



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

EFFECTO DE LA ANISOMICINA SOBRE  
LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ARC  
EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE  
LA TAREA DE ATENUACIÓN A LA NEOFOBIA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A

DIANA AKETZALI GARCÍA GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos académicos**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni y bajo su dirección. Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 155242 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM IN209413.

Primero quiero agradecer al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A mis sinodales: Dr. Octavio García González, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dra. Israela Balderas y Dr. Cesar Casasola Castro, por sus correcciones y comentarios precisos durante la revisión del presente trabajo.

Al M. en C. Daniel Osorio Gómez por dedicar tiempo para revisar el primer escrito y señalar todo tipo de errores, y a la M. en C. Carla Cadena del Castillo por apoyarme en el trabajo experimental.

A la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular, y en especial al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela por brindarme su apoyo.

A mis compañeros, por los tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio: Daniel, Kioko, Mónica, Lucía, Jorge, Consuelo y Carla.

A las Técnicas Académicas Dra. Israela Balderas y la Q.F.B. Perla Moreno Castilla, por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

A mi segunda casa, la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Dedicatorias**

A mi papá, Héctor García, por encaminarme al mundo de la ciencia desde temprana edad y enseñarme la importancia del trabajo dentro de la sociedad. Eres el hombre que más admiro. A mi mamá, Herlinda Gutiérrez, porque sembraste los cimientos de la mujer que hoy soy. A mis hermanos, Héctor García y René García, por formarme carácter y quererme tanto. A mis tíos, primos y sobrinos, por la maravillosa familia que son.

A Rodrigo Rico, por recordarme que es mejor compartir las alegrías y las tristezas. Gracias por sostenerme en los momentos de fragilidad y compartir el mismo prisma para mirar la vida. Aquí existe el amor.

A mi querida jardinera: Alejandro Suantz, Rocío Valle, Juan Manuel Vargas y Rodrigo Monjaraz, porque en ustedes encontré quien soy y el significado de pertenecer a un grupo.

A Yesenia Hernández, por los enojos y las alegrías. Te quiero mujer.

A Luis Palacios, Ingrid Vázquez, Fernando Pantoja, Marcos Monzón, Esther Luna y Karla Serrano, por el número infinito de risas guardadas.

A Alejandro Rivera, mi amigo y colega, gracias por siempre contagiar tu pasión por el conocimiento.

*Una vida sin memoria no sería vida, como una inteligencia sin posibilidad de expresarse no sería inteligencia.*

*Nuestra memoria es nuestra coherencia, nuestra razón, nuestra acción, nuestro sentimiento.  
Sin ella, no somos nada...*

*-Luis Buñuel-*

*A mi mamá, nunca te has ido.*

## Índice

A) Lista de figuras.....	4
B) Lista de abreviaturas.....	5
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
2.1 Plasticidad sináptica.....	11
2.2 ¿Qué es la memoria?.....	15
2.3 Consolidación de la memoria.....	17
2.4 Genes de expresión temprana.....	20
2.5 Arc, un gen de expresión temprana.....	21
2.6 Arc en plasticidad sináptica.....	24
2.7 Arc en la consolidación de la memoria.....	26
2.8 Memoria de reconocimiento al sabor.....	28
2.9 Atenuación a la neofobia.....	30
3. Planteamiento del problema.....	37
3.1 Hipótesis.....	37
3.2 Objetivo general.....	38
4. Experimento 1: Curva conductual de atenuación a la neofobia.....	38
4.1 Objetivos particulares.....	38
4.2 Materiales y método.....	38
4.3 Resultados.....	42
5. Experimento 2: Descripción de la expresión de la proteína Arc en dendritas de la corteza insular durante la atenuación de la neofobia.....	46

5.1	Objetivos particulares.....	46
5.2	Materiales y métodos.....	46
5.3	Resultados.....	51
6.	Discusión.....	56
6.1	La quinina es reconocida como un estímulo aversivo.....	56
6.2	La memoria de reconocimiento de sabor depende de la síntesis de proteínas.....	56
6.3	El incremento en la expresión de Arc se debe a la novedad del estímulo gustativo.....	57
6.4	El incremento en la expresión de Arc se debe a la propiedad aversiva del estímulo gustativo.....	59
6.5	Expresión de Arc en dendritas.....	60
6.6	Arc participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento de sabor.....	62
6.7	Limitaciones del estudio y perspectivas.....	63
7.	Conclusiones.....	64
8.	Referencias.....	65

## A) Lista de figuras

• Figura 1. Esquema de la LTP (o) y la LTD (●) en el giro dentado.....	13
• Figura 2. Esquema de plasticidad homeostática.....	14
• Figura 3. Esquema de la clasificación de la memoria.....	16
• Figura 4. Tipos de consolidación.....	18
• Figura 5. Mecanismo molecular de la anisomicina.....	19
• Figura 6. Curso temporal de la expresión de la proteína Arc en las regiones hipocampales CA1, CA3, y la corteza parietal (CP).....	24
• Figura 7. La expresión de Arc, modula la inserción/deserción de receptores AMPA.....	26
• Figura 8. Ejemplos de la afectación en la consolidación de la memoria en diferentes tareas conductuales con un ratón knockout ( <i>Arg 3.1/Arc</i> ) para <i>Arc</i> ....	28
• Figura 9. Atenuación a la neofobia.....	30
• Figura 10. Quinina como un estímulo gustativo aversivo.....	32
• Figura 11. Efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre la formación del trazo de memoria.....	34
• Figura 12. Expresión de Arc en la corteza insular.....	35
• Figura 13. Localización de Arc y Map-2.....	36
• Figura 14. Corte coronal de la corteza insular.....	42
• Figura 15. Curva de atenuación a la neofobia y efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas.....	45
• Figura 16. Imagen representativa (20x) de la corteza insular, utilizando inmnofluorecencia.....	51
• Figura 17. Imágenes representativas de cada uno de los grupos.....	53
• Figura 18. Coeficiente de Manders.....	55
• Tabla 1. Protocolo conductual.....	48



## Lista de abreviaturas

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AN	Atenuación a la neofobia
ANI	Grupo anisomicina, experimento 1
<i>Arc</i>	Gen de la proteína asociada al citoesqueleto
Arc	Proteína asociada al citoesqueleto
ASCF	Líquido cefalorraquídeo
<i>BDNF</i>	Gen del factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albumina suero bovino
CA1	Cuerpo de Amón 1
Ca <sup>2</sup>	Calcio
CA3	Cuerpo de Amón 3
CAJA	Grupo sin privación de agua, experimento 2
CAMKII	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CAS	Condicionamiento aversivo al sabor
CATFISH	Análisis por compartimentos celulares de la actividad temporal a través de hibridación in situ
CI	Corteza insular
CP	Corteza parietal
CREB	Elemento del unión del cAMP
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FISH	Fluorescencia mediante hibridación in situ
G	Gramos
GABA A	Receptor ionotrópico gabaérgico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HD	Hipocampo dorsal
<i>Homer 1a</i>	Gen de la proteína homóloga Homero 1a
Hz	Hertz
IEG's	Genes de expresión temprana
Kg	Kilogramos
LB	Linea base
LTD	Potenciación a largo plazo
LTP	Depresión a largo plazo
M	Molar
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína cinasa asociada a mitógeno
MECS	Estimulación eléctrica convulsiva
Mg	Miligramos
Mg <sup>2</sup>	Magnesio
mGluR5	Receptor metabotrópico glutamatergico
Min	Minutos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
Mm	Milímetros
NaCl	Cloruro de sodio
NaHO <sub>4</sub>	Borohidrato de sodio
<i>Narp</i>	Gen de la proteína de actividad regulada por pentraxina
NMDA	N-metil D-aspartato
PBS	Buffer de fosfatos con salina
PBS-T	PBS con Triton-X
PEPS	Potenciales excitatorios postsinápticos
PKC	Proteína cinasa C
Q1	Grupo quinina 1, experimento 2
Q1-Q7	Presentaciones del estímulo gustativo, experimento 1
Q2-ANI	Grupo quinina 2-anisomicina, experimento 2
Q2-VEH	Grupo quinina 2-vehículo, experimento 2
RNA	Ácido ribonucleico
Seg	segundos
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
Ube3a	Ligasa de ubiquitinación E3A
VEH	Grupo vehículo, experimento 1
VGCC	Canales dependientes de voltaje

## Resumen

Una de las características que han desarrollado los animales a través de la evolución es la memoria de reconocimiento al sabor, que les da, la habilidad de reconocer sabores nocivos o seguros encontrados en su ambiente. Cuando los animales prueban un sabor por primera vez se observa una respuesta neofóbica, sin embargo, si el sabor es reconocido como seguro, el consumo de sacarina incrementará en encuentros posteriores, a esto se le conoce como atenuación a la neofobia. Un sabor es considerado como nuevo, sólo en la primera presentación, después de ésta, es reconocido como familiar-aversivo si es asociado con una consecuencia negativa, o familiar-seguro en ausencia de una consecuencia negativa. Operacionalmente, estas definiciones, son inferidas a través del volumen ingerido durante las presentaciones del sabor, es decir, si el volumen sobrepasa el consumo basal de los animales, el sabor es identificado como familiar-seguro, y si el volumen se encuentra por debajo de la línea basal, es considerado como familiar-aversivo. Por otro lado, la consolidación de una nueva memoria es dependiente de la síntesis de proteínas de *novo* lo cual permite la estabilización de la memoria a lo largo del tiempo. Los genes de expresión temprana, son los primeros que se activan durante la formación del trazo de memoria, tienen efecto dentro de la señalización intracelular y en la transcripción de otros genes. *Arc*, el gen de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad, es un gen de expresión temprana, el cual participa en la consolidación de la memoria y es un marcador sináptico de la actividad neuronal.

En este trabajo, se observó el efecto de la anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en la consolidación y en la traducción de *Arc* durante la memoria de reconocimiento al sabor utilizando la tarea de atenuación a la neofobia. Para lo cual, se realizaron dos experimentos: 1) Se evaluó el cambio en el volumen ingerido durante la tarea, para lo cual se emplearon dos grupos de ratas de la cepa Wistar, al primer grupo (VEH, n=8) se le presentó quinina como estímulo gustativo por 15 minutos y al término de la sesión fue inyectado bilateralmente en la corteza insular con ACSF, los siguientes 6 días se continuó con la tarea. Para el segundo grupo (ANI, n=8) se realizó el mismo protocolo pero se administró anisomicina en la corteza insular. 2) Se utilizaron 4 grupos, a los grupos Q2-ANI y Q2-VEH, se les presentó el estímulo gustativo por 15 minutos y al término de la sesión fue inyectado bilateralmente en la corteza insular con anisomicina o ACSF, respectivamente. El siguiente día, se presentó el estímulo gustativo por segunda vez, y una hora después del inicio del consumo se sacrificaron los animales. Al grupo Q1 se le presentó el estímulo gustativo por 15 minutos y una hora después del inicio del consumo se sacrificaron los animales, este grupo no se le administró ningún fármaco. El último grupo, CAJA, no se le presentó ningún estímulo gustativo ni fue privado de agua. Para este experimento, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para detectar la superposición de la proteína *Arc* en dendritas de la corteza insular. Los resultados muestran un decremento en el volumen ingerido un día después de la administración de anisomicina, lo cual indica un retraso en la formación del trazo de memoria. Por otro lado, durante el experimento dos, se observó un incremento tanto en la expresión de *Arc*, como en la localización de la proteína en dendritas cuando se presentó el estímulo gustativo por primera vez y un día después de la administración de anisomicina. Este resultado sugiere, que la novedad del estímulo gustativo aversivo propicia un alza en la expresión de la proteína *Arc* en la corteza insular.

## 2. Introducción

Las neurociencias han crecido rápidamente en la última mitad del siglo XX, enfocándose en dos planos. En primer lugar el estudio del cerebro como una suma de procesos cognitivos: la percepción, el lenguaje, el aprendizaje y la memoria (Milner et al., 1998) y en segundo lugar el estudio celular y molecular de la neurobiología.

Históricamente, el análisis de cómo se almacena la memoria ha sido abordado por tres disciplinas: primero la filosofía, después la psicología y ahora la biología (Squire y Kandel, 2000). Hasta finales del siglo XIX el estudio de la memoria fue restringido al dominio de la filosofía (Squire y Kandel, 2000), a partir de cuestionamientos que buscaban comprender como el ser humano almacenaba información del mundo. Anterior a esto, el conocimiento del sistema nervioso se reducía a explicaciones de la medicina básica griega (Tortosa y Civera, 2006). El cambio se inició con René Descartes, él creía que cada persona tiene una mente, un atributo exclusivamente humano que no estaba sujeto a las leyes del universo. Su pensamiento difería del de sus predecesores, ya que fue el primero en sugerir que existe un nexo de unión entre la mente humana y su alojamiento físico, el cerebro; suponía que la mente controlaba los movimientos del cuerpo, mientras que el cuerpo, a través de sus órganos de los sentidos, aportaba información a la mente sobre lo que estaba pasando en su entorno. En concreto, propuso que esta interacción tenía lugar en la glándula pineal, un pequeño órgano localizado por encima del tronco cerebral (Carlson, 2006).

Más tarde, la frenología fue una propuesta de transición para concebir el estudio del cerebro como una ciencia, fue Joseph Gall (Tortosa y Civera, 2006), quien ofreció la

idea de que diferentes regiones del cerebro eran responsables de distintas funciones fisiológicas, incluyendo la memoria (McGaugh, 2007).

Por otro lado, en 1885, Hermann Ebbinghaus realizó los primeros experimentos enfocados al estudio de la memoria, para lo cual, presentó a sus pacientes una lista de sílabas sin sentido (por ejemplo, BIK o REN) y les pedía que las aprendieran, posteriormente, registró como se olvidaban las silabas a lo largo del tiempo. De su trabajo resultó la noción de dos principios básicos sobre el estudio de la memoria, 1) La memoria puede clasificarse de acuerdo a su temporalidad y, 2) La repetición de una tarea fortalece el trazo mnémico. A principios del siglo XX, el fisiólogo Ivan Pavlov y el psicólogo Edward Thorndike desarrollaron paradigmas conductuales para estudiar el aprendizaje en animales: el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante, respectivamente (Squire y Kandel, 2000). En el condicionamiento clásico, el animal aprende a asociar dos estímulos, por ejemplo, el primer estímulo puede ser el sonido de una campana, y el segundo estímulo la presencia de alimento, a diferencia del primer estímulo, el segundo provoca una reacción fisiológica (ej. salivación). Pavlov se refirió al sonido de la campana como estímulo condicionado, ya que la efectividad de este estímulo para provocar la salivación dependía de la asociación repetida con la presentación de la comida. Por el contrario, la presencia del alimento se denominó estímulo incondicionado, su efectividad para provocar la salivación es independiente de la asociación. La presentación del estímulo condicionado en ausencia de comida provoca la salivación, a esto se le conoce como respuesta condicionada. Por otro lado, durante el condicionamiento operante, el animal aprende a hacer una asociación entre la ejecución de una respuesta correcta y la presencia de un reforzador, o la ejecución

de una respuesta incorrecta seguida de un castigo. Gradualmente, la repetición de ensayos modifica su conducta (Domjan, 2010). A mediados de 1960, los fundadores de la psicología cognitiva, George Miller, Ulrich Neisser y Herber Simon, propusieron que la memoria es un proceso constructivo que depende de los estímulos físicos del entorno y de una representación mental creada por patrones neuronales (Milner et al., 1998).

