



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

LOCALIZACIÓN MEMBRANAL Y
CITOPLASMÁTICA DE RECEPTORES AMPA EN LA
CORTEZA INSULAR EN LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO GUSTATIVA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:
LUCÍA MENDOZA VIVEROS

Tutor: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2012



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.

Este proyecto de maestría fue realizado bajo la supervisión del Dr. Federico Bermúdez Rattoni en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el proyecto estuvo compuesto por:

Dr. Federico Bermúdez Rattoni	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Rosalinda Guevara Guzmán	Facultad de Medicina, UNAM.
Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce el apoyo técnico en el laboratorio de la Dra. Israela Balderas y de la Q.F.B. Perla Moreno, así como de Oreste Carbajal.

El proyecto fue apoyado económicamente por CONACYT (60478, 155242) y DGAPA-UNAM (IN216709). Asimismo, durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y un apoyo de DGEP-UNAM.

El Jurado de Examen Profesional estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Diana Escalante Alcalde
Vocal	Dra. Ivette Caldelas Sánchez
Vocal	Dra. Gohar Gevorgyan Markosian
Vocal	Dra. Angélica Zepeda Rivera
Secretario	Dra. Lourdes Massieu Trigo

A mis padres, Eréndira y Gerónimo, y mis hermanos Beto y Gero. Gracias por todas sus enseñanzas, enorme apoyo, cariño y confianza.

A mis amigas y amigos: Diana, Luisa, Adriana, Arturo, Lorena, Daniela, Beatriz, Ernesto. Soy afortunada por haber crecido con personas extraordinarias como ustedes.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Kioko, Daniel, Consuelo, Aketzali, Mónica, Jorge, Cristina, Azul, Julio. Gracias por hacer del trabajo diario un trabajo en equipo.

A Marco. Gracias por ser la inspiración para que todos los días se cumplan nuestros sueños.

Índice

INTRODUCCIÓN	6
MECANISMOS MOLECULARES DE LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA	8
TRÁFICO DE RECEPTORES AMPA EN PLASTICIDAD RELACIONADA A LA EXPERIENCIA	14
MEMORIA GUSTATIVA	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
MÉTODO	25
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	30
REFERENCIAS	39

Resumen

En los organismos, para que la información nueva se almacene a largo plazo es necesario que ocurran cambios en el cerebro, que forman parte del proceso llamado consolidación. En el aprendizaje de reconocimiento de sabor seguro, el animal se familiariza con un sabor nuevo, y ante la ausencia de consecuencias gástricas aversivas, lo reconoce como inocuo. Un área cerebral importante en este proceso es la corteza insular. Algunos de los cambios que ocurren en esta estructura ante la novedad del estímulo gustativo son la liberación de acetilcolina, la acumulación en balsas lipídicas y fosforilación de subunidades del receptor NMDA, y la expresión de genes inmediatos como *c-fos*. En cambio cuando ya se ha establecido el estímulo gustativo como familiar, ocurren otros cambios como el aumento en la respuesta electrofisiológica de las neuronas de la corteza gustativa, y aumento en la expresión de la proteína Arc, que es un gen inmediato indispensable para la formación de la memoria. Aunque aún no está claro de qué manera Arc participa en la plasticidad sináptica relacionada a la experiencia, uno de los roles propuestos para esta proteína es en la homeostasis sináptica, promoviendo la endocitosis de receptores AMPA. En este modelo, la información obtenida por la experiencia del organismo sería codificada a través de cambios en la excitabilidad de algunas sinapsis del sistema, por fenómenos tipo *hebbianos* análogos a la potenciación a largo plazo. Posteriormente habría un proceso homeostático para devolver al sistema a un nivel basal de actividad global, pero conservando los pesos sinápticos diferenciales que codificaron la información, y Arc participaría en ello.

Se ha reportado que en un paradigma de memoria de reconocimiento del sabor seguro, la expresión de la proteína Arc en las dendritas de neuronas de la corteza gustativa es mayor cuando el animal ha bebido un sabor familiar en comparación a uno novedoso. Es por ello que en este proyecto se monitoreó la localización de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en muestras de la corteza insular en tres distintos estadios de la formación de este tipo de memoria: cuando el sabor era novedoso, cuando se consumió por segunda vez y cuando se consumió por quinta vez, en tres puntos temporales en cada uno. Esto se llevó a cabo a través del *crosslinking* de proteínas membranales previo al lisado, electroforesis e inmunodetección por Western Blot.

Los resultados muestran que no hay un cambio significativo en la localización membranal con respecto a la intracelular de la subunidad GluR2 antes de consumir el estímulo (sacarina 0.5%), a los 15 y los 60 minutos, cuando el sabor es novedoso. Tampoco se encuentran cambios significativos cuando es la segunda vez que se consume. Sin embargo, cuando es la quinta aproximación al estímulo, a los 60 minutos de comenzar el consumo hay una disminución de la fracción membranal de GluR2 con respecto a la intracelular.

Siendo GluR2 la subunidad del receptor AMPA más abundante en la corteza e hipocampo, el presente estudio es una primera aproximación al uso del *crosslinking* de proteínas membranales para monitorear cambios en la localización de receptores en muestras de tejido de animales que han realizado conductas, lo cual es metodológicamente complejo. Asimismo, la disminución de la subunidad GluR2 localizada en la membrana podría ser parte de un mecanismo homeostático que contrarreste los cambios sinápticos que soportan un aumento en la respuesta de las neuronas de la corteza gustativa ante un estímulo muy familiar.

Introducción

Una habilidad fundamental para la sobrevivencia de los organismos es modificar su conducta para ajustarse a las características de su ambiente, es decir, aprender de la experiencia. Esto se logra mediante el aprendizaje, definido como la adquisición de nueva información, y la memoria, que es la retención de tal información en el largo plazo (Tsien, 2006). Para que estos procesos cognitivos ocurran es necesario que sucedan cambios en las conexiones entre las neuronas y las redes que forman.

El proceso de formación de una memoria puede dividirse en tres etapas (Guzmán-Ramos, 2010). En la *adquisición* los organismos obtienen información acerca del ambiente; se considera que en esta etapa se da el aprendizaje. La *consolidación* es un proceso de estabilización progresiva de la memoria, mientras que la *evocación* es la recuperación espontánea o involuntaria de la información adquirida y almacenada.

Adicionalmente se considera a la *reconsolidación* de la memoria como un proceso en el que la presentación de un estímulo relacionado al aprendizaje original causa la reactivación de la memoria y que ésta se actualice (McKenzie y Eichenbaum, 2011).

El objetivo primordial de las neurociencias cognitivas es explicar el comportamiento a través de las funciones biológicas, siendo el cerebro el centro de atención para ello. Para el estudio de la memoria se han utilizado diversos modelos animales y diferentes tareas conductuales. Esto con el objetivo de establecer tanto reglas generales como especie-específicas sobre cómo es que los organismos seleccionan la información relevante, la agregan al conocimiento previo, la almacenan de tal manera que no se pierda con el tiempo, y la mantienen accesible para expresar conductas mejor adaptadas en el futuro (Menzel, 2008).

Décadas de experimentación tanto en sujetos humanos como en modelos animales han dejado claro que la memoria no es una entidad unitaria, sino que existen diferentes sistemas que la componen. Se han hecho distinciones generales de acuerdo a varios criterios; por ejemplo el tiempo transcurrido entre la adquisición y la evocación. En los humanos esto ha sido categorizado de maneras muy complejas que van desde la memoria sensorial - breve persistencia de la percepción de un estímulo-, hasta la memoria a largo plazo, que varía en definición desde 15 segundos hasta décadas (Roediger et al., 2008). En los estudios con roedores, sin embargo, la taxonomía de la memoria con respecto al tiempo es más sencilla. La distinción entre memoria a corto y largo plazo se ha hecho de acuerdo a la susceptibilidad del

trazo a la administración de inhibidores de síntesis de proteínas (Davis y Squire, 1984). Como consenso, se habla de memoria a largo plazo cuando un aprendizaje persiste por más de 24 horas.

Sin embargo el paso de una memoria del corto al largo plazo es un proceso paulatino. La noción de que la memoria se estabiliza progresivamente fue propuesta originalmente en 1900 por Müller y Pilzecker (en Lechner et al., 2009). *Experimental Contributions to the Science of Memory* es un extenso reporte que conjuntó 40 experimentos donde se estudió cómo se aprendían y olvidaban listas de sílabas sin sentido. En él, Müller y Pilzecker plantearon que el aprendizaje no produce instantáneamente una memoria permanente, sino que ésta toma tiempo en ser fijada o consolidada. En consecuencia, una memoria es susceptible de ser interrumpida por un periodo de tiempo posterior al aprendizaje.

Actualmente, la consolidación de la memoria se refiere a la estabilización post-adquisición de la memoria a largo plazo, así como a la fase temporal en la que dicha estabilización se lleva a cabo. Adicionalmente se divide en dos tipos: consolidación sináptica y de sistemas (Dudai, 2004). La consolidación sináptica implica la estabilización de cambios en la conectividad sináptica en circuitos localizados, y ocurre en cuestión de horas. La consolidación de sistemas es un proceso que toma más tiempo, mientras gradualmente se reorganizan las distintas regiones involucradas en la memoria (Frankland y Bontempi, 2005). Tales términos corresponden a fenómenos en niveles de análisis distintos, pero es probable que ocurran simultáneamente y que compartan elementos, ya que cambios en conexiones entre regiones del cerebro pueden requerir modificaciones en las sinapsis (Miyashita et al., 2008). Todos estos cambios forman parte del posible mecanismo a través del cual se codifica y almacena la información en el cerebro, lo cual será revisado con más detenimiento en la siguiente sección.

Mecanismos moleculares de la formación de la memoria

Un supuesto fundamental en el campo de la neurobiología de la memoria es la existencia de un “trazo” físico en la forma de una red de neuronas que codifique la información. Para demostrarlo experimentalmente deben cumplirse ciertos requisitos: que existan neuronas localizadas e identificadas que sean esenciales para un tipo de memoria en particular, en las cuales ocurran procesos plásticos que son a su vez necesarios para la formación de esta memoria. Asimismo, si estas neuronas se encuentran inactivas por alguna razón, esa memoria no puede expresarse, y por consiguiente si estas neuronas no reciben la entrada de información requerida, la memoria no se establece (Menzel, 2008).

A raíz del estudio de pacientes a los que se les había extirpado alguna región del cerebro, en los años 50 se comenzaron a delinear regiones importantes para la formación de la memoria. El caso más famoso es el de H.M., a quien se le realizó una resección bilateral del lóbulo temporal medial con el objeto de remover un foco epiléptico. Como consecuencia, perdió la capacidad de formar nuevas memorias - mientras éstas fueran de naturaleza declarativa y no procedimental-. Sin embargo, conservó las memorias más antiguas (Milner et al., 1998).

Gracias a los modelos animales se han podido identificar algunas regiones importantes para los distintos tipos de memoria. Realizando diferentes tipos de intervenciones en estructuras específicas se sabe cada vez con más detalle qué neurotransmisores y receptores están involucrados, y cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen la formación de la memoria. Las regiones cerebrales específicas pueden ser lesionadas; se puede realizar microdiálisis para encontrar cambios en la liberación de neurotransmisores, o bien se pueden implantar cánulas para la microinyección de fármacos agonistas o antagonistas de algún receptor, o que intervengan en algún evento metabólico de las células. Por ejemplo, a través de la inyección de inhibidores de la síntesis proteica se ha descrito la importancia de este proceso en distintas zonas del cerebro para diferentes aprendizajes, en la formación de la memoria a largo plazo: el hipocampo para la memoria espacial, la corteza insular para la memoria gustativa, la amígdala para memorias emocionales aversivas, etc. (Davis y Squire, 1984). Posteriormente se comenzó a estudiar la expresión de genes específicos y su función en las neuronas, para describir con más detalle los mecanismos plásticos que sustentan un proceso cognitivo como lo es la memoria.

Por otro lado, se han generado también modelos *in vitro* de estos fenómenos, de los cuales se hablará más adelante.

Otro antecedente fundamental en el estudio de los mecanismos celulares de la formación de la memoria es la *teoría del trazo dual* de Donald Hebb (1949). Ésta propone la existencia de ensambles de neuronas interconectadas en el cerebro que son activados por la experiencia, que a través de reverberaciones constituirían las memorias recientes. Sin embargo si esta actividad se repite, se generarían cambios en las conexiones entre las neuronas que la faciliten, sirviendo como sustrato de las memorias a largo plazo. En palabras de Hebb:

Cuando un axón de la célula "A" está lo suficientemente cercano a una célula "B" como para excitarla y participa repetida o persistentemente en su disparo, ocurre algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o en ambas células de modo tal que aumentan tanto la eficiencia de "A" como la de una de las distintas células que disparan a "B" (Hebb, 1949).

Uno de los cambios que plantea el autor es el crecimiento del área de contacto entre el axón y la dendrita.

Lo que inicialmente fue una propuesta puramente teórica, originó la idea de que la experiencia causa cambios perdurables en el cerebro y sus células. Esto ha sido comprobado a varios niveles, lo cual se engloba en el concepto de *plasticidad*, que se refiere a los cambios a corto y largo plazo en las neuronas, sus sinapsis y/o redes, como resultado de la experiencia. Ocurre en todos los niveles, desde el comportamiento de un solo canal iónico hasta la morfología de las neuronas y grandes circuitos, abarcando desde milisegundos hasta años (Destexhe y Marder, 2004).

