fig. 3E). Finally, we used Manders' M_1 colocalization coefficient (see Materials and Methods) to confirm that the increase observed in the colocalization area was due to an increase in dendritic expression and not to a global increase in Arc immunoreactivity. As expected, averaged M_1 coefficients were significantly superior in the familiar condition ($t_{(8)} = 3.09$, $P < 0.05$) indicating that in the IC, a greater amount of Arc protein was present in the dendrites after a familiar taste as compared to a novel one (Fig. 3F).

Discussion

Familiar saccharin consumption induced greater Arc protein levels in the IC than that induced by novel saccharin, whereas in the DH Arc protein expression was similar to basal levels in both conditions. Post-trial anisomycin infusion in the DH attenuated the increase of Arc expression in the IC observed after the second presentation of saccharin. Finally, we observed that the same proportion of cells expressed Arc protein in both conditions, but a

substantially greater dendritic accumulation was observed in the familiar condition.

Some studies evaluating the dynamics of expression of plasticity-related factors in the IC during taste learning have reported an increase in the expression of c-fos and PSD-95 in a time window following the presentation of a novel but not a familiar taste (Koh et al. 2003; Elkobi et al. 2008). These findings are consistent with a role of these plasticity-related factors in the consolidation of the information related to the novel stimulus. Combined with the earlier works that found that novel taste-induced post-translational modifications (Rosenblum et al. 1997; Berman et al. 1998), they have led some investigators to propose that novel taste presentation represents by itself a one-trial learning, in which consolidation takes place during the hours following intake (Yefet et al. 2006). Our findings are in fact at odds with a role of de novo Arc protein synthesis in such a scenario. Should this be the case, one would expect to observe an increase in Arc protein expression after novel taste presentation, which would return to basal levels as the taste becomes familiar. Interestingly however, an earlier report found a persistent activation of Erk pathway in the IC after novel taste that was even more robust when the taste was familiar. This finding led the investigators to propose that persistent activation of the Erk pathway is

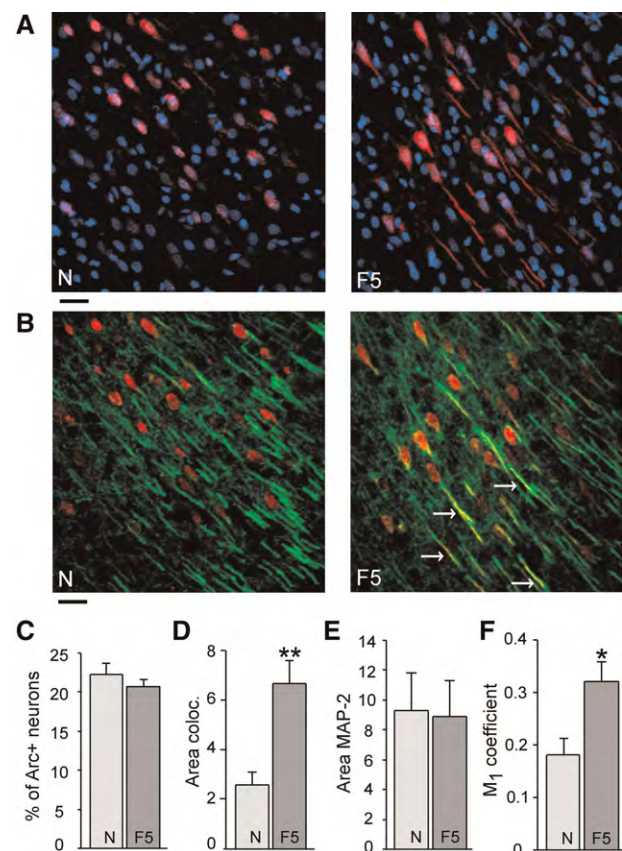


Figure 3. (A, B) Representative images of Arc expression in the IC following novel (N) and familiar (F) taste presentation. Blue, DAPI; green, MAP-2; red, Arc. Colocalization Arc/MAP-2 appears as yellow (arrows). Scale bar on the bottom left represents 25 μm . (C) Percent of neurons expressing Arc protein in each condition; $n = 5$ animals per condition. (**) $P < 0.01$. (D) Dendritic accumulation of Arc protein expressed as the area of colocalization with MAP-2 in pixels. (**) $P < 0.01$. (E) Averaged area of MAP-2 immunoreactivity. (F) M_1 colocalization coefficients; $n = 5$ animals per condition. (*) $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM.