El área de la biología comenzó a interesarse en los temas que abordaba la psicología cognitiva, siguiendo dos ejes en la investigación de la memoria: 1) Estudios sistemáticos, en los que se mapearon funciones cognitivas en áreas específicas del cerebro; Ésta vertiente, ha desarrollado métodos de estudio para observar las representaciones internas de los procesos cognitivos, lo cual, ha facilitado fomentar investigaciones sobre lo que ocurre dentro del cerebro cuando se evoca un recuerdo (Squire y Kandel, 2000), 2) estudios celulares y moleculares, por ejemplo, el modelo de Aplysia, un invertebrado con un sistema nervioso de tan sólo 20, 000 neuronas permitió realizar experimentos que correlacionaban el comportamiento y la actividad neuronal. Se encontró, que el reflejo de retirada de la Aplysia exhibe diferentes formas de aprendizaje que también presentan los mamíferos, como la habituación<sup>1</sup>, la sensibilización<sup>2</sup> y el condicionamiento clásico (Hawkins et al. 2006). A partir de estos descubrimientos, surgieron los primeros estudios para observar el mecanismo celular y molecular de la memoria (Kandel, 2009).

---

<sup>1</sup> Habituación. Es un tipo de aprendizaje generado por la presentación continua del mismo estímulo, lo cual provoca la disminución en la magnitud de la respuesta.

<sup>2</sup> Sensibilización. Tipo de aprendizaje que incrementa la magnitud de una respuesta mediante la presentación de un estímulo.

## 2.1 Plasticidad Sináptica

En 1949, Donald Hebb propuso la hipótesis del trazo dual, la cual establece la dinámica celular que subyace al aprendizaje. Ésta explica la presencia de ensambles de neuronas interconectadas en el cerebro que son activados por la experiencia y a través de la activación continua de dichas conexiones pueden fortalecerse o debilitarse a lo largo del tiempo, en respuesta del incremento o decremento de la actividad neuronal. A este proceso se le conoce como plasticidad sináptica (Hebb, 1949).

Tim Bliss y Terje Lømo, hace más de 30 años, reportaron el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica que persiste por horas e incluso días, el cual es provocado por la actividad neuronal (Dudai, 2002). Es inducido por la aplicación de un tren corto de estímulos de alta frecuencia (tetanización), su medición se realiza a través del cambio en los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS), *ver figura 1*. Éste fenómeno sináptico se ha observado en la medula espinal, la corteza cerebral, en la amígdala cerebral, en el estriado y en diferentes vías del hipocampo (Tsien, 2006).

La LTP en el área CA1 del hipocampo se divide en dos fases: 1) La fase temprana, que necesita de un tren corto de estímulos de alta frecuencia para generarla, y no requiere de la síntesis de nuevas proteínas, pero participa en la modificación de proteínas existentes. 2) La fase tardía, la cual necesita de los procesos de transcripción<sup>3</sup> y

---

<sup>3</sup> Transcripción. Proceso enzimático, a través del cual, la información contenida en una cadena de DNA es utilizada para sintetizar RNAm.

traducción<sup>4</sup> (Kandel, 2007). La inducción de la LTP depende de la activación de receptores NMDA<sup>5</sup>. El receptor NMDA está bloqueado por un ion de magnesio ( $Mg^{2+}$ ), el cual impide que los iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) penetren en la célula, incluso cuando el receptor es estimulado por el glutamato. Si la membrana postsináptica es despolarizada, el  $Mg^{2+}$  es expulsado del canal iónico, lo que permite el paso a los iones de  $Ca^{2+}$  (Carlson, 2006), al interior de la célula. Posteriormente, el influjo de  $Ca^{2+}$  activa dos proteínas cinasas: la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) y la cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CAMKII, por sus siglas en inglés). A través de su actividad catalítica, la fosforilación, facilita un incremento de la densidad de receptores AMPA en la membrana postsináptica (Bear et al., 2007), lo cual genera una transmisión sináptica más fuerte.

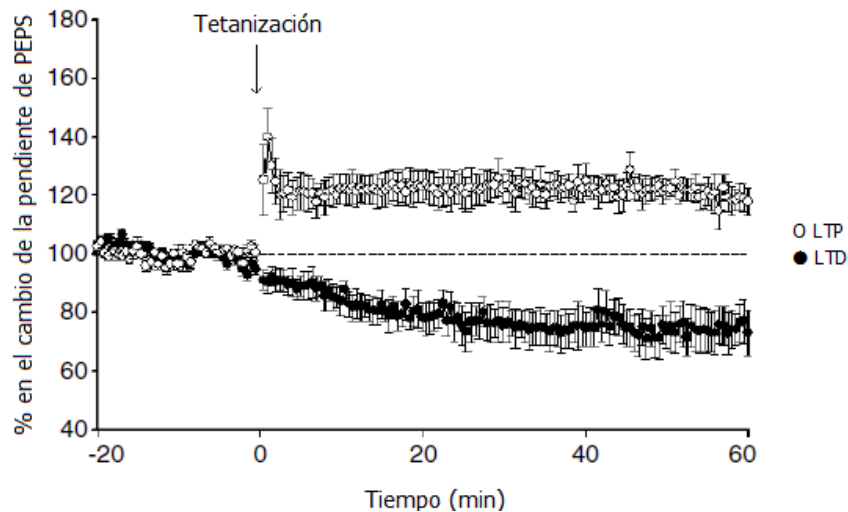
Si la potenciación de las sinapsis siguiera en aumento como resultado de la LTP, éstas alcanzarían un nivel de eficiencia máxima, generando una dificultad para codificar información nueva. Por esta razón, existen procesos que debilitan de manera selectiva conjuntos específicos de sinapsis. La depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés) es uno de estos procesos (Purves et al., 2008) y al mismo tiempo un mecanismo de aprendizaje. La LTD también es dependiente de receptores NMDA y de canales de calcio dependiente de voltaje (VGCC, por sus siglas en inglés), ambos receptores permiten el influjo de  $Ca^{2+}$  en la membrana postsináptica pero en menor concentración en comparación a la LTP. La LTD generalmente es inducida por una estimulación de baja frecuencia, 0.5 a 5 Hz, *ver figura 1* (Escobar y Derrick, 2007).

---

<sup>4</sup> Traducción. Proceso en el cual, la información genética presentada en una molécula de RNAm específica la secuencia de aminoácidos durante la síntesis de proteínas

<sup>5</sup> NMDA. Receptor ionotrópico para glutamato. El acrónimo NMDA procede de *N-metil D-aspartato*.





**Figura 1. Esquema de la LTP (o) y la LTD (●) en el giro dentado. Modificado de Escobar y Derrick, 2007.**

Los mecanismos clásicos de plasticidad sináptica previamente descritos coexisten con otras modificaciones sinápticas, como la metaplasticidad y el escalamiento sináptico. Ambos mecanismos participan en la homeostasis sináptica para estabilizar la actividad neuronal (Escobar y Derrick, 2007), mediante la modificación de umbrales ante los subsecuentes cambios de la eficiencia sináptica. La metaplasticidad comúnmente es referida como la modulación de la plasticidad por la actividad o inactividad sináptica previa (Abraham y Bear, 1996), es decir, no necesariamente se expresa como un cambio en la eficacia de la transmisión sináptica, sino como un fenómeno sináptico capaz de inducir modificaciones sinápticas subsecuentes, como la LTP y la LTD (*figura 2A*). Por otro lado, el escalamiento sináptico (*figura 2B*) se logra a través de la inserción y remoción de receptores en la membrana postsináptica para compensar periodos de fuerte actividad o largos periodos de inactividad. El escalamiento sináptico es altamente

regulado, tanto la LTP y la LTD pueden ser inducidas a través de este mecanismo (Turrigiano, 2008).

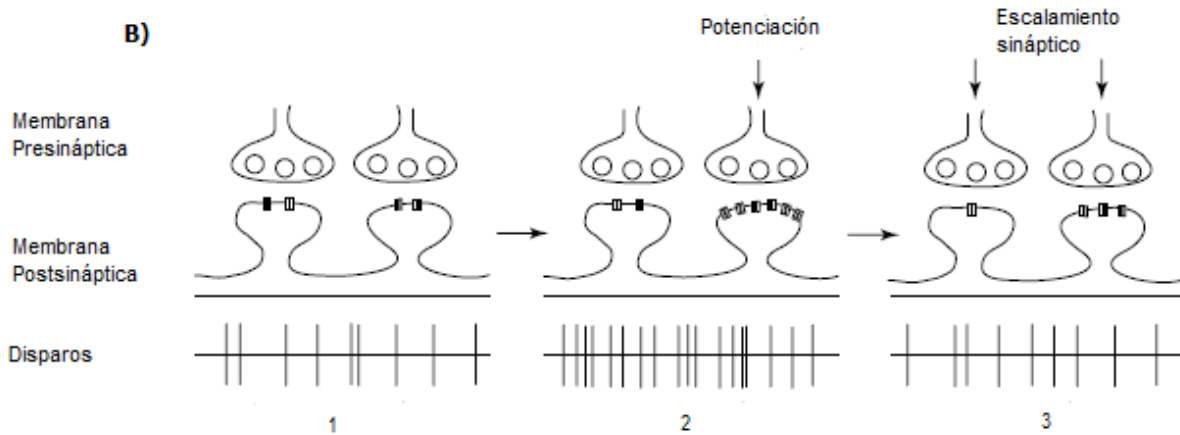
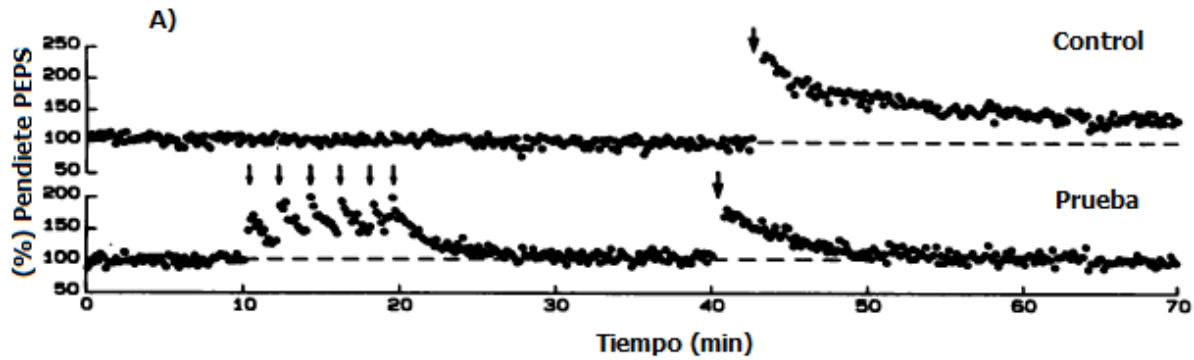


Figura 2. Esquema de plasticidad homeostática. A) Esquema de la metaplasticidad, se observa la inhibición de la LTP en el grupo de prueba en comparación al grupo control. Tetanización débil continua (↓↓↓↓↓); (30 Hz, 0.15 seg), seguida de una tetanización fuerte (↓) a los 40 minutos (100 Hz, 0.5 seg). Modificado de Huang et al., 1992. B) Esquema del escalamiento sináptico. 1) Niveles basales, las dos membranas postsinápticas poseen el mismo número de receptores. 2) Una de la sinapsis es potenciada con bicuculina (↓), un antagonista de los receptores GABA-A, y como consecuencia aumenta su número de receptores, así como la frecuencia de disparos. 3) Decremento en la densidad de receptores de ambas sinapsis, de tal forma, que la sinapsis que fue potenciada posee más receptores en comparación a la otra, a pesar de que la frecuencia de disparo regrese a nivel basal. Modificado de Turrigiano, 1999, en Mendoza-Viveros, 2009.

## 2.2 ¿Qué es la memoria?

Adquirimos nuevos conocimientos a partir de las experiencias vividas en nuestro entorno. Este aprendizaje puede almacenarse en nuestra memoria por mucho tiempo y ser evocado cuando sea necesario. Por definición, el aprendizaje es el proceso por el cual nueva información es adquirida por el sistema nervioso, y la memoria, se refiere al proceso por el cual la información previamente adquirida es almacenada y evocada (Purves et al. 2008).

Para facilitar el estudio de la memoria se ha dividido en dos tipos: 1) Memoria declarativa, y 2) memoria no declarativa, también conocidas como explícita o implícita, respectivamente (Sweatt, 2010). La memoria declarativa depende del lóbulo temporal, y es capaz de recolectar datos de forma consciente sobre eventos y hechos. Por otro lado la memoria no declarativa, se encarga de almacenar las habilidades motoras y ejecutivas necesarias para realizar una tarea, para así, responder de forma apropiada a un estímulo a través de la práctica, ejemplos de ella son la memoria procedimental, el condicionamiento clásico, el primear y el aprendizaje no asociativo. Algunas de las estructuras involucradas en este tipo de memoria son la neocorteza, la amígdala cerebral, el cerebelo y el cuerpo estriado (Milner et al., 1998), *ver figura 3*.