Plasticidad de sinapsis glutamatérgicas

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central. Sus receptores son de dos tipos: ionotrópicos y metabotrópicos (Hassel y Dingledine, 2006). Entre los ionotrópicos están los NMDA (N-metil-D-aspartato) que para abrirse requieren de una despolarización membranal previa pues su canal catiónico no selectivo está bloqueado por un Mg^{2+} . Se conforma de cuatro subunidades distintas, cuyas tres familias provienen de los genes NR1 (producto único), NR2 con cuatro variantes (NR2A-NR2D) y NR3 con dos variantes (NR3A y NR3B, que se expresan casi exclusivamente en el sistema nervioso periférico).

Los receptores NMDA tienen múltiples sitios alostéricos que permiten que su actividad sea estrechamente regulada: cuenta con dos sitios agonistas (glutamato y glicina, ambos necesarios para la apertura del canal), y sitios de reconocimiento para Mg^{2+} , Zn^{2+} y H^+ que impiden el flujo de iones por el canal cuando tiene un agonista unido. Un antagonista

competitivo importante es el D-AP5 (ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico), y entre los antagonistas dependientes de voltaje están la fenilciclidina (PCP), ketamina y MK-801.

Los receptores ionotrópicos AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) se expresan abundantemente en el SNC, actuando en la transmisión sináptica rápida mediada por glutamato. Son tetrámeros compuestos de las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4 (también llamadas GluR-A, GluR-B, GluR-C y GluR-D), en distintas combinaciones (más frecuentemente heterodímeros GluR1/2 ó GluR3/4). Se ensamblan en el retículo endoplásmico primero como un dímero gracias a interacciones en el dominio N terminal (NTD), seguido de otro paso de dimerización mediado por asociaciones en los dominios de unión a ligando y transmembranales.

Todas las subunidades del receptor AMPA tienen un amino terminal extracelular y cuatro dominios hidrofóbicos, tres transmembranales (M1, 3 y 4) y un cuarto que entra y sale de la membrana del lado citoplasmático, sin atravesarla (M2) (figura 1). El sitio de unión a ligando (LBD) está compuesto por las regiones S1 y S2.

Hay diversas variantes de las subunidades del receptor AMPA producidas por *splicing* alternativo y edición del mRNA, contribuyendo a la regulación, función y localización del canal. Por ejemplo, puede variar la longitud de la cola C-terminal intracelular de las subunidades GluR2 y 4. El sitio Q/R de GluR2 es editado en casi todo el pre-mRNA; otro sitio de variación es el llamado flip/flop. Las modificaciones postraduccionales más comunes que contribuyen a la regulación del canal incluyen la fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas en la región C-terminal, así como glicosilaciones y palmitoilaciones en el dominio NTD (Ashby et al., 2008). La composición del canal también afecta su función: la presencia de una subunidad GluR2 hace que sea impermeable a Ca^{2+} , ya que en el sitio Q/R se encuentra una arginina en vez de una glutamina, que aporta una carga positiva, impidiendo el paso del ion divalente.

Funcionalmente, el receptor AMPA es un canal catiónico permeable a Na^+ y K^+ . Presenta baja afinidad por el glutamato, y después de responder a este ligando, se inactiva y desensibiliza rápidamente. Su cinética -particularmente rápida- produce potenciales excitadores post-sinápticos (EPSPs) que hacen posible la detección de coincidencia y la capacidad de generar potenciales de acción con una gran precisión (Ashby et al., 2008).

Los receptores AMPA se acumulan en la postsinapsis, aunque con distinta abundancia en diferentes células. Incluso pueden estar completamente ausentes en algunas sinapsis, a las que se les llama "sinapsis silentes", pues cuentan con receptores NMDA pero al no poder despolarizarse la membrana para desbloquear su canal, estos no pueden ser activados.

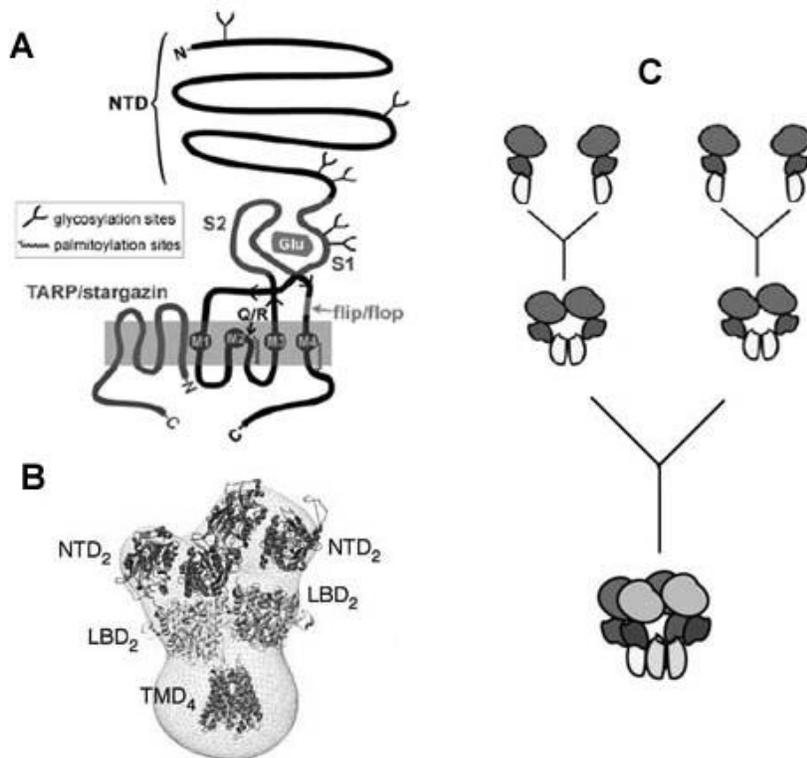


Figura 1. A) Esquema de una subunidad de AMPA, con sus varios sitios y regiones (modificado de Ashby et al., 2008). Incluye al complejo transmembranal TARP/stargazin que se asocian y co-purifican con el receptor AMPA nativo. B) Mapa tridimensional de dímero determinado por microscopía electrónica de una sola partícula (Nakagawa et al., 2005). C) Esquemización del ensamblaje del receptor: primero los monómeros forman un dímero sin contactarse por la región LBD, para posteriormente dimerizarse nuevamente, formando el tetrámero (Nakagawa, 2010).

Se han identificado varias proteínas que se co-ensamblan con los receptores AMPA, por ejemplo las que forman el complejo TARP (transmembrane AMPA receptor proteins), que actúan como subunidades accesorias involucradas en la maduración, tráfico y función del canal (Isaac et al., 2007).

Los receptores kainato (KA) son tetrámeros que se componen de subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2. Funcionalmente, son canales catiónicos permeables a Na^+ y K^+ que se recuperan 10 veces más lentamente de la desensibilización que los AMPA. Adicionalmente, su actividad tiene efectos en vías de señalización metabotrópicas poco comunes para receptores ionotrópicos. Algunos de sus antagonistas son el CNQX (6-ciano 7-nitroquinoxalina 2,3-diona, no selectivo) y NS102 (selectivo).

Usualmente, funcionan como moduladores de la transmisión sináptica y de la excitabilidad neuronal. Por ejemplo, receptores KA de la presinápsis en la vía de las fibras musgosas del hipocampo regulan la transmisión sináptica, contribuyendo a la plasticidad a largo plazo dependiente de la frecuencia (LTP) (Contractor et al, 2011).

De los receptores a glutamato metabotrópicos hay ocho tipos que se agrupan funcionalmente en I (mGluR1 y 5), II (mGluR2 y 3) y III (mGluR4, 6, 7 y 8) (Hassel y Dingledine, 2006). Todos

atraviesan la membrana siete veces, y se asocian con proteínas G triméricas. Los receptores del grupo I estimulan la actividad de la fosfolipasa C, y como consecuencia se libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico, se produce IP_3 , DG y se activa la PKC. Los receptores de los grupos II y III inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (Hassel y Dingledine, 2006).

Los cambios en la fortaleza de las sinapsis dependientes de la actividad neuronal han sido muy estudiados en sinapsis glutamatérgicas. Por un lado los fenómenos llamados *hebbianos*, la potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente), pero también procesos de metaplasticidad y homeostasis.

La LTD consiste en una disminución persistente en los potenciales postsinápticos excitadores que puede ser inducida por estimulación eléctrica de baja frecuencia en la vía. Es un fenómeno muy diverso: la LTD homosináptica es específica de la aferencia estimulada, depende de activación de receptores NMDA, es asociativa y requiere de la entrada de Ca^{2+} a la postsinapsis. La LTD heterosináptica ocurre en las colaterales de vías que están potenciadas donde se ha descrito que es sensible tanto a la activación de NMDA como de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Normann et al., 2000). Asimismo existe un tipo de LTD que involucra receptores a glutamato metabotrópicos del grupo 1; otro tipo de LTD se induce a través de estos receptores en la presinapsis. También la LTD puede depender de factores postsinápticos en la vía de las fibras musgosas (Escobar y Derrick, 2007). Además, puede ser inducida por la activación de receptores a endocannabinoides (CB1) presinápticos (Heifets y Castillo, 2009).

La LTP se ha estudiado en diversas vías del hipocampo, estriado, amígdala y algunas cortezas como la insular y la corteza motora. Consiste en un aumento persistente en los potenciales postsinápticos excitadores, usualmente inducido por trenes de estimulación eléctrica a alta frecuencia aplicados a la vía en cuestión. Entre sus mecanismos se ha descrito en una primera fase la entrada de Ca^{2+} por los canales NMDA y activación de la adenilato ciclasa (que aumenta los niveles de cAMP), así como de cinasas como CaMKII, MAPK, PKA y PKC. Estas proteínas pueden fosforilar subunidades de receptores AMPA aumentando su conductancia, así como intervenir en el tráfico de los mismos, por ejemplo promoviendo su inserción en la membrana. También se ha estudiado la síntesis de óxido nítrico, que como mensajero retrógrado podría aumentar la liberación de neurotransmisor en la célula presináptica. Estos efectos son rápidos, tienden a ser transitorios y tienen como resultado la facilitación de la transmisión sináptica (Kandel et al., 2000). En una segunda fase se ha involucrado la activación de factores de transcripción como CREB y expresión de genes relacionados con la plasticidad, por ejemplo

nuevos receptores que se inserten en la membrana e incluso cambios morfológicos como la reorganización de la estructura de la sinapsis y el crecimiento de nuevas dendritas. Todo ello permite el mantenimiento a largo plazo del incremento en la eficiencia sináptica (Kandel et al., 2000).

Aunque originalmente se consideró un modelo *in vitro* de plasticidad neural que involucra mecanismos en común con la formación de la memoria, se han reportado desde hace varios años fenómenos *in vivo* que asemejan a la LTP o que la involucran de cierta manera con la expresión de un aprendizaje. Por ejemplo, en el condicionamiento al miedo, un estímulo auditivo inocuo induce la conducta de congelamiento después de haber sido asociado con un estímulo nocivo (electroshock en las patas del animal), y esto correlaciona con un aumento en las respuestas evocadas por el estímulo auditivo condicionado en la amígdala lateral, al igual que ocurre cuando se induce LTP (Rogan et al., 1997). Más aún, induciendo LTP en la vía entre la amígdala basolateral y la corteza insular, se fortalece la respuesta condicionada a un estímulo gustativo aversivo (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). Los estudios relacionando los mecanismos de la LTP con la formación de la memoria también se han dirigido al tráfico de receptores AMPA, lo cual será discutido con más detalle en la siguiente sección.

Numerosas evidencias apuntan a que los cambios en la eficiencia sináptica que dependen de la actividad de las neuronas son esenciales para la codificación y almacenamiento de la información. Los procesos conocidos como *hebbianos* se refieren a modificaciones sinápticas a largo plazo, ya sea fortalecimiento o debilitamiento, que requieren de la correlación entre disparos pre- y post-sinápticos, por lo cual son específicos e independientes a cada conexión (Abbott y Nelson, 2000). Esta propiedad les confiere un gran potencial de codificación, sin embargo ha surgido la pregunta de cómo se mantiene la estabilidad en los circuitos neuronales ante los constantes cambios que ocurren. Se requiere de mecanismos que detecten y regulen los niveles generales de excitabilidad, sin que sean tan bajos que la actividad no se propague lo suficiente, ni tan altos que las neuronas mueran. Se ha sugerido que la potenciación incontrolada de sinapsis resultaría en su saturación y acabaría con su capacidad de codificar. Incluso ha sido reportado que la inducción de LTP al punto de la saturación en el hipocampo interfiere con el aprendizaje en una tarea espacial para la cual esta estructura es indispensable (Moser et al., 1998).

En años recientes se han descrito fenómenos que podrían regular procesos como los *hebbianos* antes mencionados. La *metaplasticidad* se define como la modulación de la plasticidad por la actividad o inactividad sináptica previa (Abraham y Bear, 1996). La *plasticidad*

homeostática se refiere a aquellos cambios que estabilizan la actividad neuronal ante otros cambios, como el número de sinapsis o la fuerza de las conexiones, que finalmente modifican su excitabilidad (Nelson y Turrigiano, 2008). Un ejemplo de esto se reportó en cultivos de corteza visual con bicuculina (antagonista de receptores GABA-A), donde la frecuencia de disparo aumenta en unas horas por efecto del fármaco. Sin embargo después de 48 horas la frecuencia vuelve a niveles basales (Turrigiano et al., 1999). Esta y otras evidencias apuntan a que las neuronas corticales e hipocampales cuentan con un sensor de actividad que les permite regular sus tasas de disparo, aumentándolas o disminuyéndolas en función de la actividad, mediante retroalimentación negativa. Esto puede llevarse a cabo mediante el *escalamiento sináptico*, que implica la inserción o remoción de receptores en la membrana postsináptica para compensar periodos de fuerte actividad o largos periodos de inactividad pero manteniendo constantes los pesos relativos que fueron establecidos por procesos plásticos de tipo *hebbiano*. De esta manera las neuronas pueden conservar las diferencias en la fuerza de sus conexiones que codificarían la información, mientras se mantiene la actividad total dentro de un rango adecuado funcionalmente (Nelson y Turrigiano, 2008) (figura 2).