required for retention of taste memory (Swank and Sweatt 2001). As Arc is a downstream target of Erk (Waltereit et al. 2001), our data could be explained at least in part by this persistent MAPK activation. Additionally, an early study that used nonfluorescent *in situ* hybridization to analyze various areas of the brain after familiar vs. novel taste presentation found that in the cingulate cortex, the parietal cortex, and the dentate gyrus, more cells expressed Arc after novel saccharin than after familiar saccharin, although importantly they did not report any change in the IC (Montag-Sallaz et al. 1999). Our study extends these findings by showing that the proportion of cells that express the protein is also similar in both conditions, but also by revealing that these same cells have substantially more Arc, possibly more specifically in their dendrites. However, our results contrast with what was reported for c-fos, another IEG, after novel taste learning (Koh et al. 2003). Interestingly, it has been reported that c-fos but not arc expression rapidly decreases after repeated exposures to a stressor (Ons et al. 2010). This difference may explain the discrepancy between that and our study and it also shows that different IEGs may be reporting distinct phenomena.

Using multi-unit recording to assess the issue of how familiarity to a taste is processed and codified in the IC, one group of researchers found that when a familiar stimulus was presented, the average neuronal response was higher than that which followed novel taste presentation, suggesting that a “familiarity signature” had been established (Bahar et al. 2004). Interestingly, this increase is detected specifically throughout the late phase of the response, which overlaps with a time window during which palatability coding takes place (Katz et al. 2001). This strengthens the idea that this increased firing is indeed related to familiarity coding as familiarization with a taste induces a shift in its hedonic properties—the phenomenon of AN (Bermudez-Rattoni 2004). Given the strong correlation between Arc protein expression and neural activity (Lyford et al. 1995), and the numerous signalization pathways that can work in concert to increase ARC expression (Waltereit et al. 2001; Kawashima et al. 2009; Pintchovski et al. 2009), it is possible that different patterns of neural activity could induce variable amounts of Arc within a single cell and therefore explain the phenomenon we reported here. Alternatively it is possible that in our behavioral paradigm, the increased dendritic Arc protein is the product of local activation of mGLUR1. These receptors have recently been shown to promote local translation of existing Arc transcripts, which is essential for mGLUR-dependent LTD. Moreover, Group I metabotropic receptors are Gq-coupled receptors known to play a role in object recognition memory (Lüscher and Huber 2010), a task that has been proposed to share mechanisms with safe taste recognition memory or AN (Bermudez-Rattoni 2004).

Now the obvious intrigue is why would more Arc be required after the presentation of a familiar stimulus? Could it serve any specific role in memory updating, stabilization, or reconsolidation? As mentioned previously, many diverse functions of Arc in plasticity have been reported such as a role in the maintenance phase of LTP (Guzowski et al. 2000), a role in mGLUR-dependent LTD (Park et al. 2008) and a role in homeostatic down-regulation of AMPA receptors (Chowdhury et al. 2006; Shepherd et al. 2006). In light of this, we could speculate that the increase in Arc protein we observe in the familiar condition would serve to homeostatically regulate gustatory neurons of the gustatory cortex that are repetitively activated by the presentation of the same stimulus. In this scheme, Arc would act as a homeostatic modulator of synaptic weights, stabilizing a memory trace every time it is reactivated. Alternatively, this proposed stabilization could occur in a metaplasticity-like fashion, as suggested earlier (Shepherd and Bear 2011), and serve to increase the threshold for further plasticity mechanisms to occur, thus making them less likely.