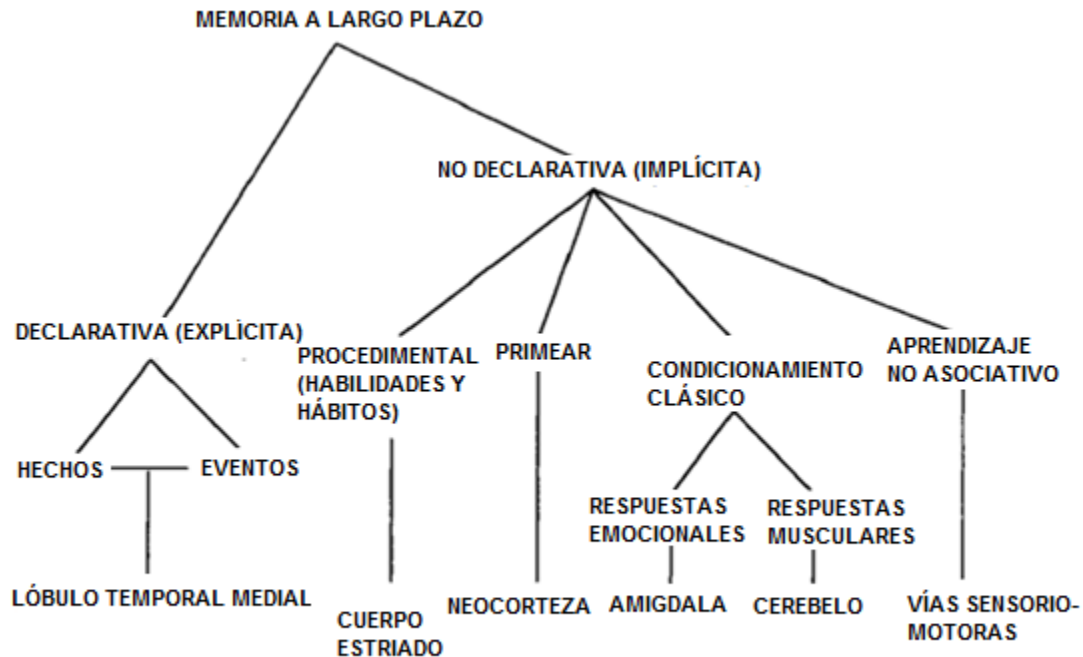


Figura 3. Esquema de la clasificación de la memoria. Diferentes estructuras del sistema nervioso están asociadas a una forma de aprendizaje y a su vez dependientes de un tipo de memoria. Modificado de Milner et al. 1998.

En 1957, Brenda Milner describió el caso del paciente H.M., quién padeció de una epilepsia severa debido a un traumatismo craneoencefálico provocado por un accidente en su infancia. Fue sometido a una escisión bilateral del lóbulo temporal medial, que incluyó la neocorteza temporal anterior, la amígdala cerebral, el giro parahipocampal anterior y el hipocampo. La operación desapareció los síntomas epilépticos pero le provocó un grave deterioro en la memoria declarativa, perdió habilidad para almacenar nuevas memorias (Milner et al., 1998), lo cual se conoce, como amnesia anterógrada. Sin embargo, no se deterioró su memoria no declarativa, era capaz de aprender tareas motoras. Con las aportaciones de Brenda Milner, se concluyeron 3 puntos importantes para las futuras investigaciones sobre memoria: 1) Las estructuras del lóbulo temporal,

no se encargan de procesar la memoria a corto plazo, 2) existe más de un tipo de memoria (Squire y Kandel, 2000), 3) el hipocampo interviene en la formación de la memoria a largo plazo (Carlson, 2006).

### **2.3 Consolidación de la memoria**

En los años 80's la investigación en neurociencias mostró mayor interés en resolver incógnitas sobre cómo trabaja la memoria a corto plazo y cómo ésta se convierte a largo plazo (Kandel, 2009; Agranoff et al., 1966; Flexner et al., 1963).

La memoria a corto plazo, es una memoria inmediata (Carlson, 2004) y almacena información en un período muy corto –de segundos a minutos- (Purves et al., 2008) y se cree que depende de modificaciones post-traduccionales (Dash et al., 2007). Mientras que la memoria a largo plazo requiere de síntesis proteica y es aquella que dura más de 24 horas, bajo el contexto de la consolidación sináptica (Dudai, 2004).

Müller y Pilzecker postularon hace más de 100 años la hipótesis de la consolidación de la memoria (McGaugh, 2000), la cual sugiere que la formación de la memoria ocurre progresivamente, es decir, una nueva memoria se estabiliza y fortalece a través del tiempo siendo cada vez menos lábil. El término ha sido adoptado para describir el proceso de estabilización de la memoria posterior al aprendizaje (Miyashita et al., 2008). Se han propuesto dos teorías que transcurren de forma paralela, que abordan la consolidación de la memoria: la consolidación sináptica, que se observa a nivel celular y ocurre dentro de los primeros minutos a horas posterior al término del aprendizaje

(Dudai, 2004); y por otro lado, la consolidación de sistemas, que se refiere a la reorganización del trazo de memoria dentro de circuitos cerebrales corticales (Frankland y Bontempi, 2005), este proceso transcurre en un tiempo de semanas, meses o incluso años para ser realizado, *ver figura 4*. (Dudai, 2004).

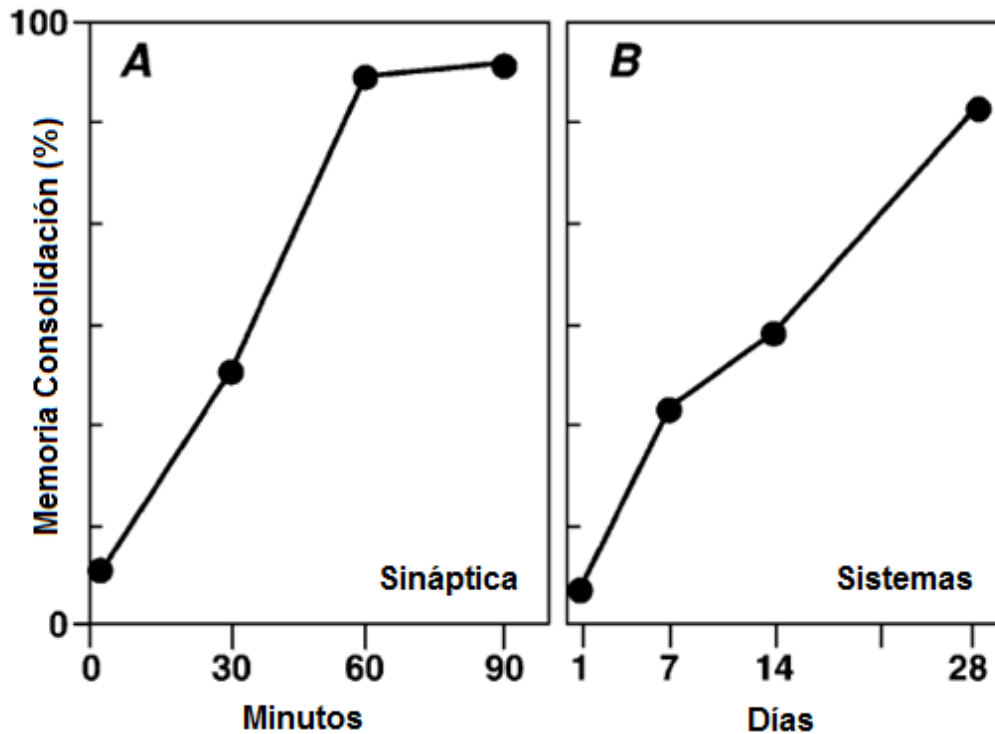
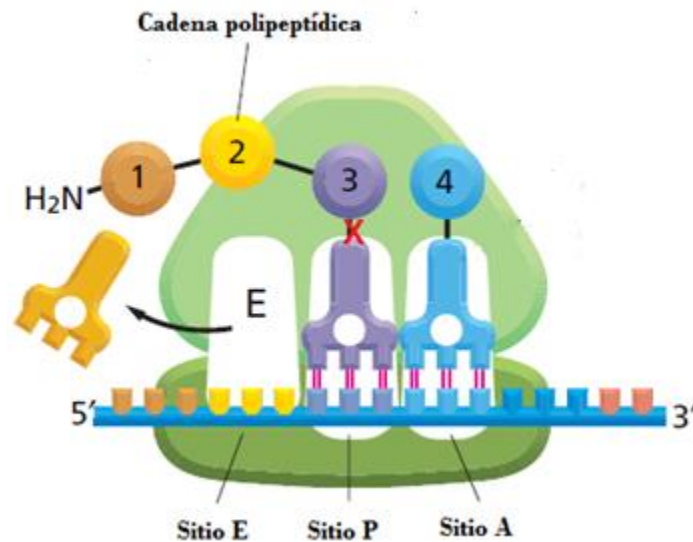


Figura 4. Tipos de consolidación de la memoria. A) El proceso de consolidación sináptica depende de la síntesis de proteínas de *ново*, durante e inmediatamente después del entrenamiento de una tarea, es una propiedad universal del sistema nervioso. B) La consolidación de sistemas, perdura por semanas, a lo largo de este periodo, la memoria declarativa ya es independiente del hipocampo y es almacenada en redes neuronales de la corteza. Modificado de Dudai, 2004.

Diversas investigaciones se han enfocado en identificar los eventos y las interacciones moleculares, celulares y sistémicas que dirigen el mecanismo de la consolidación en la memoria (McGaugh, 2000). Agranoff y col. (1966), administraron puromicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, a un pez dorado y demostraron una alteración en la formación de la memoria a largo plazo, lo cual sugiere que la formación del trazo en

la memoria a largo plazo es dependiente de la síntesis de proteínas de *novo* (Davis y Squire, 1984). Utilizando anisomicina, otro inhibidor de la síntesis de proteínas, se ha observado que afecta la consolidación de la memoria en tareas dependientes del lóbulo temporal, esto lo hace a través del bloqueo de la enzima peptidil transferasa que es contenida en los ribosomas, lugar donde se lleva a cabo la traducción, lo que inhibe la síntesis proteica (Alberts et al., 2008), *ver figura 5*. Balderas y col. (2008) administraron anisomicina en la corteza perirrinal y en la corteza insular inmediatamente después de la adquisición de una tarea de reconocimiento de objetos<sup>6</sup>, los resultados mostraron que es necesaria la síntesis de proteínas de novo para la consolidación de la memoria de reconocimiento.



**Figura 5. Mecanismo molecular de la anisomicina.** Un enlace peptídico es formado entre la cadena polipeptídica en el sitio P y el aminoácido del sitio A. El tRNA de P es liberado y la cadena ahora en sitio A se mueve en dirección 3'-5' para continuar el proceso. La reacción es catalizada por la enzima peptidil transferasa. La anisomicina, es un antibiótico que bloquea la reacción de la peptidil transferasa en el ribosoma. Modificado de Alberts et al., 2008.

<sup>6</sup> Tarea de reconocimiento de objetos. Normalmente, en esta tarea se presentan dos objetos novedosos idénticos para que la rata se familiarice con ellos, después de un intervalo de tiempo, en una segunda fase se presenta un objeto familiar (presentado en la primera fase) y un objeto novedoso. La rata debe discriminar el objeto novedoso ante el familiar, (Balderas et al., 2008).

En la consolidación sináptica, participan la activación de segundos mensajeros, la transcripción de RNA y la síntesis de proteínas. De manera general, esto sucede a través de la estimulación de receptores NMDA como resultado de la despolarización de una neurona postsináptica, lo cual permite el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona y desencadenar la activación de CAMKII. El  $\text{Ca}^{2+}$  también puede activar la cascada de señalización celular de las proteínas cinasas asociadas a mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) y regular genes de expresión temprana (Ramírez-Amaya, 2007). También puede suscitarse por la activación de receptores metabotrópicos que induce la activación del segundo mensajero adenosin monosfosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés), a través de enzima adenilato ciclasa, el cAMP se une a la región reguladora de la proteína PKA (proteína cinasa dependiente de cAMP) provocando la activación de su región catalítica, posteriormente puede fosforilar isoformas de CREB, que es un factor de transcripción que participa en la formación de la memoria a largo plazo, el cual modula la expresión de genes regulados por CRE, incluyendo genes de expresión temprana (Dudai, 2004).

## **2.4 Genes de expresión temprana**

Los genes de expresión temprana (IEG's, por sus siglas en inglés), son definidos como aquellos genes en los cuales la transcripción puede ser inducida en presencia de un inhibidor de síntesis de proteínas, por lo tanto no requieren de síntesis de *ново* o de la activación previa de otro gen. Los IEG's pueden ser factores de transcripción, es decir, se encargan de la transcripción de otros genes, ejemplos de ellos son: *c-fos*, *c-jun* y *zif* 268. Otro tipo de genes de expresión temprana son aquellos que regulan funciones



celulares como el crecimiento celular (*BDNF*, *Narp*), metabolismo (*BDNF*), comunicación intracelular (*Homer 1α*), cambios estructurales y modificaciones sinápticas (*Narp*, *BDNF*, *Homer 1α* y *Arc*), los cuales son llamados efectores (Miyashita et al., 2008).

## 2.5 *Arc*, un gen de expresión temprana

El gen de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad (*Arc*, por sus siglas en inglés) también conocido como *Arg 3.1.*, fue reportado en los laboratorios de Dietman Kuhl y Paul Worley en 1995 (Brahmam et al., 2010), por la técnica de *estimulación eléctrica convulsiva* (MECS<sup>7</sup>, por sus siglas en inglés), ellos encontraron que el transcrito de *Arc* es inducido por la actividad sináptica y transportado rápidamente hacia las dendritas, en donde sucede su traducción (Link et al. 1995; Lyford et al., 1995). El incremento de su expresión puede ser inducida en presencia de un factor de crecimiento, como el BDNF (Ying et al., 2002), por la inducción de LTP (Rodríguez et al., 2005) o LTD (Waung et al., 2008) y en respuesta del aprendizaje (Ramírez-Amaya et al, 2005; Plath et al., 2006). La activación de receptores NMDA y la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), que pertenece a la cascada de señalización celular de las MAPK, es necesaria para su transcripción (Steward et al., 1998). El curso temporal de *Arc* se ha analizado a través de las técnicas de MECS y de la técnica de *fluorescencia mediante hibridación in situ* (FISH<sup>8</sup>, por sus siglas en inglés). El grupo de Guzowsky y col. (1999), utilizó ambas técnicas para observar el curso

---

<sup>7</sup> MECS. Es una técnica que simula la propagación a una crisis epiléptica de tipo grandmal. Se aplica una breve descarga sobre la cabeza del animal a través de electrodos.

<sup>8</sup> FISH. Es una técnica utilizada para detectar y localizar secuencias específicas del RNA, lo cual facilita el estudio de patrones espacio-temporales de la expresión de genes dentro de la célula.

temporal del transcrito de *Arc*, encontrando un decremento en la densidad del transcrito de *Arc* en el núcleo de la neurona 15 minutos después de la presentación del estímulo en comparación al grupo caja (el cual no recibió ninguna estimulación), 30 minutos después de ser estimulado, el transcrito de *Arc* se trasladó del núcleo al citoplasma, y una hora más tarde se observó en la región más distal de las dendritas.