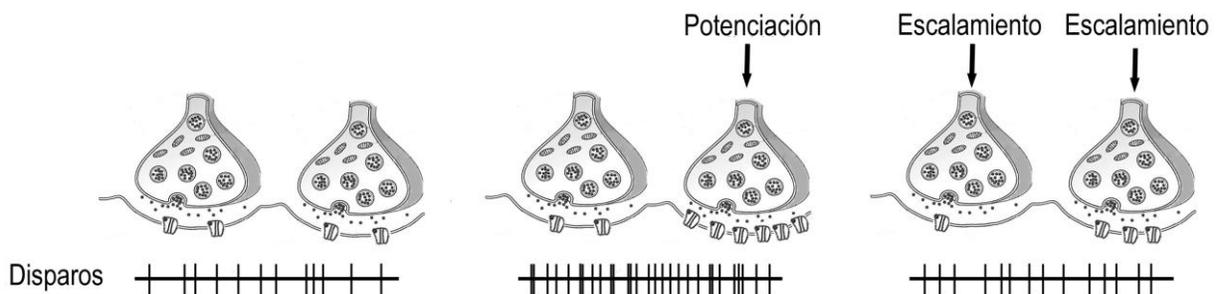


Figura 2. Esquemización de la homeostasis sináptica a través del escalamiento de receptores. 1) Niveles basales, ambas sinapsis tienen el mismo número de receptores, 2) Una de las sinapsis es potenciada y como consecuencia aumenta su número de receptores, así como la frecuencia de disparos total, 3) Se remueven receptores de ambas sinapsis, de tal modo que la que fue potenciada tiene más que la otra, pero la frecuencia de disparo total vuelve a niveles basales. Modificado de Turrigiano, 1998.

Tráfico de receptores AMPA en plasticidad relacionada a la experiencia

Dentro de los eventos moleculares que subyacen a fenómenos de plasticidad sináptica como la LTP y LTD, y presumiblemente a los cambios en el comportamiento que ocurren con el aprendizaje, el tráfico de receptores AMPA ha sido ampliamente estudiado.

Se han reportado tres tipos de fenómenos donde el tráfico de estos receptores se relaciona con eventos plásticos: el fortalecimiento de una sinapsis se relacionaría con la adición de receptores que contienen subunidades con cola citoplasmática C-terminal larga, que son las GluR1 y 4; esto de manera dependiente de actividad (Hayasi et al., 2000). El debilitamiento de la sinapsis se relacionaría con la endocitosis de todos los tipos de receptor AMPA, proceso también dependiente de actividad (Malinow y Malenka, 2002). Por último, también hay tráfico de estos receptores en ausencia de plasticidad e incluso de actividad (McCormack, et al., 2006).

Además, se han reportado cambios en la composición, cantidad y fosforilación de subunidades del receptor AMPA después de distintos tipos de aprendizaje, algunos relacionados con la amígdala (Kessels y Malinow, 2009), pero también con el hipocampo. Por ejemplo, utilizando un vector viral con receptores AMPA con propiedades de rectificación particulares, se pudo observar un aumento en la incorporación de este tipo de receptores a sinapsis funcionales, después de un aprendizaje de condicionamiento al miedo, el cual resultó necesario para que se estableciera esta memoria (Rumpel et al., 2005).

Un antecedente donde se relacionan cambios en subunidades así como homeostasis de receptores AMPA con la potenciación a largo plazo de respuestas sinápticas, es el trabajo de Whitlock y cols., (2006). Un solo ensayo de prevención pasiva - donde el animal debe aprender a evitar un contexto asociado a un estímulo aversivo- provoca el aumento de la transmisión sináptica en el hipocampo, aumenta la fosforilación de la Ser⁸³¹ de GluR1 y la cantidad de subunidades GluR1/2 en fracciones de sinaptoneurosomas de esta estructura. Importantemente, los cambios en la fosforilación y cantidad son transitorios, siendo máximos media hora después del entrenamiento, y regresando a niveles basales aproximadamente a las dos horas. Sin embargo el aumento en la transmisión sináptica es más perdurable. Esto apunta a mecanismos homeostáticos a nivel del tráfico de receptores que mantiene estable el número total de los mismos, independientemente de que algunas sinapsis estén potenciadas y otras no.

Gen de expresión temprana *Arc* y tráfico de receptores AMPA

Desde que se estableció la síntesis proteica en neuronas de regiones específicas del cerebro como un evento fundamental para la formación de la memoria, se ha estudiado la expresión y función de genes específicos. Particularmente aquellos cuya transcripción y/o traducción es inducida en corto tiempo por la entrada de iones de calcio en la postsinapsis. A estos se les

llama genes de expresión inmediata (IEGs), y para su transcripción no requieren de la síntesis *de novo* de otras proteínas ni activación previa de otros genes (Miyashita et al., 2008).

Uno de ellos es el gen *de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad (Arc)*, también conocido como *Arg3.1*, que fue identificado por primera vez en 1995 por dos grupos independientes (Link et al., 1995 y Lyford et al., 1995). Su expresión es inducida por la entrada de Ca^{2+} (Waltereit et al., 2001) producida por el aumento en la frecuencia de disparo provocado artificialmente: por estimulación eléctrica convulsiva (Lyford et al., 1995), LTP (Link et al., 1995) e incluso por la conducta que realice el animal, por ejemplo la exploración de un ambiente novedoso (Guzowski et al., 1999).

El mRNA de *Arc* tiene una dinámica de localización intracelular muy particular, ya que después de su transcripción es transportado a las dendritas, y su acumulación es mayor en las sinapsis que fueron específicamente estimuladas (revisado en Steward y Worley, 2002

En cuanto a la importancia de esta proteína para la formación de la memoria, se ha reportado que ratones *knock out* (KO) para *Arc* presentan deficiencias en la memoria a largo plazo en tareas espaciales, en condicionamiento al miedo (tanto con un tono y con el contexto como estímulos condicionados), en el condicionamiento aversivo al sabor y en el reconocimiento de objetos (Plath et al., 2006). Estos resultados, aunados a la especificidad con que su mRNA se dirige a las sinapsis estimuladas, apuntan a que la proteína *Arc* juega un papel importante en la plasticidad neuronal y la consolidación de la memoria a largo plazo.

La función de la proteína *Arc* que más ha sido estudiada involucra el tráfico de receptores AMPA, ya que la interacción de *Arc* con la dinamina-2 y la endofilina-3 (proteínas involucradas en la endocitosis mediada por clatrina) promueve que estos receptores sean vesiculados e internalizados al citoplasma, causando una disminución en los potenciales postsinápticos excitadores miniatura, es decir en la excitabilidad de la sinapsis particular (Chowdhry et al., 2006). En neuronas en cultivo la sobreexpresión de *Arc* disminuye la expresión de receptores AMPA en la membrana celular y la amplitud de sus corrientes, mientras que en las células KO para *Arc* hay más de estos canales, además de que su excitabilidad está aumentada (Shepherd et al., 2006, Rial Verde et al., 2006). A partir de estos datos se ha generado un modelo de escalamiento sináptico homeostático de receptores AMPA en el que *Arc* contribuye a mantener la excitabilidad de las neuronas en rangos funcionales, mientras que se mantienen los pesos sinápticos que codifican la información.

Otro fenómeno en el que interviene esta función de Arc es una forma de LTD que requiere de síntesis proteica rápida y *de novo* en las dendritas, y que es independiente de los receptores NMDA. La activación de receptores mGluR del grupo 1 induce en 5 minutos la traducción del mRNA de Arc que ya se encuentra en las dendritas, respuesta que es esencial para el desarrollo de este tipo de LTD. A su vez la traducción de Arc necesita de la fosforilación del factor de elongación eEF2 por eEF2K, que usualmente está unida a los mGluRs. Además de promover la síntesis de la proteína de Arc, eEF2 inhibe la elongación de las demás proteínas, por un mecanismo que aún no es bien comprendido (Park et al., 2008).

De acuerdo a estos datos el aumento sostenido en la transcripción de Arc debido a la activación de los receptores mGluR1 provocaría una mayor endocitosis de receptores AMPA, disminuyendo la excitabilidad de las sinapsis y promoviendo a su vez la depresión a largo plazo (Waung et al., 2008).

Los estudios acerca de la expresión de Arc como consecuencia de una conducta realizada por el animal son importantes para dilucidar la relevancia de sus funciones en procesos cognitivos básicos. Sin embargo, los estudios se han enfocado en la detección del mRNA. Recientemente se analizó la expresión de la proteína en la corteza gustativa en respuesta a un estímulo gustativo familiar o novedoso. Se encontró que mientras más familiar es el estímulo más se expresa Arc, y que la proteína se localiza en las dendritas de las neuronas (Morin et al., 2011) (figura 3). Esto, en un lapso aproximado de 30 y 60 minutos posteriores al consumo del sabor (Chavez-Hurtado, 2011). Este aumento en la expresión de la proteína con el sabor familiar fue bloqueado con un tratamiento que interfiere con la consolidación de este tipo de memoria: la inyección de un inhibidor de la síntesis proteica en el hipocampo dorsal después de la primera presentación del sabor (De la Cruz et al., 2008).

Con estas evidencias no es factible más que especular sobre qué función celular está llevando a cabo Arc en la corteza insular. Una posibilidad, dados los antecedentes reportados en la literatura, es que esté ocurriendo tráfico de receptores AMPA. Sin embargo, esto es difícil de investigar *in vivo*, con células que provengan de animales que han realizado una tarea conductual.

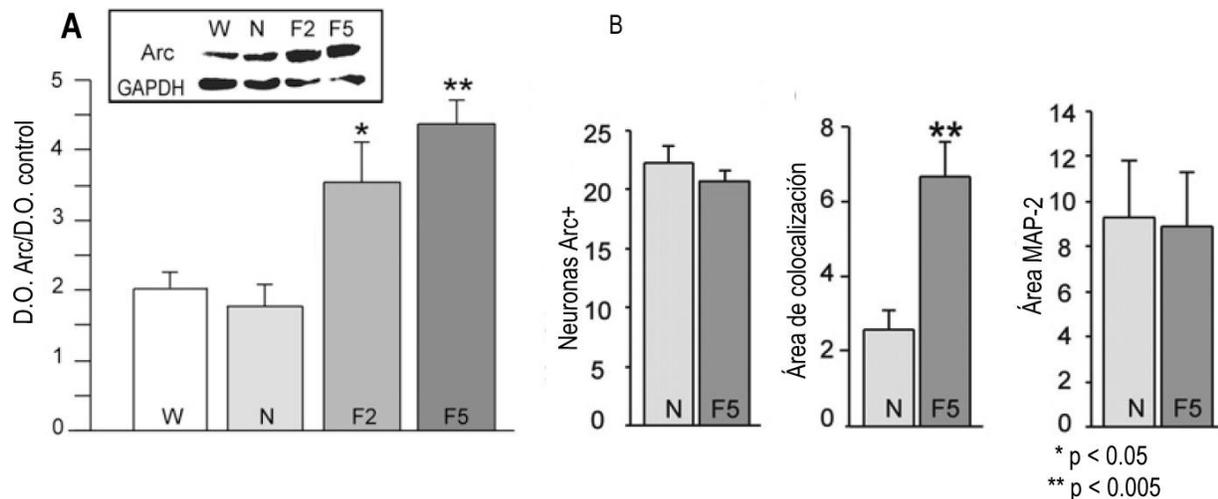


Figura 3. Expresión de la proteína Arc en la corteza insular en la atenuación de la neofobia. A) Aumento de la expresión de Arc en animales que han consumido un sabor familiar (F2, F5), con respecto a un sabor novedoso y agua (N, W). B) Cuantificación de inmunohistoquímica contra Arc y la proteína de unión a microtúbulos MAP2. Entre el estímulo gustativo novedoso y el familiar no cambia el número de células Arc+, ni el área total de MAP2. Sin embargo aumenta significativamente el área de colocalización Arc/MAP2. Modificado de Morin et al., 2011.

Crosslinking de proteínas para el estudio de tráfico de receptores

El estudio del tráfico de receptores se ha realizado con distintas aproximaciones como la iodación, biotilación o marcadores inmunofluorescentes, sin embargo por su complejidad la mayoría de las técnicas se reservan para cultivos celulares (Vassilieva y Nusrat, 2008). No obstante, existen algunos métodos que permiten distinguir entre proteínas que al momento de obtener una muestra de tejido se encuentran en la membrana celular, de aquellas que se localizan en el citoplasma. Una alternativa es a través del uso de agentes entrecruzadores de proteínas que normalmente se utilizan para estudiar interacciones entre ellas.