Interestingly, based on the data obtained with Arc mRNA and Arc protein expression dynamics briefly discussed earlier, it was recently suggested that plasticity events are still occurring when a behavior is reinstated (Miyashita et al. 2008). Our data are also in accordance with such a model and are also hard to reconcile with the “classic” memory consolidation hypothesis that sustains that once synaptic modifications that represent a memory trace are encoded and consolidated, the memory remains in an immutable stable state permanently. However, we cannot rule out that some reconsolidation process is occurring when a familiar taste is presented, even when a behavioral plateau has been reached and therefore, no further updating of the memory trace is necessary. Further experiments analyzing the behavioral consequences of directly or indirectly manipulating Arc protein levels during safe taste memory formation are needed to clarify this issue.

Methods

Subjects

All experimental animals were handled in accordance with the rules and guidelines of the local animal care committee. A total of 122 male *Wistar* rats weighing between 270 and 300 g were housed individually, maintained on a 12-h dark/light cycle, and given rat chow and water ad libitum until the beginning of the experiments.

Behavioral procedures

For all the duration of the behavioral procedures, access to drinking fluid was restricted to twice a day: a morning session of 15 min, with volume restricted to 5 mL, and an afternoon session of the same duration with unrestricted access to water, which served to properly hydrate the animals. The first 5 d of restricted access to fluid consisted of a habituation session during which animals were given water only. The restricted volume was set to 5 mL and the concentration to 0.5% based on previous studies on taste learning (Rosenblum et al. 1997; Bernstein and Koh 2007) and confirmed by our behavioral data (Supplemental Fig. S1). This was done to avoid significant differences between the groups in the amount of liquid ingested that is characteristic of AN. Our volume restriction protocol did not affect familiarization with the taste and by the fifth presentation of saccharin, a behavioral plateau was reached in both restricted and unrestricted AN protocols (see Supplemental Fig. S1).

For the first experiment aimed at establishing the time course of arc expression after fluid intake, rats were given novel saccharin and killed at 30, 60, or 240 min after the beginning of the drinking session. A control group consisting of water-deprived animals that received no taste stimulation was also included. The following experiments were aimed at evaluating if taste-induced Arc protein expression in the IC was affected by the degree of familiarization with the taste. Rats were divided into three saccharin-drinking groups (novel, familiar 2, and familiar 5) in addition to a water group and the control group mentioned previously (Ctrl). The novel (N) group drank water on days 6–9, and on day 10 the daily water ration was replaced by a 0.5% solution of sodium saccharin. The familiar 2 (F2) group was given the saccharin solution instead of water on days 9 and 10. The familiar (F5) group was given saccharin solution instead of water from days 6–10. Finally, the water group (W) was given only water up to day 10. All animals of this experiment were sacrificed 1 h after the beginning of the drinking session of day 10 and processed for Western blot or immunohistochemistry. Note that by systematically restricting the volume to 5 mL, we ensured that all animals drank the same amount of the saccharin solution 1 h before being sacrificed, the only difference between the groups being how familiar they were with the taste.

For the anisomycin experiment, intrahippocampal anisomycin/vehicle injections were performed either 24 h before novel saccharin presentation after water drinking, immediately after

novel saccharin, or immediately after familiar saccharin. On the day following the injection, animals were presented saccharin and sacrificed.

Western blotting

Insular cortices from both hemispheres were carefully dissected and quickly immersed in 200 μ L of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet NP-40, 1% SDS, full protease inhibitors (Roche Applied Biosystems), 5 mM NaF and 2 mM Na₃VO₄ and homogenized by sonication. The resulting homogenates were centrifuged at 1500g for 10 min at 4°C and frozen at -80°C until processed. Equal volumes of homogenate from each condition were subjected to 10% SDS-PAGE at 125 V for 65 min and proteins were transferred to Immobilon-P membranes (Bio-Rad) at 25 V for 40 min. The membranes were then blocked overnight at 4°C with TBST buffer (Tris 10 mM, NaCl 0.9%, Tween-20 0.2%, pH 7.5) with 5% bovine serum albumin. On the following day, membranes were incubated in blocking buffer containing affinity purified rabbit anti-Arc polyclonal antibody (1:500; Synaptic Systems) during 90 min, then washed (4 times/7 min in TBST) and put in a 1:20,000 solution of HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen) for 1 h. After washing, membranes were incubated for another hour in 1:10,000 in mouse anti-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Chemicon) in blocking buffer, washed again and then incubated for 45 min in HRP-goat anti-mouse (Zymed) at 1:20,000 in TBST. Chemiluminescent reaction was then carried out with the SuperSignal West Pico Substrate kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. The reaction was then exposed to photographic films that were subsequently digitized. Integrated optical densities of blots were quantified using NIH software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