De la misma forma, la traducción de *Arc* está controlada por la actividad de receptores NMDA y receptores acoplados a proteínas G que desencadenan cascadas de señalización (Korb et al., 2011). La inducción de LTP desencadena la traducción de *Arc*, la cual requiere de la señalización de ERK a través de la vía de las MAPK (Panja et al., 2009). La traducción de *Arc* también es facilitada a través de un protocolo conductual, en un estudio realizado por Ramírez-Amaya y col. (2005) utilizaron la técnica de *análisis por compartimentos celulares de la actividad temporal a través de hibridación in situ* (catFISH<sup>9</sup>, por sus siglas en inglés), para observar el curso temporal del transcrito de *Arc* y la expresión de la proteína en diferentes poblaciones neuronales del sistema nervioso (las regiones hipocámpales CA1, CA3, giro dentado y la corteza parietal). Diseñaron un experimento, donde los animales tenían que explorar un ambiente (una caja dividida en nueve cuadros) por cinco minutos, después se regresaban a su caja por un intervalo de tiempo (de 30 minutos – 24 horas), y al finalizar la demora se presentaban por segunda vez el mismo ambiente por cinco minutos, los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la segunda exposición del ambiente.

---

<sup>9</sup> catFISH. Es un método que utiliza la técnica de FISH y el uso del microscopio confocal, para detectar el transcrito de genes de expresión temprana e identificar poblaciones neuronales activadas en dos tiempos distintos, respectivamente. La combinación celular y temporal hace de esta técnica una invaluable herramienta para estudiar la interacción dinámica de las poblaciones neuronales asociadas con diferentes paradigmas conductuales (Guzowsky y Worley, 2001).

Los resultados mostraron que el curso temporal de la proteína en el citoplasma fue similar en CA1, CA3 y la corteza parietal, se encontró un incremento en la expresión de la proteína, entre los 30 minutos a 120 minutos posteriores al evento conductual en comparación al grupo caja (el cual no exploró ningún ambiente). Además encontraron que la proporción de neuronas que expresaban el transcrito de *Arc* posterior a la exploración conductual, correlaciona con la misma proporción de neuronas que expresan la proteína, lo cual sugiere que la traducción se lleva en el citoplasma; para dichos resultados, observaron un incremento en el porcentaje del transcrito de *Arc*, en un grupo que fue sacrificado 5 minutos después de la segunda exposición al ambiente, mientras que los grupos que fueron sacrificados de 30-120 minutos posterior al evento conductual, se observó una superposición en la expresión de la proteína y el transcrito de *Arc*. También se encontró una segunda expresión de la proteína a las 8 horas posteriores del evento conductual, en las mismas poblaciones neuronales, este resultado sugiere, que la estabilización de circuitos neuronales seguida de un evento conductual sucede en fases discretas, al mismo tiempo que el trazo mnémico es consolidado. A través de este método es posible distinguir entre un grupo de células que han sido activadas por la adquisición de un aprendizaje reciente (el transcrito de *Arc* se encuentra en el núcleo), y un grupo de células que son activadas por la presentación de un evento que ocurrió 30 minutos antes, el transcrito de *Arc* es detectado en el citoplasma, *ver figura 6* (Ramírez-Amaya, 2007).

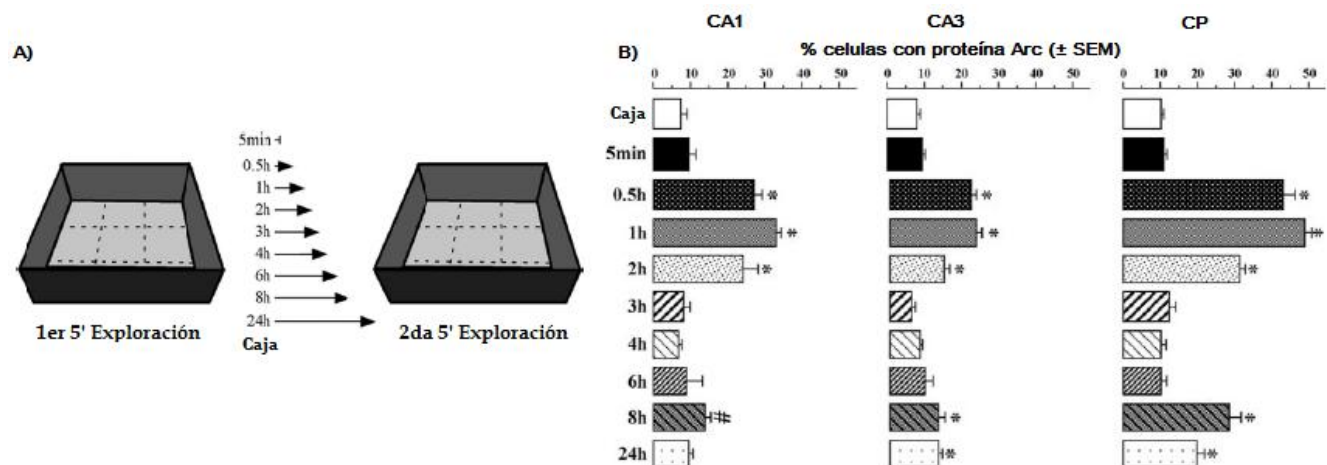


Figura 6. Curso temporal de la expresión de la proteína Arc en las regiones hipocámpales CA1, CA3, y la corteza parietal (CP). A) Diseño conductual utilizado para la realización del experimento. La demora entre cada exposición del ambiente fue entre 30 minutos a 1440 minutos. El grupo caja no fue colocado dentro del diseño conductual y fue sacrificado. B) Se observa el porcentaje total de células que muestran la proteína Arc (inducido por la primera exploración). Todos los grupos fueron colocados dos veces en el mismo ambiente, excepto el grupo caja y el grupo control de 5 minutos (Modificado de Ramírez-Amaya et al., 2005).

## 2.6 Arc, en la plasticidad sináptica

La función del gen de expresión temprana *Arc* en la eficiencia sináptica ha sido examinada a través de la inhibición de la expresión de la proteína mediante la infusión intrahipocámpal de un antisentido<sup>10</sup>, la expresión de *Arc* se vio reducida hasta un 60% y el mantenimiento de la LTP decayó en comparación al grupo control (Guzowsky et al., 2000). Mesaoudi y col. (2007), encontraron que la síntesis de *Arc* en la región hipocámpal CA1 es necesaria para la inducción de LTP *in vivo* y para el mantenimiento de la misma. Ellos administraron un antisentido 15 minutos después de la aplicación del tren de alta frecuencia, lo cual provocó la inhibición de la LTP en comparación al grupo vehículo; sin embargo, la administración del mismo antisentido dos horas después de la

<sup>10</sup> Antisentido. Es una hebra de RNA que es complementaria de un RNA mensajero transcrito dentro de una célula. Puede ser introducido a una célula para inhibir la traducción de un gen.

aplicación de la tetanización no tuvo efecto en la presentación de LTP, tampoco en la inhibición del transcrito en dendritas, ni en la expresión de la proteína.

Las vías canónicas de la expresión de la LTD y LTP son caracterizadas por la modulación de la endocitosis y la exocitosis de receptores AMPA, respectivamente. Se ha observado que Arc interactúa con dos proteínas, la dinamina y la endofilina, las cuales son esenciales para regular la endocitosis de estos receptores. El incremento de la expresión de Arc en cultivos de células y rebanadas del hipocampo provoca una disminución de receptores AMPA a través de la endocitosis de los mismos. Lo cual sugiere que Arc participa en la plasticidad homeostática. De acuerdo a esta idea, el incremento en la actividad sináptica es compensado por el escalamiento sináptico, es decir, un incremento en la expresión de la proteína reflejará una disminución de receptores AMPA en la membrana postsináptica, y por el contrario, la disminución de la expresión de Arc generará la inserción de receptores AMPA sobre la membrana postsináptica (*figura 7*). Este proceso normaliza la distribución de receptores en la membrana sin alterar la eficiencia sináptica (Turrigiano, 2008).

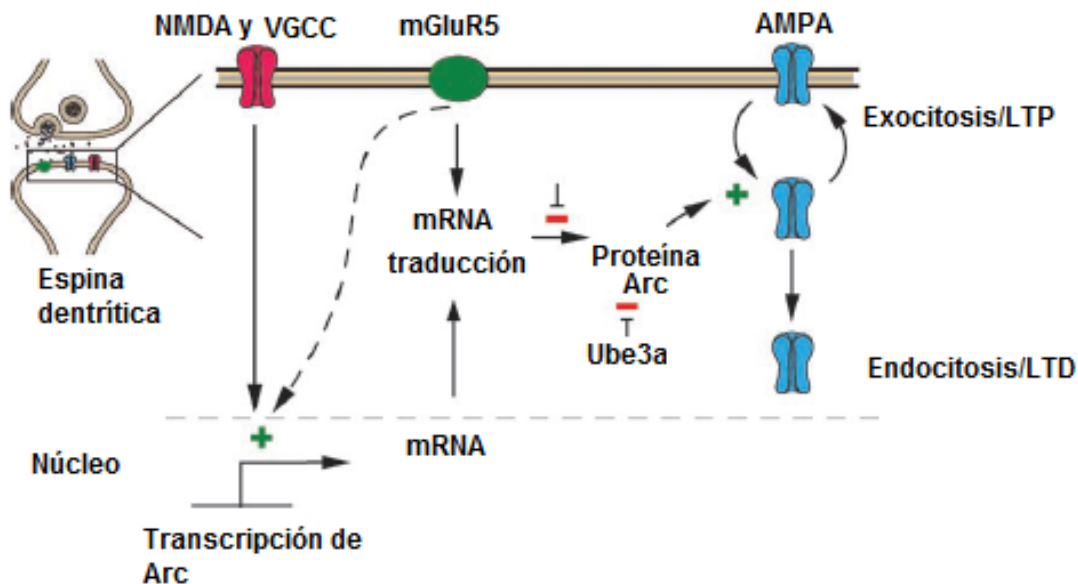


Figura 7. La expresión de Arc, modula la inserción/deserción de receptores AMPA. Los receptores NMDA y VGCC inducen la transcripción de Arc en el núcleo. La activación del receptor mGluR5 propicia la traducción del transcrito. La traducción del transcrito de Arc en dendritas es inhibida por FMRP (proteína del síndrome X frágil, FMRP) y la proteína Arc es rápidamente degradada a través de Ube3a (ligasa de ubiquitinación E3A) por ubiquitinación. El incremento de la proteína provoca la endocitosis de los receptores AMPA, lo cual permite la expresión de LTD. Mientras que el decremento de la proteína genera la exocitosis de receptores AMPA, permitiendo la expresión de LTP. Modificado de Shepherd y Bear, 2011.

## 2.7 Arc en la consolidación de la memoria

Arc no sólo es un excelente candidato para la plasticidad sináptica, también participa en la formación de la memoria a largo plazo (Miyashita et al. 2008). Plath y col. (2006), diseñaron un ratón knockout<sup>11</sup> con una deficiencia congénita de Arc, el ratón mostró afectaciones en la formación de la memoria a largo plazo en distintas tareas conductuales: el laberinto acuático de Morris<sup>12</sup>, condicionamiento al miedo<sup>13</sup>,

<sup>11</sup> Ratón knockout. Es un ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados.

<sup>12</sup> Laberinto acuático de Morris. Es una tarea que evalúa memoria espacial. El laberinto consiste en una piscina circular, en donde está oculta una pequeña plataforma. La tarea requiere que el roedor encuentre la plataforma basándose sólo en claves visuales localizadas fuera del instrumento experimental.

condicionamiento aversivo al sabor<sup>14</sup> y memoria de reconocimiento de objetos (*figura 8*).

En otro experimento se infundió un antisentido en el hipocampo y se realizó la tarea de laberinto acuático de Morris, al realizar la prueba, se observó afectada la memoria a largo plazo, dado que la latencia del grupo infundido con el antisentido fue mayor al grupo vehículo (Guzowsky et al., 2010).

---

<sup>13</sup> Condicionamiento al miedo. Es un paradigma conductual, en donde los animales aprenden a predecir eventos aversivos. Ocurre cuando el sujeto asocia la presentación de un contexto (EC), o un tono (EC) con un choque eléctrico (EI). La presencia de solo el EC, provocará la respuesta de congelamiento, es decir, el animal permanece inmóvil. El congelamiento es una conducta adaptativa que presentan los animales ante la presencia de un depredador para evitar ser atacados.

<sup>14</sup> Condicionamiento aversivo al sabor. Es un ejemplo de condicionamiento clásico. Ocurre cuando el sujeto asocia un sabor (EC) con un malestar gástrico, en consecuencia, el sujeto se rehúsa a consumirlo en futuros encuentros.