El BS³ (bis-(sulfosuccinimidil) suberato) es un compuesto que cuenta con un brazo espaciador de 8 carbonos, con un grupo ester reactivo en cada extremo, que se acopla con aminas para formar enlaces peptídicos (figura 4) (Hermanson, 2008). Una característica que lo diferencia de otros compuestos similares es su alta solubilidad en agua, que lo hace impermeable a la membrana plasmática. Al entrar en contacto con proteínas de la superficie celular, los grupos ester del BS³ reaccionan irreversiblemente con sus aminas (primarias y en grupos funcionales de algunos aminoácidos), formando grandes aglomerados que permiten la diferenciación de

reservorios de proteínas membranales e intracelulares en base al peso molecular usando SDS-PAGE y Western blot. Esta técnica ha sido utilizada exitosamente para determinar la disminución de receptores AMPA en la membrana en varias estructuras cerebrales, como consecuencia de un tratamientos tales como la anestesia (Gould et al., 2007, Carino et al., 2011).

A pesar de ser una técnica que separa de manera inespecífica el *pool* proteico membranal del intracelular, el *crosslinking* tiene al menos dos grandes ventajas. Una es la simplicidad del tratamiento a la muestra, y la segunda es que se pueden tratar muestras provenientes de animales que han realizado tareas conductuales.

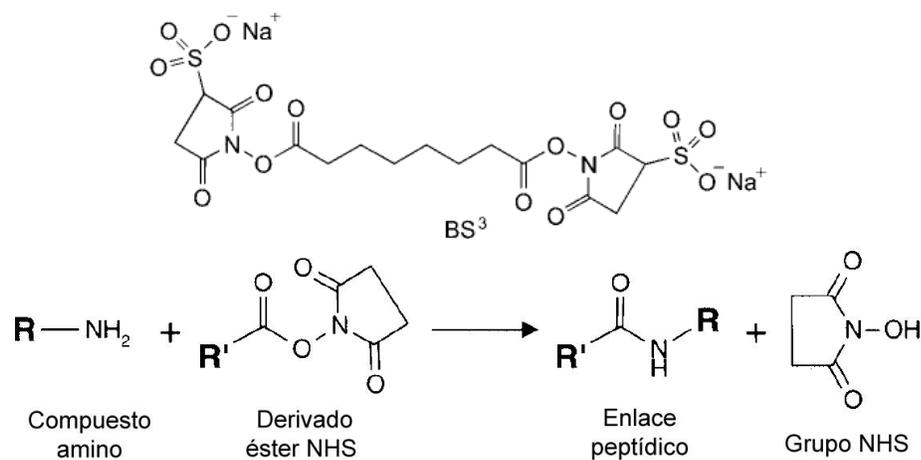


Figura 4. Esquema del bis-(sulfosuccinimidil) suberato (BS³), y de la reacción mediante la cual forma conjugados de compuestos que contienen grupos amino, como las proteínas. Los derivados éster N-hidroxisuccinimida (NHS) del BS³ forman enlaces peptídicos con compuestos amino. El grupo NHS se separa (Modificado de Hermanson, 2008).

Memoria gustativa

El reconocimiento de un sabor es una capacidad importante para la sobrevivencia de un animal, ya que debe identificar las propiedades nutritivas de los alimentos, prevenir la posibilidad de ingerir algo tóxico, además de conocer qué alimentos de su entorno puede consumir cuando otros no están disponibles, etc. Tal reconocimiento puede ser una conducta innata o requerir de información acerca de las consecuencias de haberlo consumido en el pasado, es decir de la memoria. Ésta no sólo incluye el reconocimiento sino las características del sabor como lo son el valor hedónico, grado de familiaridad y sus propiedades nutritivas o tóxicas (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

Existen diversos modelos o tareas gustativas que han servido para investigar los sustratos neurobiológicos y mecanismos moleculares de la formación de la memoria en general. Se pueden dividir en modelos de memoria de sabor apetitivo y de sabor aversivo.

Cuando el animal se encuentra con un sabor nuevo y después de consumirlo no tiene ninguna consecuencia asociada a toxicidad, se forma una memoria incidental y segura (Núñez-Jaramillo et al., 2010). Algunos estímulos están asociados con altos valores nutritivos, por ejemplo los sabores dulces, por lo que los animales tienden a preferirlos y consumirlos más, es decir que provoca una respuesta apetitiva. Experimentalmente se cuenta con varios paradigmas para estudiar este tipo de aprendizaje: en la *habituación* se le presenta al animal en días sucesivos (o intercalados con agua) un líquido con sabor, usualmente poco concentrado, del cual consume más cada día hasta llegar a una asíntota. Es parecido a la *atenuación de la neofobia* (AN, figura 5), en el que se utiliza un sabor que al presentarse por primera vez es consumido en menor medida a comparación de una línea base de agua, lo cual se conoce como neofobia y es una tendencia natural de los roedores. Con sucesivas exposiciones al sabor, la neofobia se atenúa y el animal aumenta su consumo hasta una asíntota. En la *inhibición latente* la preexposición a un sabor disminuye su potencial como estímulo condicionado para un condicionamiento aversivo. Se ha considerado que en la habituación se excluyen los elementos aversivos del aprendizaje gustativo, siendo puramente incidental (Miranda et al., 2008). Sin embargo es más adecuado plantear la aversión y la preferencia como dos extremos de un continuo (Bermúdez-Rattoni, 2004).

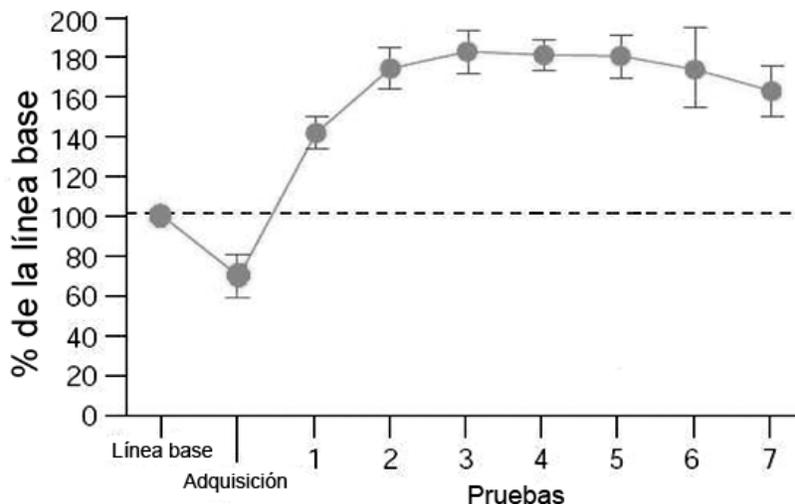


Figura 5. Gráfica prototípica de la Atenuación de la Neofobia con sacarina como estímulo gustativo. La línea base consiste en 3 ó más días de consumo de agua, en la adquisición se presenta el sabor nuevo, y el consumo se ve disminuido. Al no haber consecuencias gástricas aversivas, en los días subsiguientes el consumo aumenta hasta llegar a una asíntota. Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004.

En cuanto a los modelos de memoria de sabor aversivo el más utilizado es el *condicionamiento aversivo a los sabores* (CAS), en donde un sabor novedoso (EC, estímulo condicionado) es seguido de un agente que provoca malestar gástrico (EI, estímulo incondicionado por ejemplo una inyección i.p. de LiCl). La siguiente vez que se presenta el sabor al animal, reduce su consumo. Una de las más grandes ventajas de este paradigma es que sólo se requiere de un ensayo para establecer el aprendizaje, además de que la ventana temporal entre el estímulo condicionado y el incondicionado puede ser muy larga, incluso de horas (Bermúdez-Rattoni, 2004). También se estudia la extinción del CAS, que comienza cuando se presenta el estímulo condicionado sin el incondicionado y el animal gradualmente aumenta su consumo en sucesivas presentaciones (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

Sustratos neuroanatómicos del procesamiento y memoria gustativos

A continuación se detallarán las vías por las que viaja la información sensorial que interviene en la memoria gustativa, tanto segura como aversiva. Además del sabor del estímulo son importantes otras propiedades (valor hedónico, características nutritivas o tóxicas), y para detectarlas se requiere también información visceral.

Después de su transducción química en la cavidad oral, la información del sabor viaja por los nervios craneales facial, glossofaríngeo y vago (VII, IX y X) hasta la porción rostral del núcleo del tracto solitario. En los primates, los axones del núcleo del tracto solitario mandan sus proyecciones directamente al diencefalo, mientras que en los roedores, fibras de este núcleo se proyectan hasta el núcleo parabraquial posteromedial, de donde hay proyecciones hasta el hipotálamo lateral, el núcleo de lecho de la estría terminal y la amígdala central y basolateral, así como el núcleo ventral posteromedial del tálamo. Éste último se proyecta a la corteza gustativa que está ubicada en la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004).

La información visceral relacionada con el malestar gástrico puede venir del nervio vago o la sustancia inductora de malestar puede llegar por la sangre al área postrema. Ambas vías proyectan a la porción caudal del núcleo del tracto solitario, de ahí al núcleo parabraquial externo lateral, después al tálamo vetroposterolateral y la amígdala central (Bermúdez-Rattoni, 2004) (figura 6).

En cuanto a los sistemas de neurotransmisión relacionados al procesamiento de la información gustativa segura, es importante la corteza insular, que tiene aferencias GABAérgicas, colinérgicas, glutamatérgicas y noradrenérgicas (Núñez-Jaramillo et al., 2010).

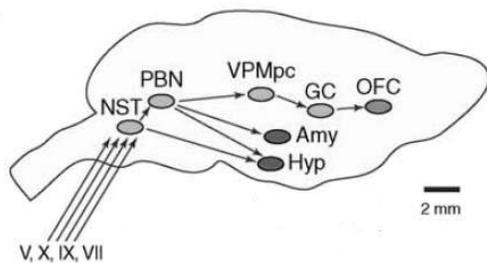


Figura 6. Esquemática de las vías relacionadas al sabor e información visceral en la rata. V nervio trigémino, VII nervio facial; IX nervio glossofaríngeo; X nervio vago; NTS núcleo del tracto solitario; PBN núcleo parabraquial; Amy amígdala, VPMpc núcleo ventral posteromedial parvocelular; GC corteza gustativa, OFC corteza olfativa. Modificado de Carleton et al., 2010.

Se ha reportado que se da un aumento en la liberación de acetilcolina en la corteza insular ante un estímulo gustativo novedoso, es decir que los niveles de este neurotransmisor vuelven a valores basales cuando el estímulo se vuelve familiar (Miranda et al., 2000). Asimismo la inyección de antagonistas colinérgicos en esta estructura impide la adquisición y consolidación de la atenuación de la neofobia (Gutiérrez et al., 2003b). En cuanto al sistema glutamatérgico, existe controversia en la literatura acerca del papel de los receptores NMDA: antagonizando su actividad con el fármaco AP5 no se encuentra ningún efecto, y con MK801, se bloquea la consolidación de la atenuación de la neofobia (Gutierrez et al., 2003a, Figueroa-Guzmán et al., 2006). El sistema dopaminérgico (D_1/D_5) también es necesario para la adquisición de información gustativa, al igual que el GABAérgico ($GABA_A$), y este último también está involucrado en la evocación de la memoria aversiva (Berman et al, 2000). Por otro lado, los receptores β -adrenérgicos participan en el aprendizaje incidental apetitivo de un sabor dulce, que es un paradigma conductual de reconocimiento de sabor seguro ligeramente distinto a la atenuación de la neofobia (Miranda et al., 2008).

La corteza insular en la codificación y memoria gustativas

La corteza insular se divide en tres áreas por su citoarquitectura: granular, disgranular y agranular. Asimismo estas áreas se dividen en tres capas: superficial (la más lateral), media e interna (figura 7).

La mayor parte de los estudios sobre la codificación gustativa en la corteza insular se han realizado con registros electrofisiológicos. En primer lugar se ha descrito que las neuronas que responden al sabor se encuentran más abundantemente en las áreas disgranular y agranular, entre 1.9 y 0.75 milímetros anterior a Bregma (Ogawa et al., 1990) (figura 7). De entre estas neuronas, hay algunas que se activan selectivamente ante alguno de los sabores considerados básicos (dulce, amargo, ácido, salado), es decir que modifican su actividad preferentemente

cuando el animal consume cierto sabor (Yamamoto et al., 1989). Sin embargo hay otro tipo de neuronas que responden a la palatabilidad o valor hedónico del sabor, es decir a lo agradable o desagradable de un estímulo (Yamamoto, 1998b), de tal manera que pueden responder no solo a un sabor amargo, sino a uno dulce que ha sido condicionado con malestar gástrico, por ser ambos aversivos. Este tipo de neuronas responden de manera más prominente cuando el sabor es familiar que cuando es novedoso (Yamamoto et al., 1989b).

Tomando en cuenta el componente temporal de las respuestas de las neuronas de la corteza gustativa, se reportó que las células pueden cambiar su patrón de disparo ante distintos sabores y su palatabilidad de manera más temprana o más tardía (hasta 2.5 segundos después del estímulo) (Katz et al., 2001). Esto muestra que la codificación gustativa es aún más complicada, ya que además de las características quemiosensitivas están las somatosensoriales (p.e. temperatura, la sensación del líquido en la lengua) y hedónicas, así como la familiaridad del estímulo.

Otra manera de estudiar la actividad de la corteza insular en el procesamiento gustativo ha sido con imagenología óptica intrínseca *in vivo*. Con esta técnica se puede monitorear la actividad de la corteza con una buena resolución espacial, y al mapear las áreas activadas por cuatro sabores se obtuvieron patrones espaciales distintos para cada uno. También se observó una respuesta al agua destilada, en una región más caudal (Accolla et al., 2007).