Surgical procedures and drug injections

Rats were deeply anesthetized with ketamine:xylazine (22:2.6 mg/rat) and secured on a stereotaxic frame. Cannulas were implanted in the DH using the following coordinates: AP. 3.6, Lat. \pm 3, V. 1.3 mm from bregma according to a rat brain atlas (Paxinos and Watson 2007). Two 5-mm screws were fixed to the skull with dental acrylic cement to help stabilize the cannulas. Animals were then allowed to recover for at least one week before the beginning of the experimental procedures. Rats were gently handled for 3 d before the injection took place in order to minimize stress. On the day of the injection, injector tips were aimed 2 mm below the ends of the cannulas and the drug was infused in each hemisphere at a 1 μ L/min infusion rate. Anisomycin (Sigma) was dissolved in equimolar HCl and adjusted to 120 μ g/ μ L, pH 7.4 in vehicle solution (ACSF [mM]: 125 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄ H₂O, 1.5 MgSO₄ 7 H₂O, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 2.5 CaCl₂).

Immunohistochemistry

Rats were perfused with a saline solution with heparin at body temperature for <5 min and then with ice-cold formaldehyde solution at 4% in 0.1 M phosphate buffer. Whole brains were dissected and stored at 4°C in 30% sucrose in 0.15 M phosphate buffer containing 0.9 NaCl (PBS) until they sank. Twenty-micrometer coronal slices situated at the level of the gustatory insular cortex were then cut with a microtome maintained cold with a CO₂ pump. Slices were recovered in PBS and immediately processed for double immunohistochemistry. Briefly, free-floating sections were rinsed and soaked in PBS with 1%NaBH₄ for 8 min. Sections were then washed abundantly and incubated in a blocking buffer consisting of 5% BSA and 0.3% Triton in PBS during 1 h. Then, sections were incubated in 1:1000 polyclonal rabbit anti-Arc 1:1000 (generous gift from Paul Worley's laboratory); 1:250 monoclonal mouse anti-Microtubule associated protein 2a, b (Chemicon) in the blocking buffer during 38 h at 4°C followed by 30 min at room temperature. Posteriorly, sections were

washed and incubated in 1:500 Alexa594 goat anti-rabbit (Invitrogen); 1:200 FITC-coupled goat-anti-mouse (Chemicon) in PBS with 0.3% triton. Sections were then washed, counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slices were then protected with a Vectashield mounting medium (Vector Laboratories), cover-slipped, and sealed with nail polish. Note that the two Arc primary antibodies that we used yielded very similar staining and the same immunoblot band at ~58 kDa (data not shown).

Confocal microscopy

A Zeiss LSM 510 META microscope equipped with a multiphoton Chameleon laser (Coherent) set at 750 nm, a HeNe laser at 561 nm, and an argon at 488 nm was used to obtain Z-section images of the immunostained tissue. All settings were optimized using the first section on every slide, which belonged to a control animal. These settings were then maintained constant for the remaining sections on the same slide (which corresponded to one immunohistochemistry run). One capture of every condition was performed during the same day in order to diminish possible variation in the apparatus (Hibbs 2004). Z-stacks had 0.55- μ m optical thickness and were collected with a 40X oil-immersion objective with 1.3 N.A. For each subject, images were captured at layers IV and V of the dysgranular IC from at least three different slices located between 1.2 and 1.7 mm anterior to bregma. The mosaic presented in Figure 3 was captured with a Zeiss Apotome microscope and represents the region where the images were taken.