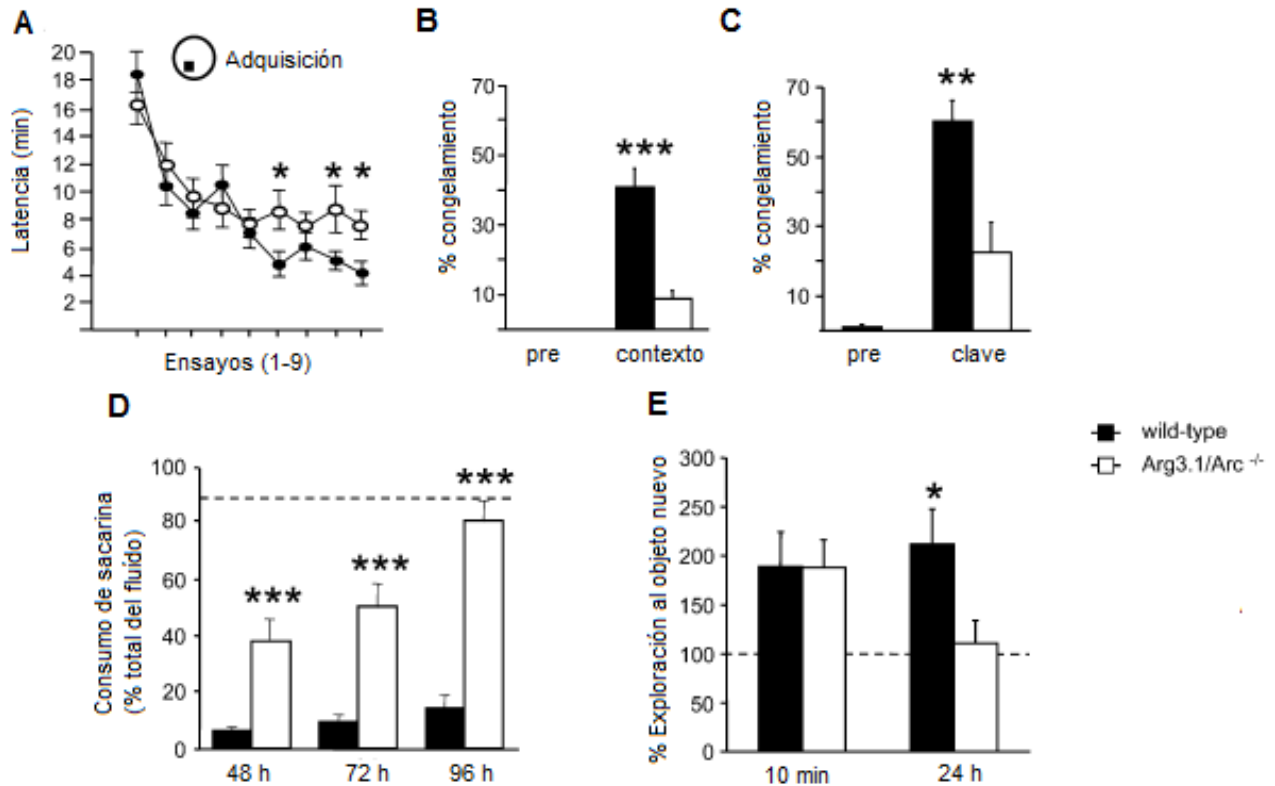


Figura 8. Ejemplos de la afectación en la consolidación de la memoria en diferentes tareas conductuales con un ratón knockout (*Arg 3.1/Arc<sup>-/-</sup>*) para *Arc*. A) Laberinto de Morris. Se observa la latencia de llegada a la plataforma durante la adquisición de la tarea y el aprendizaje reverso. El ratón *Arg 3.1/Arc<sup>-/-</sup>* mostró una mayor latencia en los últimos ensayos de la adquisición de la tarea. B) Condicionamiento aversivo al miedo. Se observó una reducción en el congelamiento del ratón *Arg 3.1/Arc<sup>-/-</sup>*, cuando se presentó ante el EC (contexto) 24 horas después del entrenamiento de la tarea en comparación al grupo vehiculo. C) Reducción en el congelamiento del ratón *Arg 3.1/Arc<sup>-/-</sup>* durante la presentación del EC (tono) en comparación al ratón wild type. D) Condicionamiento aversivo al sabor (CAS). Después de adquisición del CAS, el consumo del ratón *Arg 3.1/Arc<sup>-/-</sup>* continuó en aumento en comparación al ratón wild type. E). Reconocimiento de objetos. Porcentaje de exploración del objeto nuevo en comparación al familiar (línea punteada). Todos los ratones mostraron el mismo tiempo de exploración en el objeto nuevo cuando la prueba se realizó 10 minutos después del entrenamiento (memoria a corto plazo). Sin embargo, 24 horas después, sólo los ratones wild type mostraron preferencia por el objeto novedoso. Modificado de Plath et al. 2006



## **2.8 Memoria de reconocimiento al sabor**

Una de las características que han desarrollado los animales a través de la evolución es la memoria de reconocimiento al sabor, es decir, la habilidad de reconocer sabores nocivos o seguros encontrados en su ambiente. Diversas investigaciones afirman que la corteza insular participa en la memoria de reconocimiento al sabor (Bermúdez et al., 2005). Las neuronas de la corteza insular responden a las cinco modalidades del sabor: Salado, amargo, amargo, dulce y umami (Accolla et al., 2007).

La codificación de la memoria de reconocimiento al sabor inicia con la transducción química de un nuevo sabor en la cavidad oral. La percepción del sabor comienza 200 ms después de la presentación del sabor. Posteriormente la información viaja por los pares craneales facial (VII), glossofaríngeo (IX), nervio vago (X) hasta la región rostral del núcleo del tracto solitario. Las fibras de este núcleo se proyectan al núcleo posterior parabraquial, el cual, tiene proyecciones con el hipotálamo lateral, la estra terminal, la amígdala central y la amígdala basolateral. Otras proyecciones del núcleo posterior parabraquial viajan al núcleo del tálamo ventral postero-medial. Esta información se proyecta en la corteza insular, que está localizada a lo largo del surco rinal y es rostral a la corteza perirrinal (Bermúdez et al., 2004).

De acuerdo a las subdivisiones citoarquitectónicas de la corteza insular en rata, descritas por Cechetto y Saper (1987), ésta se divide en tres regiones: región agranular, región granular y región disgranular. Se ha observado que las neuronas gustativas de la corteza disgranular tienen una mayor activación en presencia de un sabor (Yamamoto

et al, 1989). Por ejemplo, a través de un mapeo de actividad neuronal en donde se estudió la actividad de Arc utilizando sacarosa, un estímulo gustativo dulce, se encontró una mayor expresión del transcrito de Arc en la región disgranular de la corteza insular (Sadoris, 2009).

## 2.9 Atenuación a la neofobia

Cuando un animal degusta un sabor por primera vez, el consumo de éste es menor, mostrando una conducta neofóbica, la cual se genera por el miedo al degustar un sabor no conocido. Sin embargo, si el sabor no provoca ninguna consecuencia negativa, es decir, que se asocie con estímulo nocivo que genere un malestar gástrico (como el cloruro de litio), el consumo incrementará en encuentros posteriores, a esto se le conoce como atenuación de la neofobia (AN), ver figura 9.

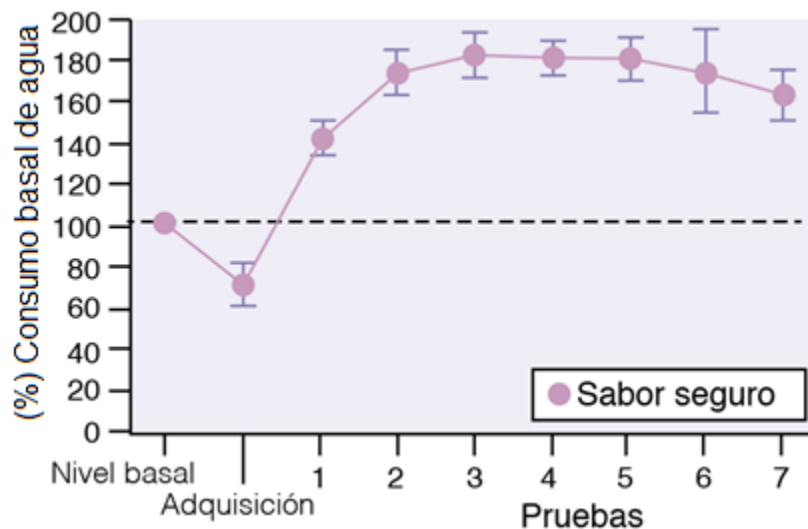


Figura 9. Atenuación a la neofobia. Curva de atenuación a la neofobia expresando el consumo de sacarina como el porcentaje del nivel basal de agua durante la adquisición y las presentaciones subsecuentes de sacarina al 0.25%. Se observa el decremento del consumo (neofobia) durante la primera presentación del estímulo, posteriormente, se muestra un incremento en el consumo superior a la línea basal. Modificado de Bermúdez, 2004.

Accolla y col. (2007), realizaron un experimento de preferencia al sabor en ratas, en donde cuantificaron la tasa de lengüeteos a través de un dispensador automático que liberaba durante 500 ms los sabores de sacarosa al 500 mM y quinina (un estímulo gustativo amargo) al 20 mM. Al analizar la tasa de lengüeteos de los sabores contra la línea basal (tasa de lengüeteos ante la liberación de agua durante 1 seg) encontraron un incremento ante la liberación de sacarosa y un decremento ante la liberación de quinina, con este resultado conductual ellos sugirieron, que la sacarosa es percibida como un estímulo gustativo hedónico, mientras que la quinina es detectada como un estímulo gustativo aversivo (*ver figura 10A, 10B*). De acuerdo a la preferencia de la ingesta de un sabor, puede ser clasificado como nuevo, familiar-aversivo (menos preferido) y familiar-seguro (más preferido). Un sabor considerado como nuevo, sólo en la primera presentación, después de ésta, es reconocido como familiar-aversivo, o familiar-seguro (Bermúdez, 2004). Morin (2011a) encontró que durante la AN cuando se utiliza sacarina como estímulo gustativo, pasa de neofóbico a familiar y apetitivo, es decir, su ingesta aumenta por encima del consumo basal de los animales. Sin embargo, cuando se presenta un estímulo gustativo amargo, como la quinina, el consumo es inferior a la línea basal a pesar de que éste sea familiar (Morin, 2011a; Accolla et al., 2007), *ver figura 10C*.

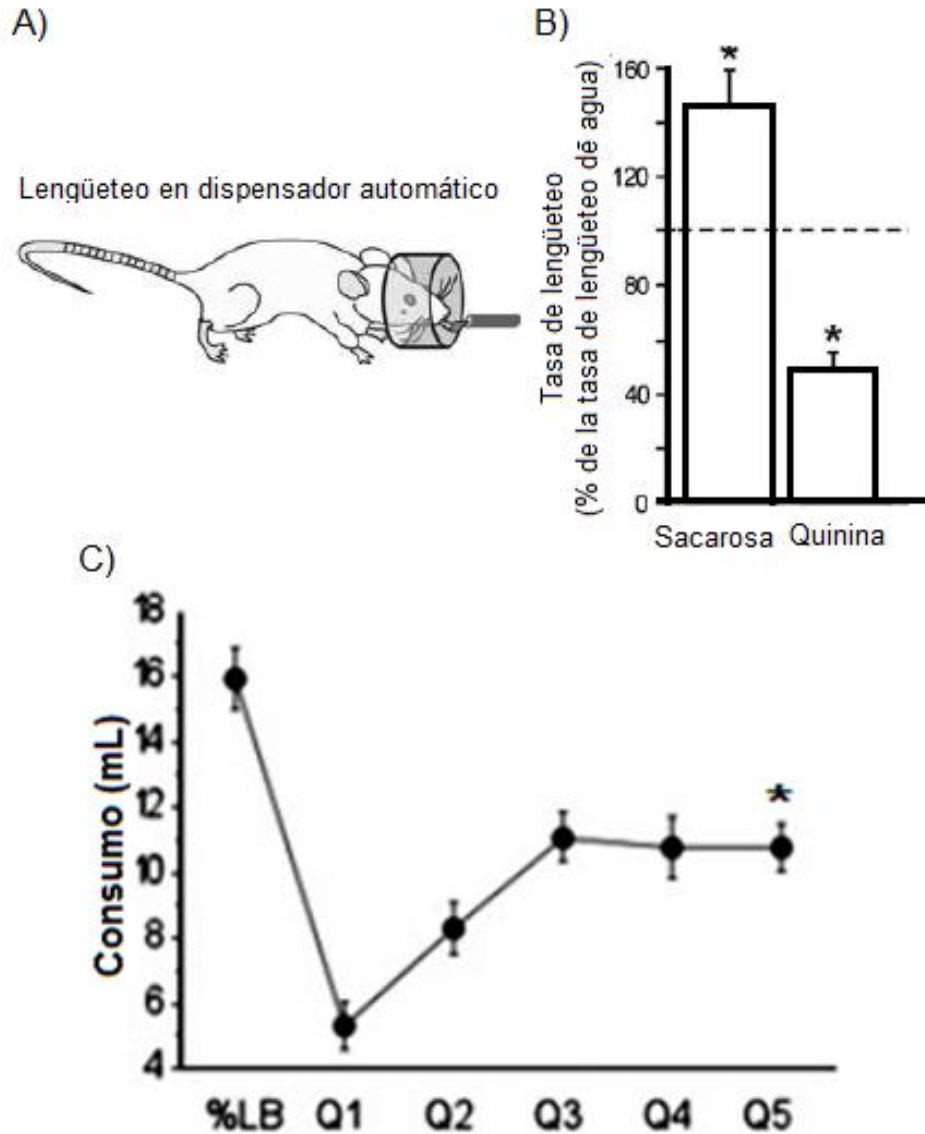


Figura 10. Quinina como un estímulo gustativo aversivo. A) Protocolo conductual. La rata emite lengüeteos en el dispensador automático. B) El histograma muestra el porcentaje de lengüeteo ante la presencia de cada sabor. El resultado es la razón entre el estímulo gustativo y el agua. Se observa un decremento inferior a la tasa de lengüeteo basal cuando se presenta quinina, (\*:  $p < 0.005$ ). Modificado de Accolla et al. 2007. C) Atenuación a la neofobia con una solución de quinina al 0.005% (0.15 mM). La gráfica muestra el promedio en mL del volumen consumido. LB: línea base; Q1 -5: quinina, primer día, segundo día, etc.; el consumo es inferior significativamente a la línea base, \*:  $p < 0.001$ ,  $n=14$ . Las barras representan el error estándar. Modificado de Morin, 2011a.

Rodríguez-Ortiz y col. (2005), observaron un deterioro en la formación del trazo de memoria al realizar la tarea de AN, en donde presentaron sacarina novedosa al 0.3%, al termino del consumo, administraron anisomicina bilateral en la corteza insular, los

animales presentaron neofobia el día posterior a la inyección, es decir, se presentó un retraso en la formación del trazo de memoria (*figura 11A*). Morin y col. (2011b), administraron anisomicina bilateral en el hipocampo dorsal (HD), debido a que ésta estructura participa en la consolidación de la tarea de AN y la familiarización de los estímulos (Gutiérrez et al., 2004; de la Cruz et al., 2008). Al infundir la anisomicina en el HD inmediatamente después de la presentación de un sabor novedoso, durante la segunda exposición del estímulo gustativo observaron un decremento en la expresión de la proteína Arc en la corteza insular, en comparación al grupo vehículo que recibió una microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, por su siglas en inglés); el registro de la expresión de Arc fue realizado mediante la técnica de inmunoblot (*figura 11B*). Por otro lado, cuando administraron anisomicina después de la quinta presentación del estímulo, no encontraron cambios en la expresión de la proteína en comparación al grupo vehículo (*figura 11B*). También observaron la expresión de Arc en la corteza insular durante la tarea de AN al presentar sacarina al 0.5% como estímulo gustativo sin la administración de anisomicina, encontraron un incremento en la expresión de la proteína una hora después de la segunda presentación del estímulo gustativo en comparación al grupo que se sólo se le presentó agua y al grupo que se le presentó sólo una vez el estímulo gustativo, y también encontraron un incremento significativo de la proteína al comparar la quinta presentación del estímulo gustativo contra estos mismos grupos (*ver figura 12*). Con estos resultados, los autores sugieren que la síntesis de proteínas de *novo* en el hipocampo dorsal después de la presentación de un estímulo gustativo novedoso es esencial para la consolidación del trazo mnémico durante la tarea y que la expresión de Arc depende de la familiarización previa del estímulo.