En cuanto a la codificación de la novedad y familiaridad, se ha reportado que las neuronas de la corteza gustativa aumentan su respuesta tardía (de 2 a 8 segundos) ante un estímulo familiar específico respecto a uno novedoso (Bahar et al., 2004). Se sugiere que la familiaridad se codifica en ensamblajes neuronales específicos de la corteza, incluso con las mismas neuronas que responden a las propiedades somato y quemiosensoriales de los sabores, pero con un código temporal distinto.

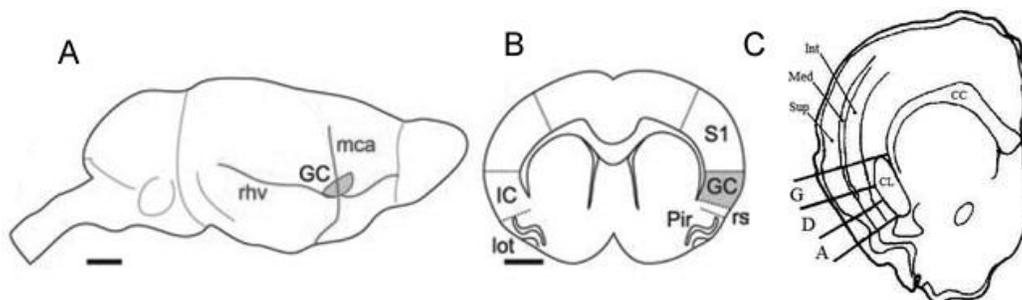


Figura 7. Localización (A y B, modificado de Accolla et al., 2007) y citoarquitectura (C, modificado de Ogawa et al., 1990) de la corteza gustativa; mca arteria cerebromedia; rhv surco rhinal; GC corteza gustativa; IC corteza insular; Pir capa endopiriforme; G área granular; D área disgranular; A área agranular; Int capa interna; Med capa medial; Sup capa superficial; CL claustrum; cc cuerpo calloso.

Planteamiento del problema

La atenuación de la neofobia es un paradigma conductual de memoria de reconocimiento al sabor seguro. Entre los eventos moleculares en la corteza insular que subyacen este tipo de memoria se ha descrito un aumento en la expresión de la proteína Arc, la cual es esencial para la plasticidad relacionada a la formación de la memoria a largo plazo.

Una de las funciones celulares que se han reportado para esta proteína es promover la endocitosis de receptores a glutamato de tipo AMPA, por lo que en este proyecto se investigó la localización de los mismos, en la membrana y citoplasma de células de la corteza insular. Esto, con el fin de buscar cambios en el tráfico de receptores AMPA en una ventana temporal coincidente con la de la expresión de la proteína Arc en la misma tarea y estructura.

Objetivo

Determinar si cambia la proporción de receptores AMPA en la membrana con respecto al citoplasma en las células de la corteza insular, en los minutos posteriores al consumo de un sabor por primera, segunda y quinta vez.

Hipótesis

Habrà una disminución de receptores AMPA en la membrana en las neuronas de la corteza insular si los animales consumen un sabor en repetidas ocasiones, y no la habrá si lo consumen por primera vez.

Método

Animales

51 ratas macho de la cepa Wistar, de entre 250 y 300 g de peso al inicio de los experimentos, obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Los animales se mantuvieron en el *vivarium* del mismo Instituto en cajas plásticas individuales con comida *ad libitum*, a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ y un ciclo L:D 12:12 con inicio a las 7 hrs.

Procedimiento conductual

El procedimiento general consistió en privar de agua a las ratas a las 17 hrs., una tarde antes del inicio de los experimentos conductuales. Cada día se permitió el consumo de líquido dos veces: por las mañanas entre 10:30 y 11:30 hrs., 5 mL de agua o sacarina al 0.5% según el protocolo (que para cada grupo se especifica más adelante). Por las tardes a las 17 hrs, 30 mL de agua para evitar la deshidratación.

Como se muestra en el diagrama de la figura 7, para todos los grupos se dieron cinco días de línea base, que consistió en dar por la mañana a cada animal acceso al consumo de 5 mL de agua. A partir del sexto día se comenzó a dar sacarina al 0.5% como estímulo gustativo novedoso (neofobia), y para los grupos correspondientes los días subsecuentes se siguió proporcionando sacarina por las mañanas (atenuación de la neofobia). Se formaron tres grupos con distintos grados de familiaridad con el estímulo:

- Novedoso (grupo N). Los animales de este grupo fueron sacrificados después de consumir sacarina por primera vez.
- Familiar (grupo F2). Los animales de este grupo fueron sacrificados después de consumir sacarina por segunda vez.
- Muy familiar (grupo F5). Los animales de este grupo fueron sacrificados después de consumir sacarina por quinta vez.

Adicionalmente se incluyeron cuatro ratas que tuvieron libre acceso a agua y siempre permanecieron en su caja hogar (grupo CAJA), para tener un punto de referencia y determinar si la privación de agua tenía algún efecto. Estos animales fueron sacrificados en un horario

similar a los demás, siendo tomados directamente de sus cajas sin ninguna manipulación adicional.

Para examinar los cambios en la distribución de receptores AMPA en la membrana e interior de la célula en los minutos posteriores al consumo del estímulo gustativo, se realizaron curvas temporales en cada uno de los grupos de familiaridad (figura 8). Es decir, se sacrificaron animales en:

- 0 minutos. Sacrificio sin proporcionar consumo de líquido.
- 15 minutos. Sacrificio 15 minutos después del inicio del consumo.
- 60 minutos. Sacrificio 60 minutos después del inicio del consumo

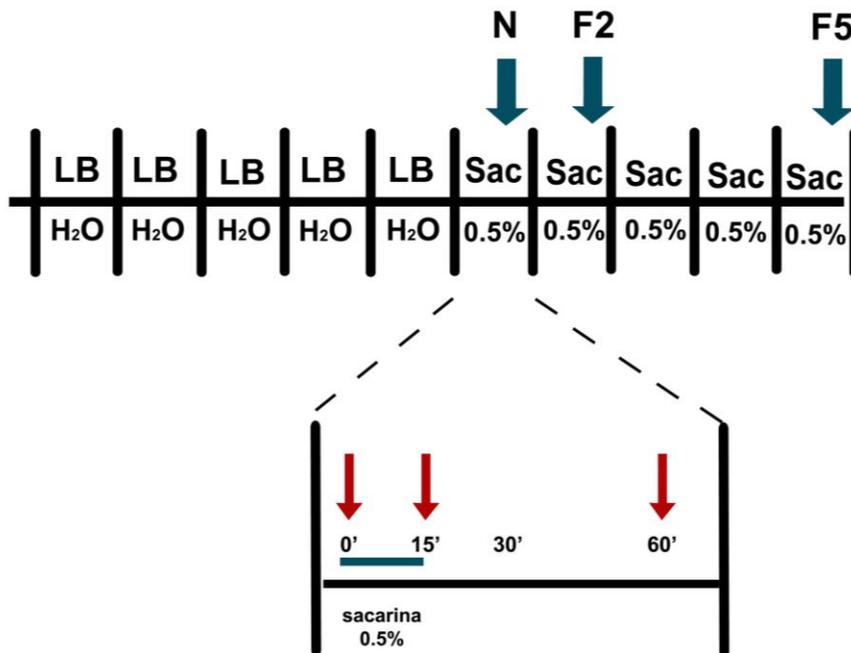


Figura 8. Diagrama del protocolo conductual de atenuación de la neofobia, y de la curva temporal.

Sacrificio, crosslinking e inmunoblot

El bis-(sulfosuccinimidil) suberato (BS³) es un molécula cuyos dos extremos, al entrar en contacto con los grupos amino de las proteínas, forman un enlace peptídico. Esto ocasiona que se entrecrucen entre sí todas las proteínas que se encuentren expuestas al reactivo, formando agregados de alto peso molecular. Asimismo, el BS³ es una molécula hidrofílica, por lo que no atraviesa la membrana plasmática de las células, y por ello los agregados que forma son

únicamente entre proteínas de superficie de membrana. Posterior al tratamiento de las muestras, se lleva a cabo un SDS-PAGE y se pueden realizar inmunoblots contra cualquier proteína de membrana. Se obtienen dos bandas: una correspondiente al peso molecular normal de la proteína, y otra en lo alto del carril, pues los agregados son de tal alto peso molecular que no migran durante la electroforesis con un gel al 10% como el utilizado en este trabajo.

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se removió el cerebro colocándolo en solución salina 0.9% a 4°C. Después de un minuto con ayuda de una matriz graduada se cortó una rebanada coronal de dos milímetros de espesor, un milímetro anterior y un milímetro posterior al cruce entre la arteria cerebromedial y el surco rinal (figura 7). De esta rebanada se obtuvo una muestra de corteza insular por hemisferio de aproximadamente 2 mm de espesor x 2 mm de largo x 1 mm de alto, entre la orilla del cerebro y el cuerpo calloso.

Las muestras se colocaron en BS³ (Thermo Scientific®) 4 mM disuelto en ACSF a 4°C, durante 30 minutos en agitación para que se llevara a cabo la reacción de *crosslinking* o entrecruzamiento (como se reportó en Gould et al., 2007).

Para terminarla se agregó glicina 100 mM, incubando por 10 minutos para después centrifugar brevemente y resuspender el *pellet* en buffer de lisis frío (Tris 50 mM, NaCl 150mM, Tritón-X 1%, SDS 0.1%, con inhibidores de fosfatasa y proteasas). Posteriormente las muestras fueron homogeneizadas por sonicación y centrifugadas 10 minutos a 2000 rpm a 4°C, recuperándose el sobrenadante que fue almacenado a -80°C hasta su uso.

El inmunoblot se realizó cuantificando las proteínas de las muestras de homogenados de corteza insular a través del método de Lowry (Bio-Rad Dc Protein Assay®) y realizando un SDS-PAGE con poliacrilamida al 10%. Después se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad®), la cual se incubó en solución de bloqueo (BSA 5% en trizma base con salina con tween 0.1%, TBS-T) por una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (GluR2 y GAPDH) se incubaron toda la noche a 4°C en agitación o 2 hrs a temperatura ambiente, mientras que los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano fueron incubados por una hora y media a temperatura ambiente. El revelado se realizó a través de una reacción quimioluminescente (Immobilon Wester, Millipore®), captada en film radiográfico (Kodak®). Primero se realizó el blot contra GluR2 y en algunos casos, después de su revelado, la membrana fue eluída y se realizó un blot contra GAPDH como control de carga. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-GluR2 hecho en cabra 1:600 (Santa Cruz®), anti-GAPDH

hecho en ratón 1:10 000 (Millipore®), anti-cabra hecho en burro 1:20 000 (Santa Cruz®) y anti-ratón hecho en cabra 1:20 000 (Millipore®).

Las imágenes fueron digitalizadas y la densidad óptica relativa de las bandas fue cuantificada con el programa *ImageJ*. Se obtuvo el cociente entre la densidad óptica de la banda correspondiente a proteína membranal, y la densidad óptica de la banda correspondiente a proteína intracelular. Asimismo se verificó, en los grupos donde fue realizado el inmunoblot contra GAPDH, que la densidad óptica de esa banda no variara, sin embargo este parámetro no se utilizó para la cuantificación de los resultados.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, en cada grupo de la categoría de familiaridad se promediaron los datos de todos los animales de cada punto temporal. Posteriormente se realizaron pruebas ANOVA de una vía, y para las que resultaron significativas, una prueba *post hoc* de Fisher para saber entre qué grupos eran tales diferencias.

Resultados

Se utilizó un protocolo de entrecruzamiento de proteínas con bis-(sulfosuccinimidil) suberato (BS^3), agente hidrofílico que no atraviesa la membrana plasmática. Al tratar de esta manera la muestra previamente al lisado, se forman agregados de proteínas que estén insertadas en la membrana, entre ellas los receptores AMPA.

Estos agregados son de tan alto peso molecular que durante la electroforesis no migran. Al realizar el inmunoblot se obtienen dos bandas: una correspondiente al peso molecular de la proteína, que en este caso para la subunidad GluR2 es 100 kDa y que se encontraba en el interior de la célula al momento de realizar el tratamiento; y otra en la parte superior del carril, que corresponde a la proporción de proteína que formó agregados por haber estado en la membrana plasmática al momento de realizar el *crosslinking* (figura 9). Otras proteínas que se localizan en el citoplasma como GAPDH (figura 9) y Arc (no mostrada), no forman agregados de alto peso molecular, y por ello no revelan bandas en la parte superior del carril.

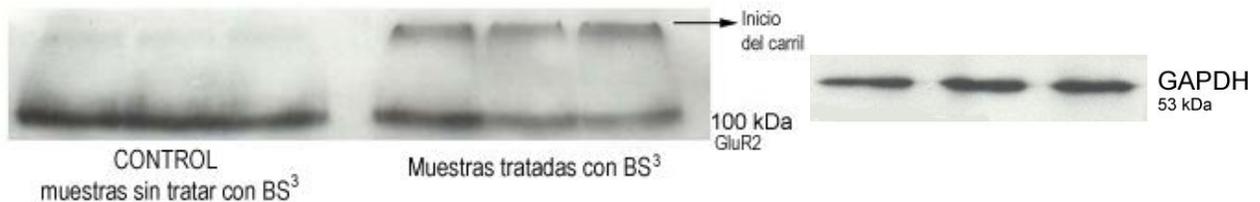


Figura 9. La doble banda sólo se obtiene cuando las muestras son tratadas con BS^3 , con proteínas membranales y no citoplasmáticas. Izq.) Inmunorreactividad de la subunidad GluR2 del receptor AMPA, en muestras tratadas y no tratadas con BS^3 . En el control se obtiene únicamente una banda del peso molecular de la proteína, (100 kDa), mientras que en las tratadas hay una banda adicional en la parte más superior del carril. Der.) La proteína intracelular GAPDH no forma una banda en la parte superior del carril.