Image analysis

All analyses were performed using NIH ImageJ software. For each slide, experimental conditions were assigned a code for the experimenters to perform a blind analysis. Cells were classified as neuronal or non-neuronal, by visualizing them through the whole image stack. Cells with small intensely bright and uniformly stained nuclei, as revealed with DAPI, can be identified as non-neuronal (Vazdarjanova and Guzowski 2004) and were therefore excluded from the analysis. All nuclei with shaded, heterogeneous staining that could be identified as pertaining to neurons (Vazdarjanova and Guzowski 2004) were included in every 40X image stack. Nuclei included in the analysis were those detected in the medial plane of the z-stack as described earlier (Ramirez-Amaya et al. 2005) and averaged ~54 neurons per stack. We then analyzed the proportion of Arc+ neurons as described previously (Ramirez-Amaya et al. 2005). For colocalization analysis, Z-projections were performed and an automatic contrast was applied to each channel for each conditions. A "median" filter (1 pixel radius) was systematically applied to each stack as recommended when analyzing colocalization in large samples with relatively low resolution (Landmann and Marbet 2004). Total colocalization area was obtained using a colocalization plugin (Bourdoncle 2003). MAP-2 immunoreactive areas were calculated from binary images obtained from original Z-projections. Manders' M_1 colocalization coefficients (Manders et al. 1993) were obtained using a JaCoP plug-in (Bolte and Cordelieres 2006). In our case, the M_1 colocalization coefficient was obtained after establishing an automatic threshold and it indicates the proportion of red pixels (immunoreactivity to Arc) that colocalizes with green pixels (immunoreactivity to MAP-2) according to the following formula:

$$M_1 = \frac{\sum_i red_i \cdot colocol}{\sum_i red_i}$$

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov tests were conducted in all individual groups to test for normal distribution of the data. Where indicated, one-way ANOVA with Fisher's post hoc test and unpaired Students *t*-tests were performed to test for statistical significance (*P* values <0.05). All statistical analyses were conducted using StatView software.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT 60478 (to F.B.R.) and 51028 (to V.R.A.) and PAPIIT IN216709 (to F.B.R.) and IN213907 (to V.R.A.). We thank Perla Moreno Castilla, Israela Balderas, and Elsa Nydia Hernández-Ríos for high-quality technical assistance. J.P.M. received a scholarship from the Coordinación de Estudios de Posgrado de Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This study was performed in partial fulfillment of J.P.M.'s requirements for a doctorate degree in Biomedical Sciences at UNAM.