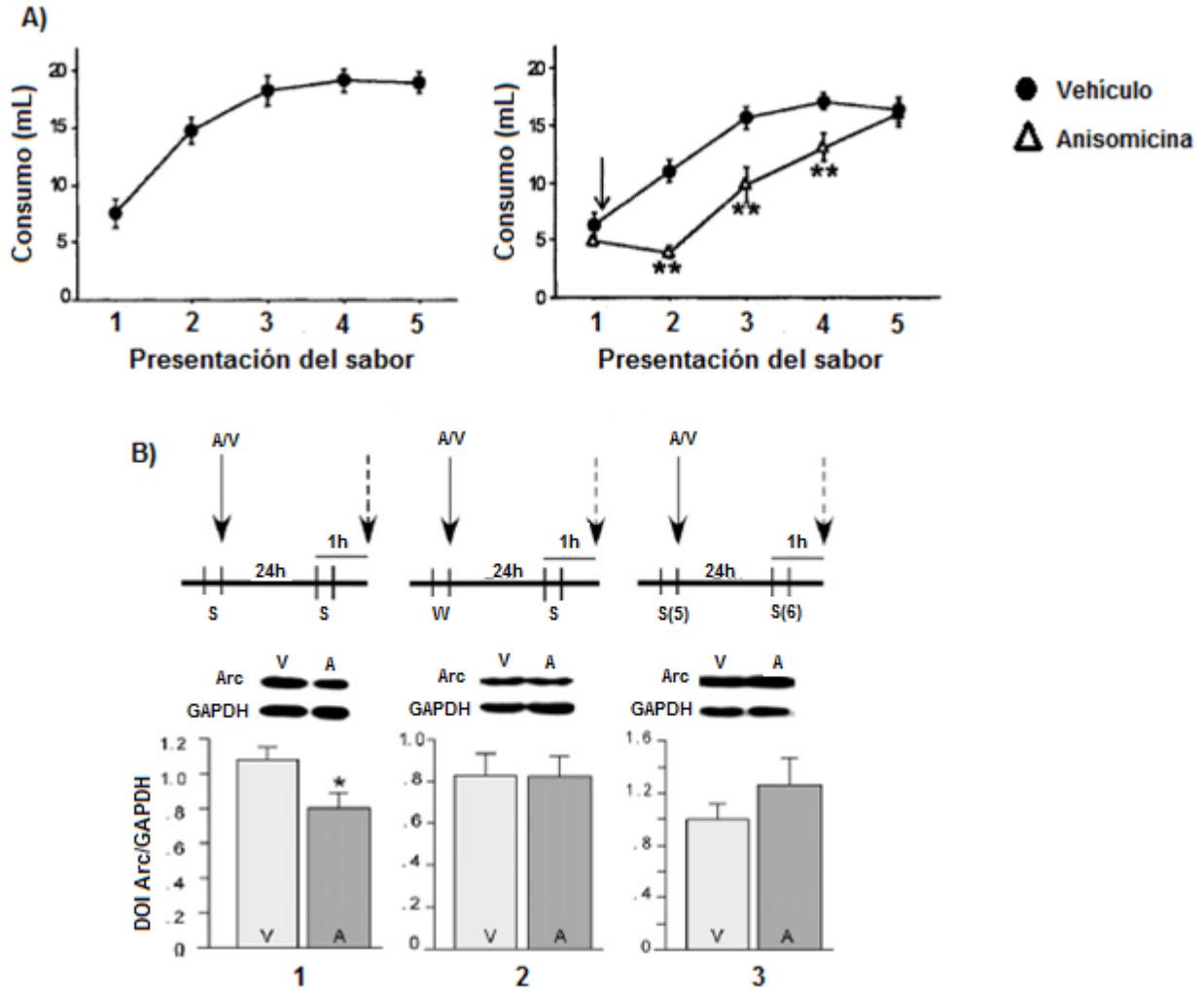


Figura 11. Efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre la formación del trazo de memoria en ratas. A) Gráfica de atenuación a la neofobia, utilizando sacarina al 0.3% como estímulo gustativo (izquierda). En la gráfica derecha se observa que la administración de anisomicina (↓) inmediatamente después a la primera presentación del estímulo previene la formación del trazo de memoria gustativa. El efecto de la anisomicina es temporal, se observa como el volumen del consumo del estímulo gustativo incrementa hasta alcanzar una meseta conductual en el grupo experimental (\*\*p<0.001), indica la diferencia en el volumen del consumo ingerido entre el grupo vehículo y grupo de anisomicina. Modificado de Rodríguez-Ortiz et al., 2005. B) Efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre la expresión de Arc. 1) La administración intrahipocampal de anisomicina en ambos hemisferios, después de la primera presentación del estímulo, decremento la expresión de Arc en la corteza insular en comparación al grupo vehículo. 2) Cuando se inyectó anisomicina 24 horas antes de la primera presentación del estímulo gustativo, los niveles de Arc no fueron afectados. C) Al administrar anisomicina después de la quinta presentación del estímulo (S5) no afecta los niveles de Arc.

V: Grupo vehículo, A: Grupo anisomicina. (↓): Administración de anisomicina, (↘): Sacrificio W:Agua, S: Sacarina. Modificado de Morin et al., 2011.

## Corteza Insular

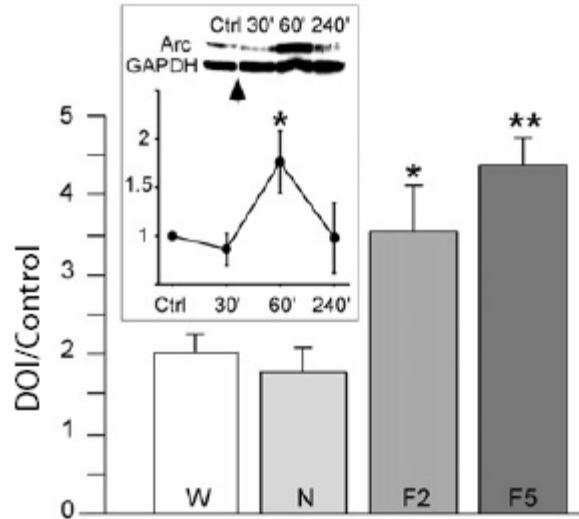
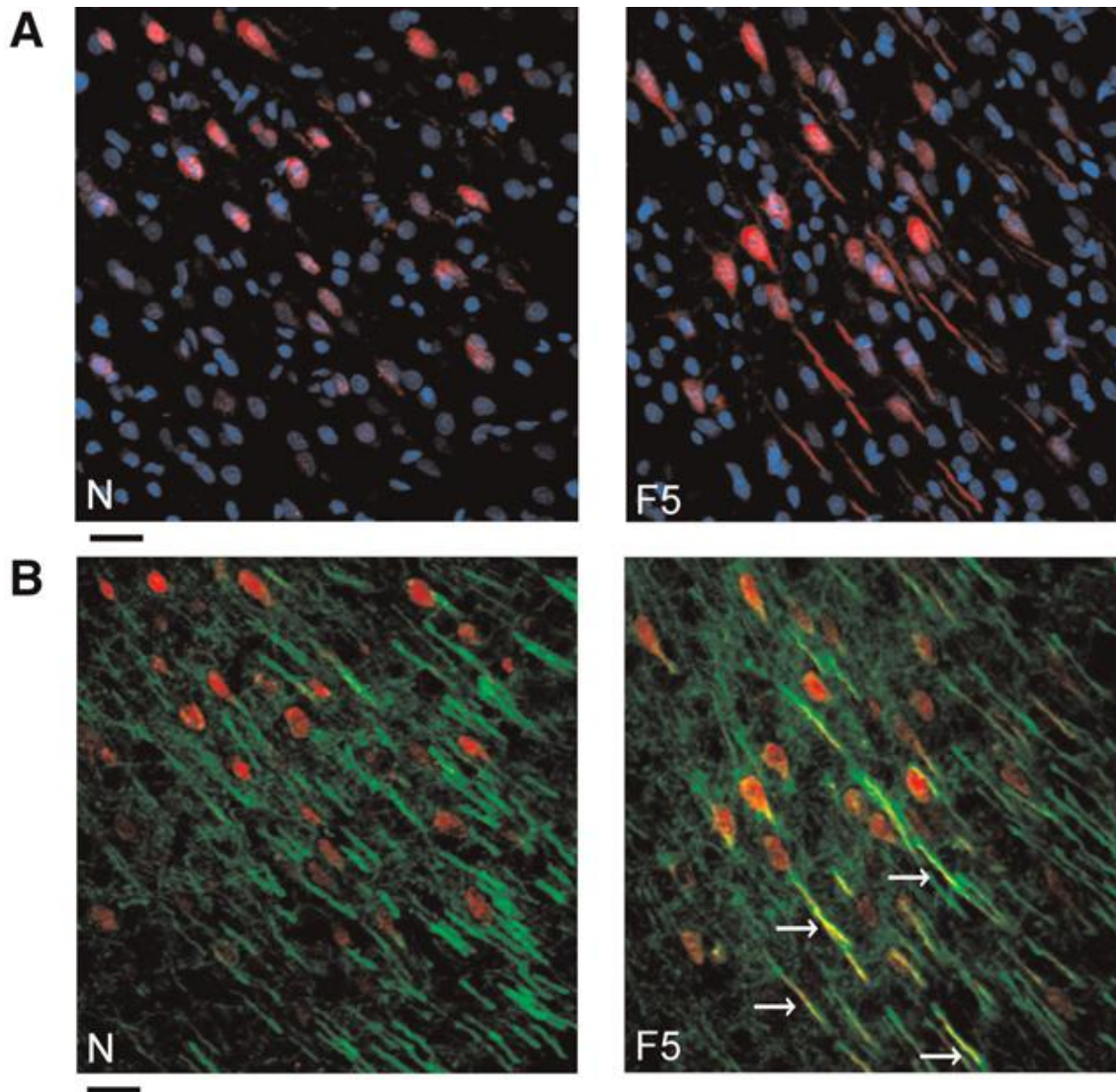


Figura 12. Expresión de Arc en la corteza insular. Se observa el incremento de la expresión de Arc en los grupos donde se presentó el estímulo gustativo por segunda vez (F2) y en la quinta presentación del mismo (F5) contra los grupos que consumieron agua (W) y el estímulo gustativo novedoso (N). Además se observa una curva temporal de la expresión de Arc, el grupo se sacrificó 60 minutos después del inicio del consumo muestra mayores niveles de Arc que los demás grupos. Los datos están expresados como la densidad óptica integrada (DOI)<sup>15</sup> dividida entre el control (GAPDH). Modificado de Morin et al., 2011b.

Morfológicamente, las dendritas y el soma se observan enriquecidas por la proteína Arc (Lyford et al., 1995). Morin y col. (2011b) evaluaron la proporción de neuronas en la corteza insular marcadas con Arc después de una tarea de AN utilizando sacarina al 0.5%, para esto realizaron una inmunofluorescencia, localizaron MAP2 (proteína asociada a microtúbulos) y Arc en dendritas, los resultados mostraron que la superposición de la proteína en dendritas incrementa de acuerdo al grado de familiaridad del sabor (figura 13). Ellos proponen, que el incremento de la expresión de Arc en dendritas durante la condición familiar puede asociarse a un aumento en la síntesis de la proteína generado por el reconocimiento de estímulo como familiar, estos

<sup>15</sup> Densidad óptica integrada (DOI). El análisis de imágenes se puede llevar a través de métodos densitométricos, en donde, se cuantifica el nivel medio de gris de una imagen. La DOI, es un parámetro densitométrico que estima la densidad óptica (la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada) por el área de una imagen u objeto.

resultados han sido sustentados por nuestro laboratorio. Sin embargo, otros estudios muestran lo contrario, mostrando un incremento sustancial de la proteína con la adquisición de un una conducta nueva (Kelly et al., 2003).



**Figura 13. Localización de Arc y Map2. Empalme entre Arc y Map-2 (A, B). Se puede observar la expresión de Arc posterior a la presentación de un estímulo gustativo novedoso (N), o familiar (F5). Azul: Dapi<sup>16</sup>, Rojo: Arc, Verde: Map-2. Las regiones donde se observa el empalme entre Arc y Map-2 aparecen en amarillo. Las flechas indican algunas dendritas donde se lleva la empalme. Modificado de Morin et al., 2011.**

<sup>16</sup> Dapi. Es un colorante fluorescente que se une a las secuencias de adenina-timina en el DNA. Una vez que DAPI es excitado con una luz ultravioleta en el microscopio confocal, es detectado a través de un filtro azul.



### **3. Planteamiento del problema**

La proteína Arc es un marcador de la actividad sináptica y es necesario para la consolidación de la memoria. En estudios previos se ha observado que los niveles intracelulares de Arc incrementan de acuerdo a la familiaridad de un estímulo gustativo apetitivo en la corteza insular, y que su expresión disminuye en presencia de un inhibidor de las síntesis de proteínas administrado en el hipocampo (Morin, 2011b), lo cual indica que hipocampo es necesario para formación de la memoria gustativa. Sin embargo, no existen trabajos que describan la expresión de Arc al presentar un estímulo gustativo aversivo. En el siguiente trabajo se utilizó una tarea de memoria gustativa, donde se presentó un estímulo gustativo aversivo (quinina) y se administró un inhibidor de la síntesis de proteínas (anisomicina) en la corteza insular, para estudiar la expresión de la proteína Arc y su distribución sobre dendritas.

#### **3.1 Hipótesis**

La presentación de un sabor novedoso y aversivo seguida de la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas retrasará la formación del trazo de memoria gustativa.

La localización de dendritas marcadas con la proteína Arc en la corteza insular será menor en el grupo experimental, en el cual, se interrumpió la consolidación de la memoria gustativa a través de la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas.

### **3.2 Objetivos generales**

- Bloquear la formación de un trazo de memoria gustativa al administrar un inhibidor de la síntesis de proteínas después de la presentación de un estímulo gustativo aversivo.
- Analizar la expresión de Arc cuando la formación del trazo de memoria gustativa es interrumpido por un inhibidor de la síntesis de proteínas.

### **4. Experimento 1: Curva conductual de atenuación a la neofobia.**

A continuación se presenta la metodología y los resultados obtenidos del primer experimento.

#### **4.1 Objetivos particulares**

Cuantificar la ingesta de un sabor aversivo durante la AN en ratas microinyectadas con anisomicina o con solución vehículo en la corteza insular, inmediatamente después de la primera presentación de quinina.

#### **4.2 Materiales y método**

##### Sujetos

Se utilizaron 20 ratas machos de la cepa Wistar de 280-300 gr, que fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  con un ciclo de 12

horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*, excepto en la fase experimental.

Las tareas conductuales se realizaron durante la fase de luz del ciclo.

### Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Anekset, PiSA agropecuaria, México) con una dosis de 84 mg/kg y xilacina (Procin, PiSA agropecuaria, México) a una dosis de 0.4 mg/kg vía intraperitoneal, y fueron montados sobre un sistema estereotáxico. También se les inyectó 0.15 mL de xilocaina vía subcutánea (Anekset, PiSA agropecuaria, México), como analgésico. Las cánulas fueron implantadas en la corteza insular en las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas estereotáxico: Anterior +1.2 mm, lateral +-5.5 mm y ventral -4 mm a partir de Bregma (Paxinos y Watson 2007). Las cánulas se fijaron con tornillos y cemento dental acrílico. Se dejó recuperar quirúrgicamente a los animales por una semana.

### Microinyección

Para la microinyección de anisomicina (Sigma, St Louis, MO, USA) se instiló una dosis de 120 µg/µL disuelta en líquido céfalo raquídeo artificial (ACSF; 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucosa, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4) bilateralmente en la corteza insular. Para el grupo vehículo se instiló ACSF. Tanto el fármaco como la solución vehículo fueron instilados con una tasa de 1 µL/1min, para asegurarnos que la difusión fuera exitosa, colocamos el mandril dentro de la cánula un minuto después del término de la instilación. La dosis de los experimentos es basada en los resultados realizados por Rodríguez-Ortiz et al., 2005 (*ver página 32*).

### Procedimiento conductual

Se retiraron los bebederos de agua 24 horas antes del inicio de la tarea. A las 10:00 am durante cinco días, los animales tuvieron acceso por 15 minutos a 30 mL de agua en probetas de plástico graduadas y se registró el volumen ingerido, posteriormente, se calculó el promedio para establecer la línea base (LB) del volumen ingerido. En el día cinco las ratas fueron divididas en dos grupos: grupo vehículo (n=10) y grupo anisomicina (n=10). El día seis se llevó a cabo la adquisición de la tarea, los animales tuvieron acceso durante 15 minutos a 30 mL de quinina al 0.005%, al termino, se les instiló anisomicina en la corteza insular. Del día siete al día doce se les presentó 30 mL de quinina al 0.005% durante 15 minutos. Por la tarde, a las 14:30 pm se proporcionó 30 mL de agua, cuatro horas después del consumo de la mañana para evitar que los animales se deshidratarán (del día seis al día doce). El día 13 los animales fueron sacrificados.

### Histología

Al termino de la fase conductual, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal (0.063g/1mL) y se perfundieron transcardialmente con solución salina al 0.9%. Se extrajeron los cerebros y fueron almacenados a 4 °C en paraformaldehído al 4%, disuelto en buffer de fosfatos al 0.1 M. Posteriormente lo cerebros fueron cambiados a una solución de sacarosa al 30% durante tres días. Se realizaron cortes coronales de 40µm de 1 a 1.4 mm anterior a Bregma (Paxinos y Watson, 2007). Los cortes fueron montados en laminillas xilanizadas para procesarse con la tinción de Nissl. Se analizaron y capturaron las fotos

con un objetivo de 1x en un microscopio estereoscópico en la región donde se encontraba la cánula.

### Análisis de datos

Para analizar los datos conductuales de la tarea se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y la prueba post hoc de Fisher para observar las diferencias del consumo ingerido entre grupos y entre días. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron hechos con el programa Statview v4.57 (Abacus Concepts Inc, EUA).

### 4.3 Resultados

#### a) Histología

Se procesó la tinción de Nissl para observar el trazo de las cánulas en la corteza insular y asegurar que fueron implantadas correctamente, tanto para el grupo de anisomicina como para el grupo vehículo. Cuatro ratas fueron descartadas del análisis debido a que la cánula no se encontró en el sitio de estudio.

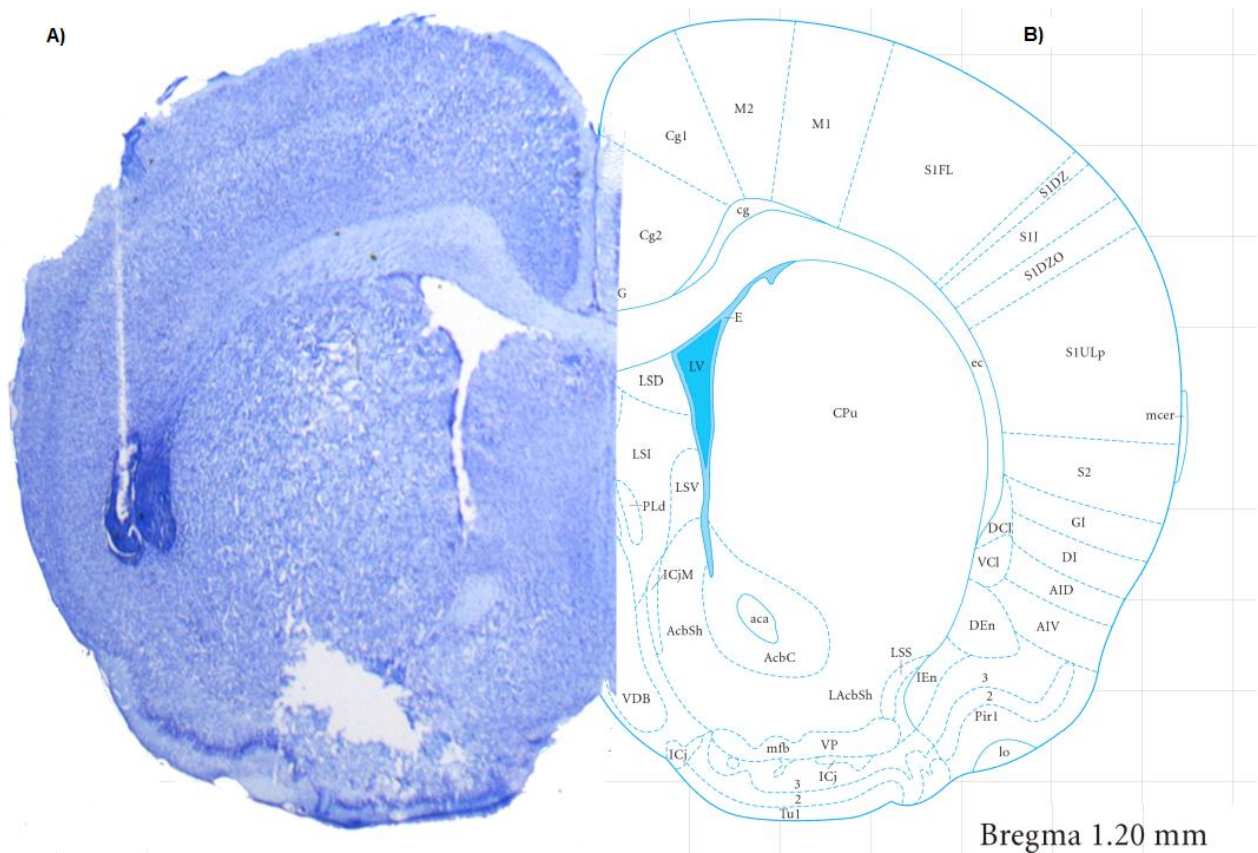


Figura 14. Corte coronal de la corteza insular. A) Corte coronal de un cerebro que muestra el trazo de la cánula en la región disgranular de la corteza insular, tejido teñido con tinción de Nissl. B) Esquema representativo que muestra la ubicación de la corteza insular (Paxinos y Watson, 2007)

### b) Curva conductual de atenuación a la neofobia

Para este experimento se obtuvo una curva de atenuación a la neofobia, con quinina al 0.005% como estímulo gustativo. Se contó con una muestra de  $n=8$  para ambos grupos: vehículo (VEH) y anisomicina (ANI).

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los días que se llevó a cabo la tarea conductual ( $F(7, 112) = 4.381$ ,  $p=0.0003$ ) y entre ambos grupos ( $F(1, 112) = 8.280$ ,  $p=0.0048$ ). En el análisis *post hoc* para evaluar el efecto a lo largo de los días en ambos grupos, se observó un decremento sustancial del volumen ingerido ( $p < 0.0001$ ) al comparar la línea base (LB) contra la primera presentación del estímulo gustativo de quinina (Q1), el promedio del volumen de ingesta fue 19.7 mL para la LB y 12.7 mL para Q1 (esto representó un decremento del 35%), lo cual indicó la presencia de neofobia para ambos grupos cuando se presentó por primera vez el estímulo gustativo. También se observó que ambos grupos presentaron una curva de atenuación a la neofobia, el volumen ingerido siempre se encontró por debajo de la LB aun en la última presentación de estímulo gustativo (Q7), con un promedio de 15.4 mL. Al comparar ambos eventos (LB vs Q7) se encontró diferencias significativas ( $p=0.0029$ ), este resultado sugirió que la quinina al 0.005% es reconocida como estímulo aversivo en ambos grupos, *ver figura 15A*. A partir de la tercera presentación del estímulo gustativo (Q3) hasta (Q7) no se observaron cambios significativos en el volumen ingerido de quinina, tanto en el grupo vehículo (VEH) como en el grupo ANI, en comparación al día anterior; por ejemplo, al comparar el volumen ingerido de Q3 en contraste de la cuarta presentación del estímulo gustativo de quinina (Q4), no se observaron diferencias

significas ( $p=.9306$ ), lo cual indica que se ha llegado a la meseta conductual (*ver figura 15A*).

Al analizar los resultados por día, el grupo ANI mostró una tendencia ( $p=.0704$ ), cuando se comparó el cambio del volumen ingerido del consumo en segunda presentación del estímulo gustativo de quinina Q2 (11 mL) con contraste de Q3 (15 mL), se observó un incremento del 27% aproximadamente, entre ambas presentaciones. Con este resultado, se mostró el inicio de una meseta conductual generada por el efecto de la AN. También se observó que no hay diferencias significativas en el grupo ANI al comparar el volumen ingerido entre los días Q1 (11.9 mL) y Q2 (11 mL) (segunda presentación del estímulo gustativo), con una  $p=0.4597$ , resultado que mostró el efecto inhibitorio del fármaco, *ver figura 15A*.

En el análisis entre grupos no se observó diferencias significativas ante la presentación de Q1 ( $p=0.5319$ ), con un promedio de ingesta de 11.9 mL para el grupo de ANI y 13.5 mL para el grupo VEH. Sin embargo, se encontró diferencias significativas en la presentación de Q2 ( $p=0.04$ ), el volumen ingerido para el grupo VEH fue 16.5 mL, mientras que grupo ANI obtuvo un promedio de 11 mL, lo cual indicó un decremento del 30% del consumo, este resultado sugirió un retraso en la formación de la memoria gustativa. Nuestros resultados indican que la anisomicina bloquea la formación del trazo de memoria, por tanto, la consolidación es dependiente de la síntesis de proteínas, *ver figura 15A, B*. A partir de Q3, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $p=0.2423$ ), lo que nos indicó que la anisomicina mantiene una ventana temporal que no es superior a 48 horas.



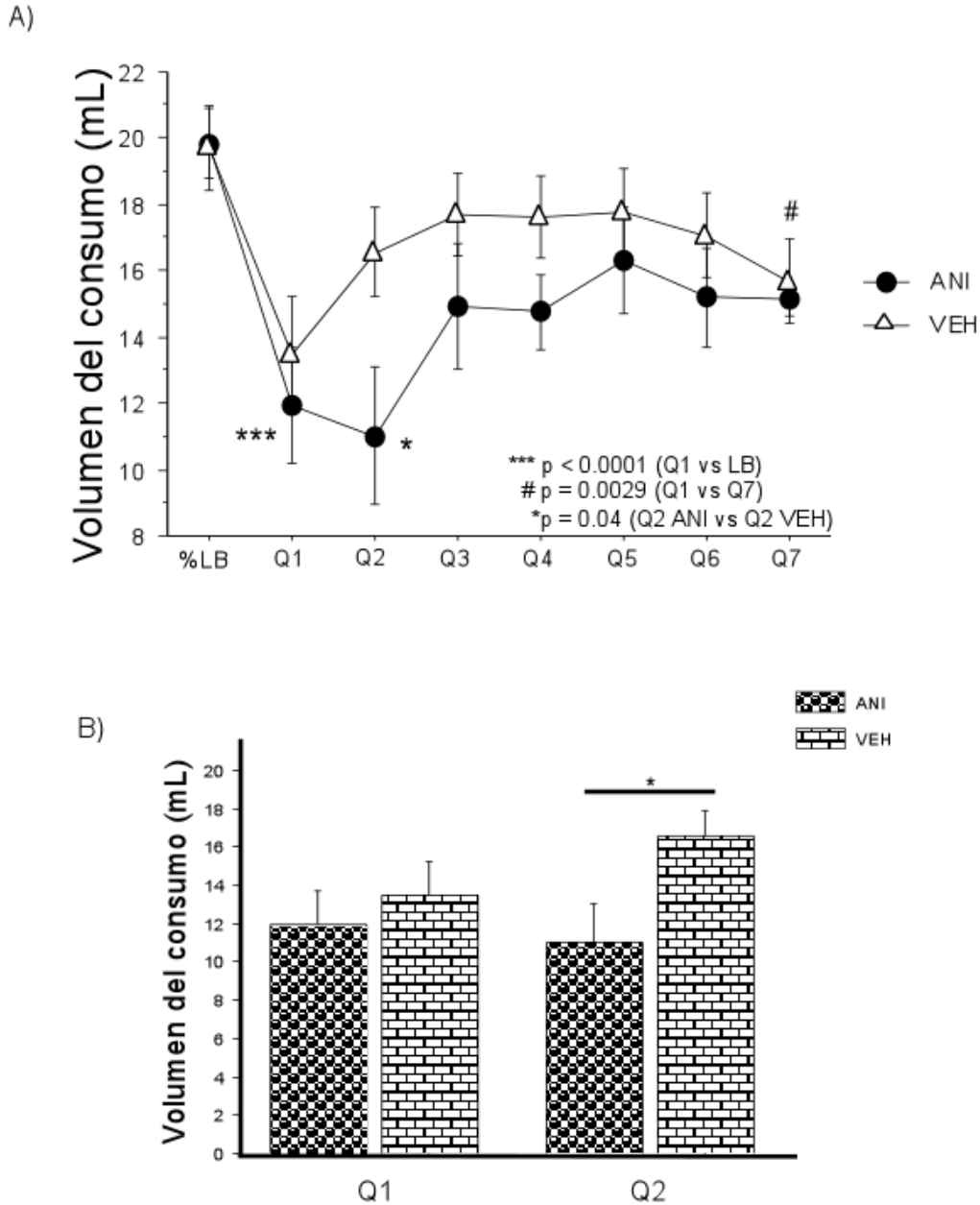


Figura 15. Curva de atenuación a la neofobia y efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas. A) La gráfica muestra el promedio del volumen del consumo ingerido (mL) durante la línea base (LB) y durante las presentaciones del estímulo gustativo (Q1-Q7). Asimismo la presencia de neofobia en la primera presentación del estímulo gustativo (Q1) (\*\*\*) p<0.0001) con respecto a la LB. En la última sesión (Q7), el promedio del volumen del consumo ingerido se encuentra por debajo de la LB (# p=.0029) en ambos grupos. El grupo ANI muestra un decremento en el consumo del volumen ingerido en Q2 (\* p=0.04) con respecto al grupo VEH en Q2. La flecha muestra la microinyección en la corteza insular de anisomicina o vehículo (,). B) Se observa el volumen ingerido entre ambos grupos durante la presentación de Q1 y presentación de Q2 (\* p=0.04). S gráfica el error estándar.