Mediante este método se analizó el contenido membranal con respecto al intracelular, de la subunidad GluR2 del receptor AMPA, en muestras de la corteza insular de ratas que estuvieron bajo un protocolo de reconocimiento de un sabor seguro, que fue sacarina al 0.5%. Para ello se formaron tres grupos: uno que hubiese bebido el sabor por primera vez (N), uno que lo hubiese bebido por segunda vez (F2), y otro que lo hubiese bebido por quinta vez (F5). En cada una de estas condiciones se probaron tres puntos temporales: una antes de probar el sabor (0 min), y a los 15 y 60 minutos de haber comenzado el consumo.

Como se observa en la gráfica de la figura 10, en la condición de sabor novedoso (N), entre los tres puntos temporales analizados no hay un cambio significativo en el cociente de inmunorreactividad de GluR2 membranal respecto a la intracelular (ANOVA de una vía $F_{2, 14} = 0.724$, $p = 0.5020$). Esto indica que no se detectó tráfico de estos receptores en las neuronas de la corteza insular como consecuencia del consumo de un sabor novedoso.

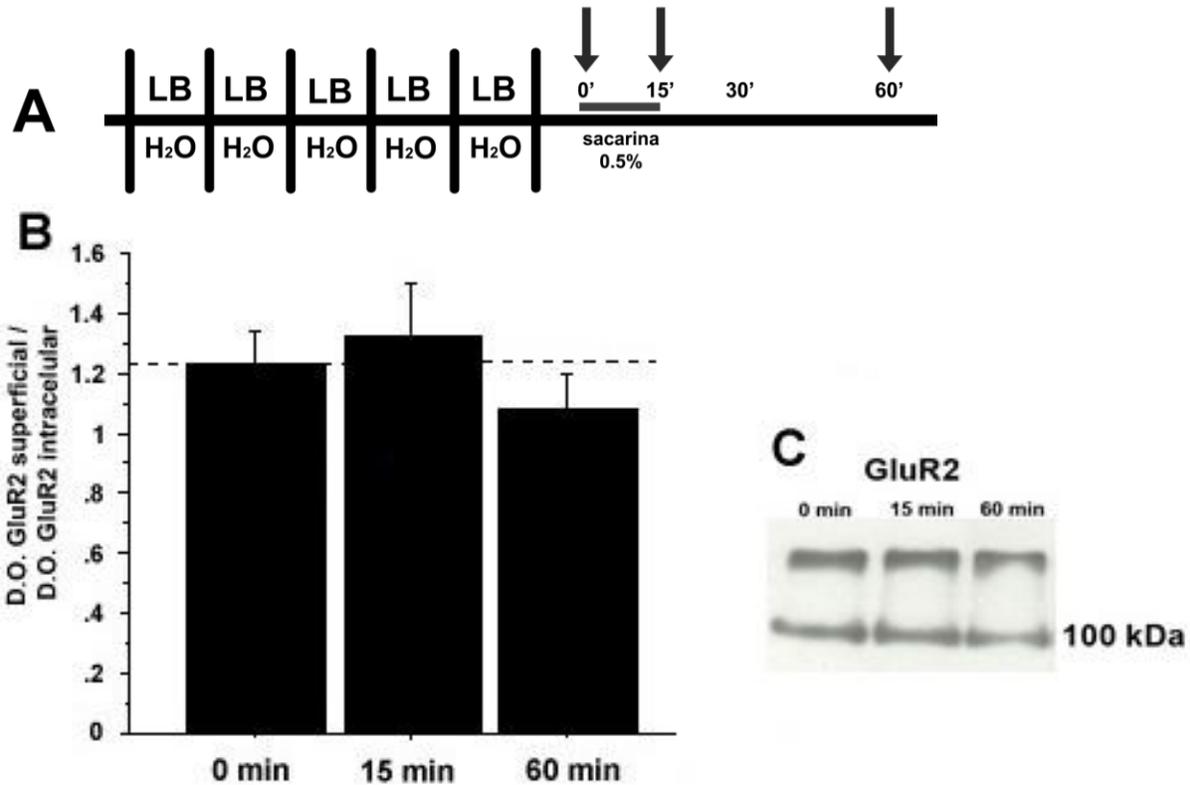


Figura 10. Estímulo gustativo novedoso (N). No hay cambios significativos en la distribución membranal / intracelular de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en la corteza insular de animales que han consumido un sabor novedoso, antes de probarlo (0 min), y a los 15 y 60 minutos de comenzar a beberlo ($n = 4, 7$ y 6 respectivamente). A) Protocolo conductual, B) Gráfica del promedio del cociente entre la densidad óptica de la banda membranal y la intracelular. Se muestra el error estándar; la línea punteada representa el promedio de este índice en animales que nunca fueron privados de líquido (CAJA) C) Imagen representativa de la inmunorreactividad de ambas bandas.

Por otro lado, en la condición F2, donde los animales bebieron sacarina 0.5% por segunda vez, se observa una tendencia a que con respecto a los 0 minutos, aumente a los 15 minutos la proporción GluR2 membranal/ intracelular, y que disminuya de nuevo a los 60 minutos (figura 11). Sin embargo, esta tendencia no resulta estadísticamente significativa (ANOVA de una vía, $F_{2,12} = 0.401$, $p = 0.7761$).

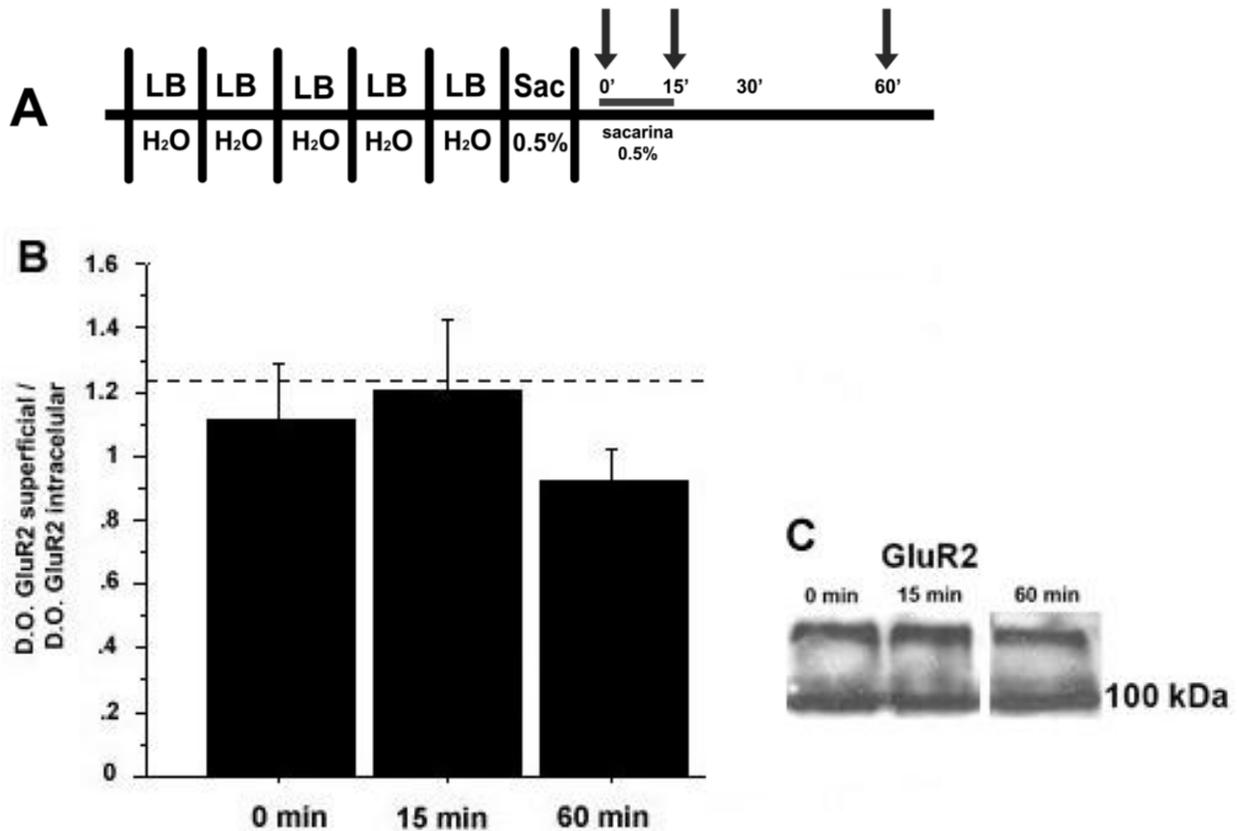


Figura 11. Estímulo gustativo administrado por segunda vez (F2). No hay cambios significativos en la distribución membranal / intracelular de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en la corteza insular de animales que han consumido un sabor familiar, antes de probarlo (0 min), y a los 15 y 60 minutos de comenzar a beberlo ($n = 5, 7$ y 3 respectivamente). A) Protocolo conductual, B) Gráfica del promedio del cociente entre la densidad óptica de la banda membranal y la intracelular. Se muestra el error estándar; la línea punteada representa el promedio de este índice en animales que nunca fueron privados de líquido (CAJA) C) Imagen representativa de la inmunorreactividad de ambas bandas.

En la condición F5, donde los animales consumieron por quinta vez sacarina 0,5%, es decir un sabor muy familiar, se dio una disminución significativa en la proporción GluR2 membranal/intracelular a los 60 minutos de haber bebido, con respecto a los 0 minutos (ANOVA de una vía, $F_{2, 12} = 4.360$, $p = 0.0377$, prueba *post hoc* de Fisher 0 min vs. 60 min $p = 0.126$), como se muestra en la figura 12. Esto indica que en ese tiempo, en las neuronas de la corteza insular hubo una disminución de la localización de receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2, como consecuencia de haber bebido por quinta ocasión.

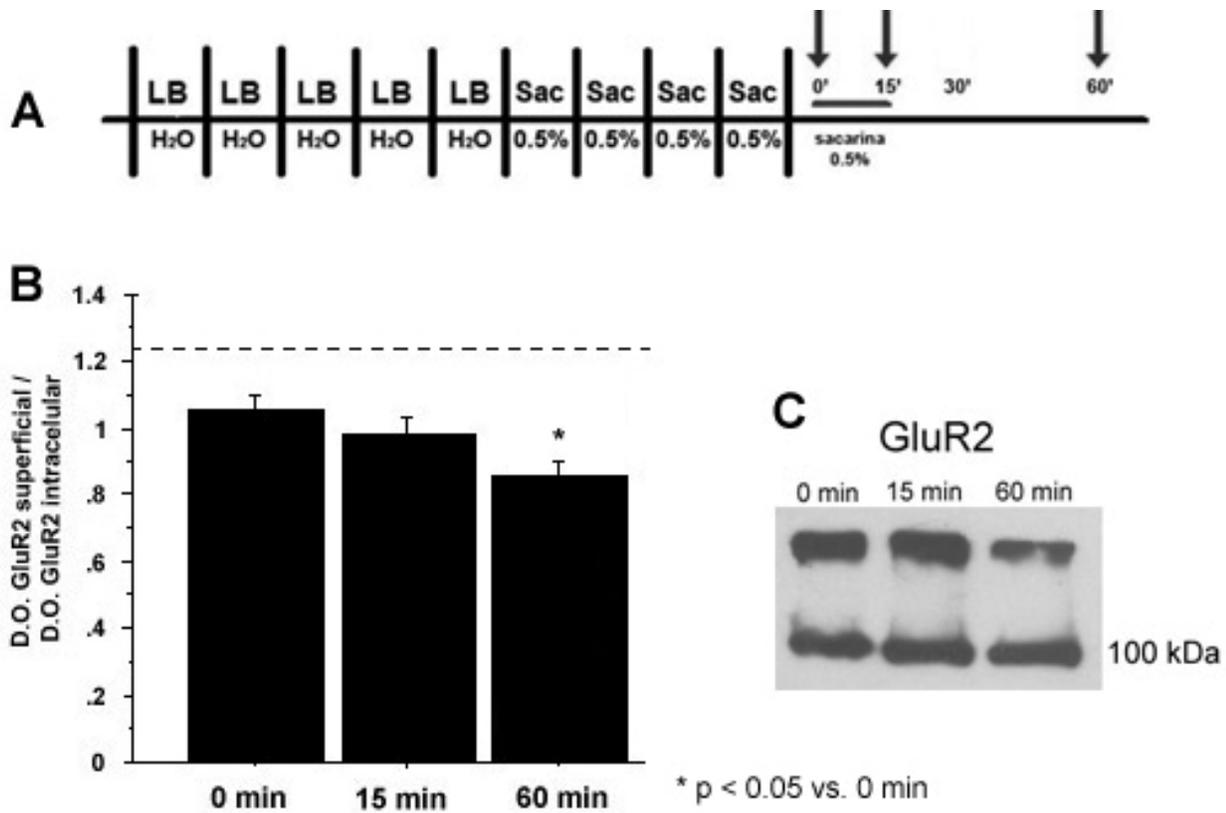


Figura 12. Estímulo gustativo administrado por quinta vez (F5). Disminución de la distribución membranal / intracelular de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en la corteza insular de animales que han consumido un sabor familiar, a los 60 minutos de haberlo probado con respecto a los 0 minutos ($n = 5$ para todos los grupos). A) Protocolo conductual, B) Gráfica del promedio del cociente entre la densidad óptica de la banda membranal y la intracelular. Se muestra el error estándar; la línea punteada representa el promedio de este índice en animales que nunca fueron privados de líquido (CAJA). C) Imagen representativa de la inmunorreactividad de ambas bandas.