References

- Accolla R, Carleton A. 2008. Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 4010–4015.
- Accolla R, Bathellier B, Petersen CC, Carleton A. 2007. Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci* **27**: 1396–1404.
- Bahar A, Dudai Y, Ahissar E. 2004. Neural signature of taste familiarity in the gustatory cortex of the freely behaving rat. *J Neurophysiol* **92**: 3298–3308.
- Barot SK, Kyono Y, Clark EW, Bernstein IL. 2008. Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20959–20963.
- Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. 1998. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci* **18**: 10037–10044.
- Bermudez-Rattoni F. 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* **5**: 209–217.
- Bernstein IL, Koh MT. 2007. Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses* **32**: 99–103.
- Bolte S, Cordelières FP. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* **224**: 213–232.
- Bourdoncle P. 2003. *Colocalization plugin in Java*. Institut Jacques Monod, Service Imagerie, Paris, France.
- Campeau S, Hayward MD, Hope BT, Rosen JB, Nestler EJ, Davis M. 1991. Induction of the *c-fos* proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res* **565**: 349–352.
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. 2005. Sparse, environmentally selective expression of *Arc* RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* **15**: 579–586.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. 2006. *Arc/Arg3.1* interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* **52**: 445–459.
- De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, 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.
- Elkobi A, Ehrlich I, Belevsky K, Barki-Harrington L, Rosenblum K. 2008. ERK-dependent PSD-95 induction in the gustatory cortex is necessary for taste learning, but not retrieval. *Nat Neurosci* **11**: 1149–1151.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* **2**: 1120–1124.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. 2000. Inhibition of activity-dependent *arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* **20**: 3993–4001.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J Neurosci* **21**: 5089–5098.
- Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. 2005. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr Opin Neurobiol* **15**: 599–606.
- Hibbs AR. 2004. *Confocal microscopy for biologists*. Springer, New York.
- Katz DB, Simon SA, Nicolelis MA. 2001. Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J Neurosci* **21**: 4478–4489.
- Kawahama T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. 2009. Synaptic activity-responsive element in the *Arc/Arg3.1* promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 316–321.
- Kelly MP, Deadwyler SA. 2002. Acquisition of a novel behavior induces higher levels of *Arc* mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* **110**: 617–626.
- Kelly MP, Deadwyler SA. 2003. Experience-dependent regulation of the immediate-early gene *Arc* differs across brain regions. *J Neurosci* **23**: 6443–6451.
- Koh MT, Wilkins EE, Bernstein IL. 2003. Novel tastes elevate *c-fos* expression in the central amygdala and insular cortex: Implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci* **117**: 1416–1422.
- Kosar E, Grill HJ, Norgren R. 1986a. Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain Res* **379**: 329–341.
- Kosar E, Grill HJ, Norgren R. 1986b. Gustatory cortex in the rat. II. Thalamocortical projections. *Brain Res* **379**: 342–352.
- Koya E, Golden SA, Harvey BK, Guez-Barber DH, Berkow A, Simmons DE, Bossert JM, Nair SG, Uejima JL, Marin MT, et al. 2009. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. *Nat Neurosci* **12**: 1069–1073.
- Landmann L, Marbet P. 2004. Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microsc Res Tech* **64**: 103–112.
- Link W, Komietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 5734–5738.
- Lüscher C, Huber KM. 2010. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: Mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron* **65**: 445–459.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. 1995. *Arc*, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**: 433–445.
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. 1993. Measurement of colocalization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* **169**: 375–382.
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF. 2008. Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 269–284.
- Miyashita T, Kubik S, Haghghi N, Steward O, Guzowski JF. 2009. Rapid activation of plasticity-associated gene transcription in hippocampal neurons provides a mechanism for encoding of one-trial experience. *J Neurosci* **29**: 898–906.
- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M. 1999. Novelty-induced increased expression of immediate-early genes *c-fos* and *arg 3.1* in the mouse brain. *J Neurobiol* **38**: 234–246.
- Ons S, Rotllant D, Marin-Blasco IJ, Armario A. 2010. Immediate-early gene response to repeated immobilization: Fos protein and *arc* mRNA levels appear to be less sensitive than *c-fos* mRNA to adaptation. *Eur J Neurosci* **31**: 2043–2052.
- Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, Chowdhury S, Kaufmann W, Kuhl D, Ryazanov AG, et al. 2008. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of *Arc/Arg3.1* essential for mGluR-LTD. *Neuron* **59**: 70–83.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Academic, San Diego, CA.
- Pintchovski SA, Peebles CL, Kim HJ, Verdin E, Finkbeiner S. 2009. The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate-early gene *Arc/Arg3.1* in neurons. *J Neurosci* **29**: 1525–1537.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, et al. 2006. *Arc/Arg3.1* is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* **52**: 437–444.
- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced *Arc* mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* **25**: 1761–1768.
- Rodriguez-Ortiz CJ, 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 DE, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y. 1997. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* **17**: 5129–5135.
- Saddoris MP, Holland PC, Gallagher M. 2009. Associatively learned representations of taste outcomes activate taste-encoding neural ensembles in gustatory cortex. *J Neurosci* **29**: 15386–15396.
- Shepherd JD, Bear MF. 2011. New views of *Arc*, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci* **14**: 279–284.

- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. 2006. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* **52**: 475–484.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG *Arc* to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* **21**: 741–751.
- Swank MW, Sweatt JD. 2001. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J Neurosci* **21**: 3383–3391.
- Vazdarjanova A, Guzowski JF. 2004. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: Evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci* **24**: 6489–6496.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D. 2001. Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* **21**: 5484–5493.
- Yamamoto T, Matsuo R, Kiyomitsu Y, Kitamura R. 1989. Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *J Neurophysiol* **61**: 1244–1258.
- 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.
- Yefet K, Merhav M, Kuulmann-Vander S, Elkobi A, Belevsky K, Jacobson-Pick S, Meiri N, Rosenblum K. 2006. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci* **24**: 1434–1442.

Received June 21, 2011; accepted in revised form July 19, 2011.