Adicionalmente se realizó una prueba estadística para buscar diferencias entre los grupos de 0 minutos y los sujetos del grupo CAJA, que nunca fueron privados de líquido, para saber si esta privación tuvo algún efecto en la distribución de receptores AMPA. No se encontraron diferencias en el cociente AMPA membranal / AMPA intracelular, entre estos grupos (ANOVA de una vía, $F_{3,14} = 0.483$, $p = 0.6993$).

Discusión

El presente estudio es una primera aproximación al uso del ensayo de *crosslinking* con un agente impermeable a la membrana, para detectar cambios en la expresión de la subunidad GluR2 del receptor AMPA localizada en la membrana, respecto a la cantidad de la misma expresada en el citoplasma (proporción AMPA membranal/ AMPA intracelular). Esto, en la corteza insular de animales que llevaron a cabo una tarea de reconocimiento gustativo. La técnica fue exitosa en detectar una disminución en esta proporción, a los 60 minutos de que los animales bebieran un sabor muy familiar (por quinto día consecutivo), lo cual no sucedió cuando bebieron un sabor novedoso o poco familiar.

Para analizar el significado e implicaciones que puede tener este cambio en la localización de receptores en el establecimiento de la memoria de reconocimiento gustativa, a continuación se mencionarán otros estudios acerca de dos aspectos de los resultados obtenidos en este trabajo: por un lado eventos bioquímicos que ocurren en la familiarización con un estímulo gustativo seguro, y por otro el tráfico de receptores AMPA ante la actividad neuronal.

Respecto a la formación del trazo de memoria de reconocimiento gustativa, en varios reportes se han resaltado los eventos neuroquímicos y celulares que se relacionan con la novedad y cómo van disminuyendo su intensidad mientras el estímulo se presenta repetidamente. Uno de ellos es la liberación de acetilcolina (ACh) en la corteza insular, que va disminuyendo conforme el animal se familiariza con el sabor (Miranda et al., 2000). La fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA (Rosenblum et al., 1997) y de la proteína ERK1/2 (Berman et al., 1998) ocurre con el estímulo novedoso y no con el familiar. Asimismo, el factor de transcripción *c-fos* se expresa en menor medida con el estímulo familiar que con el novedoso (Koh et al., 2003), y en general la memoria gustativa segura deja de ser susceptible a inhibidores de síntesis de proteínas en la corteza insular cuando el sabor es muy familiar (Rodríguez-Ortiz et al., 2005). Importantemente, se ha reportado aumento en el contenido de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en la fracción resistente a detergente de muestras de la corteza insular de animales que 15 minutos antes bebieron un sabor novedoso. Este aumento no se observa cuando el sabor se vuelve familiar y al igual que la memoria en esta tarea, es sensible al bloqueo de receptores muscarínicos de ACh (Núñez-Jaramillo et al., 2008).

Estos antecedentes parecen apuntar a una serie de eventos intracelulares que ocurren en las células de la corteza insular en una ventana temporal posterior al consumo del sabor novedoso, presumiblemente para establecer el trazo de memoria, y que dejan de ser requeridos conforme el sabor se presenta repetidamente y se vuelve familiar. Lo anterior es consistente con la visión clásica de la consolidación de la memoria. Sin embargo, también hay evidencias de otros eventos que continúan ocurriendo cuando el animal prueba un sabor familiar. Por ejemplo, está el caso de PKM ζ , una isoforma de PKC que actúa promoviendo la inserción de receptores AMPA en la postsinapsis. Esta molécula es indispensable para el mantenimiento del LTP y de memorias largo plazo como el condicionamiento aversivo al sabor, ya que si es inhibida su actividad farmacológicamente en zonas del cerebro relacionadas con una tarea ya aprendida - incluso semanas antes-, los animales parecen olvidarla (Shema et al., 2007; Sacktor, 2011). La expresión de la proteína Arc en células de la corteza gustativa no sólo continúa sino que aumenta con la familiaridad del sabor -hasta 5 días, donde ya hay una asíntota de consumo- (Morin, et al., 2011). También

Los resultados obtenidos en el presente estudio, donde únicamente cuando los animales prueban un sabor muy familiar hay una disminución de receptores AMPA en la membrana de las células de la corteza insular, parecen formar parte del grupo de fenómenos que ocurren en al evocar una memoria ya establecida. Otra manera de identificar cambios persistentes en la manera en que el cerebro responde a la información previamente encontrada, es a través de registros electrofisiológicos. En el caso particular de la familiaridad con el sabor, se ha reportado que en la corteza gustativa, la respuesta promedio de la población neuronal ante un sabor familiar, incrementa en los últimos 5 de los 7 segundos que dura (Bahar et al., 2004). Este aumento en la actividad neuronal y los procesos celulares que mantienen un incremento en la eficiencia sináptica, podrían a su vez requerir de mecanismos de escalamiento homeostático que involucraran la internalización de receptores AMPA.

Si este fuera el caso, el escalamiento no afectaría la actividad global de una población de neuronas, y reduciría la cantidad de receptores AMPA en las membranas de todas las células de la red que se activa con el consumo del sabor. Se mantendría alta la eficiencia de aquellas sinapsis que fueron facilitadas en el pasado, y baja la de aquellas que no lo fueron.

Esta interpretación de los datos podría ser apoyada por los estudios previos de la acción de la proteína Arc promoviendo la endocitosis de receptores AMPA, ya que su expresión en las dendritas de las células de la corteza gustativa incrementa cuando los animales beben un sabor familiar, en la misma temporalidad que lo reportado en el presente estudio (60 minutos).

Por su puesto, se requerirían experimentos adicionales para explorar esta correlación, ya que hasta el momento no se ha confirmado que *Arc* participe en el establecimiento de una memoria largo plazo a través de la plasticidad homeostática. Además, los estudios que tratan el papel de la proteína *Arc* en la endocitosis de receptores AMPA, en general reportan efectos en la subunidad GluR1. Por ejemplo, neuronas *Arc*-KO muestran constitutivamente un aumento en subunidades GluR1 pero no GluR2 en la superficie membranal. Sin embargo, al sobre-expresarse la proteína en neuronas WT, hay una disminución de subunidades tanto GluR1 como GluR2 en la membrana (Shepherd et al., 2006). Asimismo, ante los periodos de bloqueo crónico de actividad que normalmente se utilizan para provocar fenómenos homeostáticos, los receptores AMPA que se trafican entre la membrana y el citoplasma, no contienen la subunidad GluR2, aunque son sustituidos en el transcurso de 12-24 horas por otros que sí la contienen (Isaac et al., 2007). La plasticidad homeostática es un campo en intenso desarrollo que aún carece de reportes que lo ligen como parte de procesos mucho más complejos en el organismo completo, en parte tal vez porque para poder observar fenómenos homeostáticos aún es necesario provocar cambios extremos y artificiales, lo cual puede ser distinto en un futuro, en cuanto nuestros conocimientos y tecnología lo permitan.

Como perspectivas de este proyecto, hay algunos experimentos que se podrían hacer para determinar las implicaciones de los datos que se obtuvieron. En primer lugar sería importante realizar inmunoblots contra las demás subunidades del receptor AMPA, ya que aunque la GluR2 es la más abundante, la regulación de la composición de los heterodímeros del receptor tiene implicaciones funcionales y puede ser distinta para cada tipo. Los cambios aquí reportados pueden o no extenderse a las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4.

Asimismo, se podrían hacer inmunoprecipitaciones con alguna proteína marcadora de sinapsis, como PSD-95, de las muestras tratadas con el agente entrecruzador BS³, de tal manera que sea posible aislar las proteínas sinápticas entrecruzadas. Esto afinaría la detección del tráfico de receptores en la sinapsis, descartándose o confirmándose un posible enmascaramiento de los resultados por sucesos que no ocurren extrasinápticamente.

Para saber si la internalización de receptores AMPA en el reconocimiento del sabor seguro tiene una relación con la expresión de la proteína *Arc* en esta misma tarea, se podrían realizar los mismos experimentos con animales *Arc*-KO, o inhibir la traducción de esta proteína inyectando localmente en la corteza insular oligonucleótidos antisentido. Si se bloqueara la disminución de subunidades AMPA en la membrana, se apuntaría a que *Arc* juega algún papel

en ello, apoyando la hipótesis de que promueve la endocitosis de receptores AMPA en las neuronas.

Asimismo, se podría inhibir farmacológicamente la endocitosis de receptores AMPA en la corteza insular, por ejemplo a través de la inyección de un péptido sintético como el Tat-GluR2_{3Y}, el cual contiene residuos de tirosina que al unirse al receptor bloquean su internalización. Entre otros efectos, este tratamiento impide la expresión de la LTD y la extinción del condicionamiento al miedo (Dalton et al, 2008). Esto permitiría saber si este proceso celular es indispensable para la consolidación o evocación de la memoria de reconocimiento del sabor seguro.

En cuanto a la técnica utilizada en este trabajo, cabe mencionar que fue la primera experiencia en el laboratorio con el entrecruzamiento de proteínas membranales como método de detección de tráfico de receptores *in vivo*.

Al evaluar un método para detectar cambios en la localización del receptor AMPA de muestras provenientes de animales que llevaron a cabo una tarea conductual, la subunidad GluR2 fue adecuada, ya que la gran mayoría de los receptores AMPA que se encuentran en el SNC contienen esta subunidad. Por ejemplo, en células piramidales del hipocampo y corteza del cerebro adulto, la mayoría de estos receptores son heterodímeros GluR1/GluR2, y una pequeña fracción son heterodímeros GluR2/GluR3 (Isaac et al., 2007). Esta subunidad es de gran importancia funcional para los canales AMPA, pues los hace muy poco permeables al Ca²⁺ gracias al sitio Q/R que por la presencia de una arginina bloquea la entrada de dicho ión, e impide que sean bloqueados intracelularmente por poliaminas. Además, juega un papel importante en el ensamblaje y la expresión del tetrámero (Sans et al., 2003).

Como se mencionó en los antecedentes de este proyecto, el estudio de tráfico de receptores *in vivo* es metodológicamente complicado. Cuando se trata de cultivos celulares existen varias opciones, por ejemplo, utilizar anticuerpos conjugados a marcadores como la biotina, que se unan a los receptores en las superficie de las células, para posteriormente analizar cuáles de ellos fueron internalizados después del tratamiento experimental (Ivanov, 2008). Esta aproximación metodológica se vuelve implausible cuando las células que se quieren analizar forman parte de un complejo tejido, y el tratamiento experimental consiste en que el animal realice conductas. Otra técnica es la microscopía electrónica posterior al marcaje específico de los receptores con inmunogold (Cheng et al., 2011), lo cual es sumamente costoso y el análisis muy complejo.

La alternativa a la que más se recurre cuando se trabaja *in vivo* con animales que llevan a cabo pruebas conductuales, es la preparación de sinaptoneurosomas, que son preparaciones subcelulares enriquecidas en estructuras pre- y post-sinápticas. Para ello, el tejido es homogenizado en una solución isotónica de sacarosa (Jordan et al., 2006). Este método ha sido utilizado extensamente para reportar eventos de tráfico de receptores en estructuras específicas del cerebro después de tareas conductuales. Por ejemplo Whitlock y cols. (2006) reportaron un aumento en el contenido de la subunidad GluR1 en sinaptoneurosomas preparados de muestras de tejido hipocámpal, después de un ensayo en la tarea de prevención pasiva, en la que el animal debe aprender a no cruzar de un compartimento iluminado a uno oscuro, pues ahí se le administran choques eléctricos en las patas. Sin embargo, la redistribución de los receptores en las fracciones que se preparan, no necesariamente implica que están en la sinapsis, o insertados en la superficie de la célula (Boudreau y Wolf, 2005).

Desde 2005, se ha reportado en varios artículos el uso de las propiedades del BS³ como entrecruzador de proteínas impermeable a la membrana para detectar cambios en la localización de receptores, particularmente AMPA (Boudreau y Wolf, 2005, Gould et al., 2007, Carino et al., 2011). Desde que se propuso este ensayo de *crosslinking* proteico, se planteó que puede ser usado en cualquier modelo animal, ya que una vez que la muestra fue tratada y congelada, sirve como un banco de tejido que puede ser usado para analizar cualquier receptor o molécula de señalización (Bodreau y Wolf, 2005).

Un método muy similar es el fraccionamiento celular a través de ciclos de centrifugación diferencial, que también permite la obtención de *pools* separados de proteínas localizadas en membrana y citoplasma. La ventaja que el ensayo de *crosslinking* tiene sobre el fraccionamiento celular es que el tratamiento a la muestra de tejido es sumamente sencillo y no sobra decir, barato. La mayor limitación de estos dos métodos es la imposibilidad de distinguir la localización sináptica de la extrasináptica, sin embargo pueden ser complementados con ensayos de co-inmunoprecipitación con marcadores sinápticos como PSD-95. Esta limitación también puede causar una subestimación de los eventos ocurridos en la sinapsis, cuya magnitud esté enmascarada o diluida por la contribución extrasináptica al *pool* de proteínas membranales.

Constantemente se están desarrollando y perfeccionando métodos para el estudio de tráfico de receptores *in vivo*. Uno de los más recientes es el etiquetado electrofisiológico (*electrophysiological tagging*), que consiste en expresar receptores genéticamente modificados para tener características funcionales particulares, y monitorear su aparición o desaparición en la superficie membranal (Thomas y Smart, 2006). Originalmente esta técnica se utilizaba sólo

en cultivos celulares, pero ya hay reportes de su uso en animales vivos (Mitsushima, 2011). Con sus características, ventajas y desventajas, los distintos métodos proveen información complementaria para tener un panorama de los eventos plásticos que involucran movimiento de receptores en la sinapsis. Indudablemente, es necesario continuar la validación del ensayo de *crosslinking* con BS³ para detectar tráfico de receptores, por ejemplo aplicando otras técnicas a las mismas muestras. Mientras este método se vuelva más confiable, se podrán aprovechar sus ventajas y con él se podrá obtener información sobre las proteínas membranales de cualquier tejido.

Referencias

- Abbot, L.F. y Nelson, S.B. (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*, 3, 1178-1183.
- Abraham, W.C. y Bear, M.F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neuroscience*, 19, 126-130.
- Accolla, R., Bathellier, B., Petersen, C.C.H. y Carleton, A. (2007). Differential Spatial Representation of Taste Modalities in the Rat Gustatory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 28, 11760–11767.
- Ashby, M.C., Daw, M.I., Isaac, J.T.R. (2008) AMPA Receptors. En Gereau, R.W. (Ed.) *The Glutamate Receptors*. EUA: Humana Press, pp. 1-44.
- Bahar, A., Dudai, Y. y Ahissar, E. (2004). Neural Signature of Taste Familiarity in the Gustatory Cortex of the Freely Behaving Rat. *Journal of Neurophysiology*, 92, 3298-3308.
- Berman, D.E., Hazvi, S. Neduva, V. y 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. *The Journal of Neuroscience*, 20, 7017-7023.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. y Dudai, Y. (1998) Specific and Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades by Unfamiliar Taste in the Insular Cortex of the Behaving Rat. *The Journal of Neuroscience*, 18, 10037-10044.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular Mechanisms of Taste-Recognition Memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 209-217.
- Boudreau, A.C. y Wolf, ME. (2005) Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 25, 9144-9151.
- Carino, C., Fibuch, E.E., Mao, L. y Wang, J.Q. (2012) Dynamic loss of surface-expressed AMPA receptors in mouse cortical and striatal neurons during anesthesia. *Journal of Neuroscience Research*, 90, 315-323.
- Carleton, A., Accolla, R. y Simon, S.A. (2010) Coding in the mammalian gustatory system. *Trends in Neuroscience*, 33, 326-335.
- Chávez-Hurtado, J.C. (2011). *Modulación de las proteínas ERK1/2 y ARC durante la formación de la memoria gustativa*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F, pp. 28-43.

- Cheng, J.T., Crocker, V.T., Winters, C.A., Azzam, R., Chludzinski, J. y Reese, T.S. (2011) Trafficking of AMPA receptors at plasma membranes of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 31, 4834-4838.
- Chowdhury S., Shepherd J.D., Okuno H., Lyford G., Petralia R.S., Plath N., Kuhl D., Huganir R.L. y Worley P.F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52, 445– 459.
- Contractor, A., Mulle, C. y Swanson, G.T. (2011) Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends in Neuroscience*, 34, 154-163.
- Dalton, G.L., Wang, Y.T., Floresco, S.B. y Phillips, A.G. (2008) Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropharmacology*, 33, 2416-2426.
- Davis, H.P. y Squire, L.R. (1984) Protein Synthesis and Memory: A Review. *Psychological Bulletin*, 3, 518-559.
- De la Cruz, V., Rodríguez-Ortiz, C.J., Balderas, I., Bermúdez-Rattoni, F. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *European Journal of Neuroscience*, 28, 1377-1781.
- Destexhe, A. y Marder, E. (2004). Plasticity in single neuron and circuit computations. *Nature*, 431, 789-795.
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations or, How Stable is the Engram? *Annual Reviews of Psychology*, 55, 51-86.
- Escobar, M.L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852, 208-212.
- Escobar, M.L y Derrick, B. (2007). Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory Formation. En Bermúdez-Rattoni, F. (Ed.) *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*, EUA: CRC Press, pp.15-46.
- Figueroa-Guzmán, Y., Kuo, J.S. y Reilly, S. (2006). NMDA receptor antagonist MK-801 infused into the insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Research*, 1114, 183-186.
- Frankland, P.W. y Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 119-130.
- Gould, T.D., O'Donnell, K.C., Dow, E.R., Du, J., Chen, G., Manji, H.K. (2007). Involvement of AMPA receptors in the antidepressant-like effects of lithium in the mouse tail suspension test and forced swim test. *Neuropharmacology*, 54, 577-587.

- Gutiérrez, R., Téllez, L. A. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003a). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1556-1562.
- Gutiérrez, R., Rodríguez-Ortiz, C.J., De La Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003b). Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 323-331.
- Guzmán-Ramos, K.R. (2010). *Neuroquímica de la adquisición y consolidación de la memoria gustativa de aversión en la corteza insular y amígdala*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., y Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2, 1120–1124.
- Guzowski, J.F. y Worley, P. F. (2001). Cellular Compartment Analysis of Temporal Activity by Fluorescence In Situ Hybridization (catFISH). *Current Protocols in Neuroscience*, 1.8.1-1.8.16.
- Hassel, B. y Dingledine, R. (2006). Glutamate. En Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T. y Price, D.L. (Ed.) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7ma edición. Canadá: Academic Press, pp. 267-290.
- Hayasi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., y Manilow, R. (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*, 287, 2262-2267.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory* EUA: John Wiley and Sons, pp.60-79.
- Heifets, B.D. y Castillo, P.E. (2009). Endocannabinoid Signaling and Long-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology*, 71, 283-306.
- Hermanson, G.T. (2008) *Bioconjugate Techniques*. USA: Academic Press. Pp. 1007-1010.
- Isaac, J.T.R., Ashby, M.C. y McBain, C.J. (2007) The Role of the GluR2 Subunit in AMOA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 54, 859-871.
- Jordan, B.A., Fernholz, B.D., Neubert, T.A. y Ziff, E.B. (2006) New Tricks for an Old Dog: Proteomics of the PSD. En Kittler, J.T. y Moss, S.J. *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology*. EUA: CRC Press, pp. 37-56.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2000). *Principles of Neural Science*. EUA: McGraw-Hill, pp. 1259-1265.

- Katz, D.B., Simon, S.A. y Nicolelis, M.A.L. (2001). Dynamic and Multimodal Responses of Gustatory Cortical Neurons in Awake Rats. *The Journal of Neuroscience*, 21, 4478-4489.
- Kessels, H.W. y Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron*, 61, 340-350.
- Koh, M.T., Wilkins, E.E., y Bernstein, I.L. (2003) Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: Implication for taste aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, 117, 1416-1422.
- Lechner, H.A., Squire, L.R. y Byrne, J.H. (1999) 100 Years of Consolidation- Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*, 6, 77-87.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., y Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5734–5738.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A. y Worley, P.F. (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.
- Malinow, R. y Malenka, R.C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Reviews of Neuroscience*, 25, 103-126.
- McCormack, S.G., Stornetta, R.L. y Zhu, J.J. (2006) Synaptic AMPA Exchange Maintains Bidirectional Plasticity. *Neuron*, 50, 75-88.
- McKenzie, S., y Eichenbaum, H. (2008) Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? *Neuron*, 71, 224-233.
- Menzel, R. (2008) Introduction and Overview. En Menzel, R. y Byrne, J.H. (Ed.) *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 1, 1-9.
- Milner, B., Squire, L.R., y Kandel, E.R. (1998) Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, 20, 445-468.
- Miranda, M.I., Ramírez-Lugo, L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, 882, 230-235.
- Miranda, M.I., Rodríguez-García, G., Reyes-López, J.V., Ferry, B. y Ferreira, G. (2008). Differential effects of β -adrenergic receptor blockade in basolateral amígdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 54-61.

- Mitsushima, D., Ishihara, K., Sano, A., Kessels, H.W. y Takahashi, T. (2011) Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 12503-12508.
- Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G. y Guzowski, J.F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 269-284.
- Morin, J.P., Quiroz, C., Mendoza-Viveros, L., Ramirez-Amaya, V., y Bermúdez-Rattoni F. (2011) Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one. *Learning and Memory*, 18, 610-616.
- Moser, E.I., Krobot, K.A., Moser, M.B. y Morris, R.G. (1998) Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science*, 25, 2038-2042.
- Nakagawa, T. (2010) The biochemistry, ultrastructure, and subunit assembly mechanism of AMPA receptors. *Molecular Neurobiology*, 42, 161-184.
- Nakagawa, T., Cheng, Y., Ramm, E., Sheng, M. y Walz, T. (2005) Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. *Nature*, 433, 545-549.
- Nelson, S.B. y Turrigiano, G.G. (2008). Strength through Diversity. *Neuron*, 60, 477-482.
- Normann, C., Peckys, D., Schulze, C.H., Walden, J., Jonas, P. y Bischofberger, J. (2000). Associative Long-Term Depression in the Hippocampus Is Dependent on Postsynaptic N-Type Ca^{2+} Channels. *The Journal of Neuroscience*, 20, 8290–8297.
- Núñez-Jaramillo, L., Jimenez, B., Ramírez-Munguía, N., Delint-Ramírez, I., Luna-Illades, C., Tapia, R. y Bermúdez-Rattoni, F. (2008) Taste novelty induces intracellular redistribution of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor in the insular cortex. *Brain Research*, 1215, 116-122.
- Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., y Miranda, M.I. (2010). Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behavioral Brain Research* 207, 232-248.
- Ogawa, H., Ito, S., Murayama, N. y Hasegawa, K. (1990). Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neuroscience Research*, 9, 196-201.
- Park, S., Park, J.M., Kim, S., Kim, J.A., Shepherd, J.D., Smith-Hicks, C.L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A.G., Huganir, R.L., Linden, D.J. y Worley, P.F. (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.

- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M.R., Lipp, H., Grant, S.G.N., Bliss, T.V.P., Wolfer, D.P. y Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52, 437– 444.
- Rial-Verde, E.M., Lee-Osbourne, J., Worley, P.F., Malinow, R. y Cline, H.T. (2006). Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*, 52, 461-74.
- Rodríguez-Ortíz, C.J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R. y Bermúdez-Rattoni, F. (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning and Memory*, 12, 533-537.
- Roediger, H.L., Zaromb, F.M. y Goode, M.K. (2008). A Typology of Memory Terms. En Menzel, R. y Byrne, J.H. (Ed.) *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 1, 11-24.
- Rogan, M.T., Stäubli, U.V. y LeDoux, J.E. (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 391, 604-607.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, S., Lamprecht, R. y Dudai, Y. (1997) NMDA Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of Its 2B Subunit in Taste Learning in the Rat Insular Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 17, 5129-5135.
- Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A. y Malinow, R. (2005) Postsynaptic Receptor Trafficking Underlying a Form of Associative Learning. *Science*, 308, 83-88.
- Sacktor, T.C. (2011) How does PKM ζ maintain long-term memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 9-15.
- Sans, N., Vissel, B., Petralia, R.S., Wans, Y.X., Chang, K., Royle, G.A., Wnag, C.Y., O’Gorman, S., Heinemann, S.F. y Wenthold, R.J. (2003) Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. *Journal of Neuroscience*, 23, 9367-9373.
- Shema, R., Sacktor, T.C. y Dudai, Y. (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM ζ . *Science*, 317, 951-953.
- Shepherd, J.D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L. y Worley, P.F. (2006). Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*, 52, 475– 484.
- Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L. y Worley, P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21, 741-751.

- Steward, O. y Worley, P. (2002). Local Synthesis of Proteins at Synaptic Sites on Dendrites: Role in Synaptic Plasticity and Memory Consolidation? *Neurobiology of Learning and Memory*, 78, 508-527.
- Thomas, P. y Smart, T.G. (2006) Receptor Dynamics at the Cell Surface Studied Using Functional Tagging. En Kittler, J.T. y Moss, S.J. *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology*. EUA: CRC Press, pp.155-176.
- Tsien, J.Z. (2006). Learning and Memory. En Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T. y Price, D.L. (Ed.) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7ma edición. Canadá: Academic Press, pp. 859-874.
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C y Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in cortical neurons. *Nature*, 391, 892-896.
- Vassilieva, E.V. y Nusrat, A. (2008) Vesicular Trafficking: Molecular Tools and Targets. En Ivanov, A.I. (Editor) *Methods in Molecular Biology 440: Exocytosis and Endocytosis*. USA: Humana, pp. 3-14.
- Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, P., Staubli, U., Kauselmann, G., Bundman, M., y 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. *The Journal of Neuroscience*, 21, 5482-5493.
- Waung, M.W., Pfeiffer, B.E., Nosyreva, E.D., Ronesi, J.A. y Huber, K.M. (2008). Rapid Translation of Arc/Arg3.1 Selectively Mediates mGluR-Dependent LTD through Persistent Increases in AMPAR Endocytosis Rate. *Neuron*, 59, 84-97.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G. y Bear, M.F. (2006). Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science*, 25, 1093-1097.
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y. y Kitamura, R. (1989). Taste Responses of Cortical Neurons in Freely Ingesting Rats. *Journal of Neurophysiology*, 61, 1244-1258.
- Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T. y Yashoshima, Y. (1998a). Roles of Chemical Mediators in the Taste System. *Japanese Journal of Pharmacology*, 76, 325-348.
- Yamamoto, T. (1998b) Electrophysiology of CTA. En Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (Eds.) *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*. Gran Bretaña: Oxford University Press, p. 76-91.