## **5. Experimento 2. Descripción de la expresión de la proteína Arc en dendritas de corteza insular durante la atenuación de la neofobia.**

Descripción de la metodología utilizada, y resultados obtenidos del segundo experimento.

### **5.1 Objetivos particulares**

- Identificar diferencias mediante un análisis cualitativo y cuantitativo de la localización de Arc y Map2 en dendritas de la corteza insular, utilizando inmunofluorescencia contra ambos antígenos, en ratas que fueron sacrificadas después de la primera presentación de quinina.
- Observar diferencias mediante un análisis cualitativo y cuantitativo de la localización de Arc y Map2 en dendritas de la corteza insular, utilizando inmunofluorescencia contra ambos antígenos, en ratas que fueron sacrificadas el segundo día de la presentación de quinina, a las cuales se les instiló anisomicina o solución vehículo el primer día de la presentación de quinina.

### **5.2 Materiales y métodos**

#### Sujetos

Se utilizaron 15 ratas de la cepa Wistar de 280-300 gr, que fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones que en el experimento anterior.

### Cirugía estereotáxica y microinyección

Para ambos procedimientos se siguieron los mismos pasos que en el experimento anterior: Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina, vía intraperitoneal, y fueron montados sobre un sistema estereotáxico. También se les inyectó de xilocaina vía subcutánea, como analgésico. Las cánulas fueron implantadas en la corteza insular en las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas estereotáxico: Anterior +1.2 mm, lateral +-5.5 mm y ventral -4 mm a partir de Bregma (Paxinos y Watson 2007). Se dejó recuperar quirúrgicamente a los animales por una semana. La microinyección de anisomicina, se instiló en una dosis de 120 µg/µL disuelta en líquido céfalo raquídeo artificial para el grupo quinina 2- anisomicina (Q2-ANI). Se instiló ACSF al grupo quinina 2-vehículo (Q2-VEH). Tanto el fármaco como la solución vehículo fueron instilados con una tasa de 1 µL/1min, para asegurarnos que la difusión fuera exitosa, colocamos el mandril dentro de la cánula un minuto después del término de la instilación.

### Procedimiento conductual

Para este experimento se retiraron los bebederos 24 horas antes del inicio de la tarea. La línea base se estableció calculando el promedio del consumo de agua por cinco días, para lo cual, a cada animal se les dio acceso a 30 mL de agua en probetas de plástico graduadas durante 15 minutos a las 11 de la mañana. Una vez obtenido el promedio de la LB, las ratas fueron divididas en tres grupos: 1) grupo quinina 2- anisomicina (Q2-ANI), 2) grupo quinina 2-vehículo (Q2-VEH), 3) grupo quinina 1 (Q1), además se contó con un grupo control caja que no fue privado de agua, dando un total de cuatro grupos para la realización del experimento. El día 6 se llevó a cabo la

adquisición de la tarea para el grupo Q2-ANI y el grupo Q2-VEH, se les dio acceso durante 15 minutos a 30 mL de quinina al 0.005%, al término del consumo se instiló anisomicina bilateralmente en la corteza insular al grupo Q2-ANI y se instiló la solución vehículo (ACSF) al grupo Q2-VEH. El día 7, ambos grupos tuvieron acceso a 30 mL de quinina al 0.005% durante 15 minutos, y fueron sacrificados una hora después del inicio del consumo. Los animales del grupo Q1 no fueron canulados, se llevó a cabo la adquisición de la tarea el día 6, se les dio acceso a 30 mL de quinina al 0.005% durante 15 minutos, y una hora después del inicio del consumo fueron sacrificados. *Ver tabla 1 (sombreado azul)*. El grupo control caja tuvo libre acceso a agua durante todo el protocolo conductual, el día 7 fue sacrificado, *ver tabla 1 (sombreado gris)*.

<b>Grupo</b>	<b>LB Día 1 al Día 5</b>	<b>Adquisición Día 6</b>	<b>Prueba Día 7</b>
<b>Q2-ANI n=4</b>	30 mL de agua durante 15 min.	30 mL de quinina al 0.005% durante 15 min. + Inyección	30 mL de quinina al 0.005% durante 15 min. + Sacrificio
<b>Q2-VEH n=5</b>	30 mL de agua durante 15 min.	30 mL de quinina al 0.005% durante 15 min. + Inyección	30 mL de quinina al 0.005% durante 15 min. + Sacrificio
<b>Q1 n=4</b>	30 mL de agua durante 15 min.	30 mL de quinina al 0.005% durante 15 min. + Sacrificio	
<b>CONTROL CAJA n=3</b>	<i>Agua Ad libitum</i>	<i>Agua Ad libitum</i>	<i>Agua Ad libitum</i> + Sacrificio

Tabla 1. Protocolo conductual.

## Inmunofluorescencia

Una hora después del inicio del consumo de quinina los animales fueron sacrificados. Se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico, posteriormente se realizó una perfusión vía transcardial con solución salina al 0.9% y después con paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de fosfatos al 0.1 M. Los cerebros fueron removidos y preservados en sacarosa al 10%, 20% y 30% (24 horas por cada concentración), con un micrótopo se realizaron cortes coronales de 20µm de 1 a 1.4 mm anterior a Bregma (Paxinos y Watson, 2007), se colocaron en solución anticongelante (30% de glicerol, 30% de etilenglicol, 40% de buffer de fosfatos con salinas al 0.1 M) para su almacenamiento a 20°C hasta realizar el tratamiento. Posteriormente, se realizó la inmunotinción por el método de flotación: se hicieron tres lavados de siete minutos con buffer de fosfatos con salina (PBS 0.1 M, pH 7.4), luego se realizó un lavado con PBS con Triton- X (PBS-T,) al 0.3% por veinte minutos. Para exponer los epítopes<sup>17</sup> los cortes fueron tratados con borohidrato de sodio (NaHO<sub>4</sub>) al 1% por ocho minutos. Se eliminaron los residuos de (NaHO<sub>4</sub>) mediante tres lavados de siete minutos de PBS-T al 0.3%, posteriormente, se incubó con una solución de bloqueo de albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) disuelta en PBS 0.1M al 5% durante una hora, al termino, se incubó durante 48 horas con anticuerpo contra ARC hecho en conejo (Synaptic Systems) en PBS al 0.1 M a una concentración 1:500 y con anticuerpo primario contra MAP2 hecho en ratón (Chemicon), en PBS al 0.1M a una concentración 1:500. Se realizaron tres lavados de siete minutos de PBS-T AL 0.3% y se incubó en oscuridad por 90 minutos con un anticuerpo secundario hecho en cabra-contra conejo,

---

<sup>17</sup> Epítope. Secuencia de aminoácidos o región topográfica de una proteína a la cual reconoce y se acopla un anticuerpo

acoplado a Alexa 568 (Invitrogen) al 1:500, y con un anticuerpo secundario hecho en cabra-contra ratón acoplado a FITC (Chemicon) al 1:500, ambos en PBS. Después se lavó tres veces por siete minutos con PBS 0.1M, posteriormente se realizaron tres lavados de siete minutos de PBS 0.1 M. Los cortes fueron montados con un medio para montaje fluorescente (Dako) y las laminillas fueron selladas con esmalte.

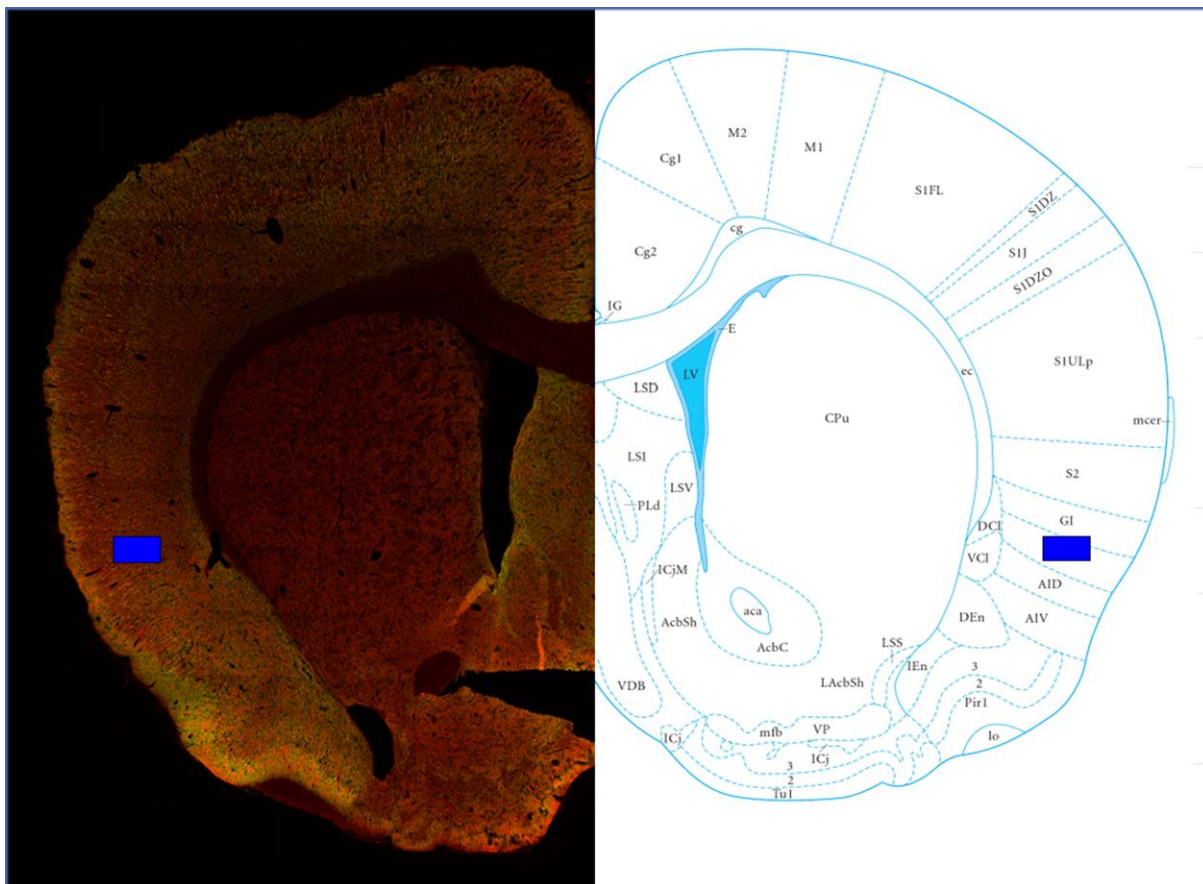
### Análisis de imágenes

Nos enfocamos en la capa disgranular de la corteza insular para el análisis de los cuatro grupos, las coordenadas de los cortes procesados se describen en el apartado anterior. En cada laminilla se colocaron cinco cortes de cada sujeto. Fue necesario observar detenidamente con el microscopio para delimitar la región y observar la presencia del trazo de la cánula para los grupos que fueron microinyectados, se capturaron un total de  $28 \pm 2$  fotos para cada corte con un microscopio confocal Olympus FV1000, con un objetivo de 40x. Finalmente para realizar el análisis cuantitativo y cualitativo se seleccionaron dos fotos por cada sujeto, cada foto tiene una dimensión 512 pixeles de ancho por 512 pixeles de alto. Las imágenes capturadas se analizaron de forma cualitativa a través del software Olympus Fluoview, se fijaron los mismos valores para todos los grupos. Se analizó cuantitativamente la intensidad del empalme entre Arc y MAP2 entre los grupos Q2-VEH y Q2-ANI, utilizando el coeficiente de Manders (M1) mediante el plugin JACop (Manders et al., 1993; Bolte y Cordelieres, 2006) a través del software Image J. Para analizar los datos se empleó el estadístico *t* de Student no pareada,  $p < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statview v4.57 (Abacus Concepts Inc, EUA).

### 5.3 Resultados

Para este experimento se examinó la expresión de Arc y la distribución de la proteína en dendritas de la corteza insular, mediante un marcado de inmunofluorescencia doble contra Arc y Map-2. El análisis se llevó a cabo en la capa disgranular, se analizaron dos fotografías por cada cerebro para realizar las observaciones necesarias (*Figura 16*), de esta manera el área a estudiar fue la misma para las cuatro condiciones.



**Figura 16.** Imagen representativa (20x) de la corteza insular, utilizando inmnofluorecencia. Fotografía capturada con un objetivo de 20x de para ejemplificar el área utilizada para realizar la inmunotinción. En el rectángulo azul se observan las capas interiores disgranulares de la corteza insular. La fotografía pertenece al grupo de Q1.

Se analizaron cualitativamente los 4 grupos y se observaron los siguientes resultados (*figura 17*): 1) Al comparar las condiciones experimentales Q2-ANI y Q2-VEH, se observó una mayor expresión de la proteína Arc en el grupo Q2-ANI (inciso j vs inciso g), y también al compararlo contra el grupo CONTROL CAJA (inciso j vs inciso a). De manera similar, el grupo experimental Q2-ANI mostró un mayor incremento de la proteína Arc en dendritas de la corteza insular al contrastarlo con el grupo Q2-VEH (inciso i vs l)<sup>1</sup>, y con el grupo CAJA (inciso c vs l). 2) Se encontró un incremento en la expresión de la proteína Arc en el grupo control (Q1) al contrastarlo con el grupo CAJA (inciso d vs inciso a), este mismo resultado se observó al compararlo contra el grupo Q2-VEH (inciso d vs inciso g). El grupo control Q1 mostró una mayor superposición de Arc en dendritas al compararlo con el grupo Q2-VEH (inciso f vs i), y también al contrastarlo contra el grupo CAJA (inciso f vs c). Ambos resultados nos sugieren que el incremento en la expresión de la proteína se debe a la detección del estímulo gustativo como novedoso. Sin embargo, al comparar la expresión de la proteína y su superposición en dendritas en el grupo Q1 contra el grupo Q2-ANI se observa un incremento no sustancial en la expresión de Arc (inciso d, f vs inciso j, l) pero dicho incremento en la inmunoreactividad no es observable contra el antígeno MAP-2 (inciso e vs inciso k).



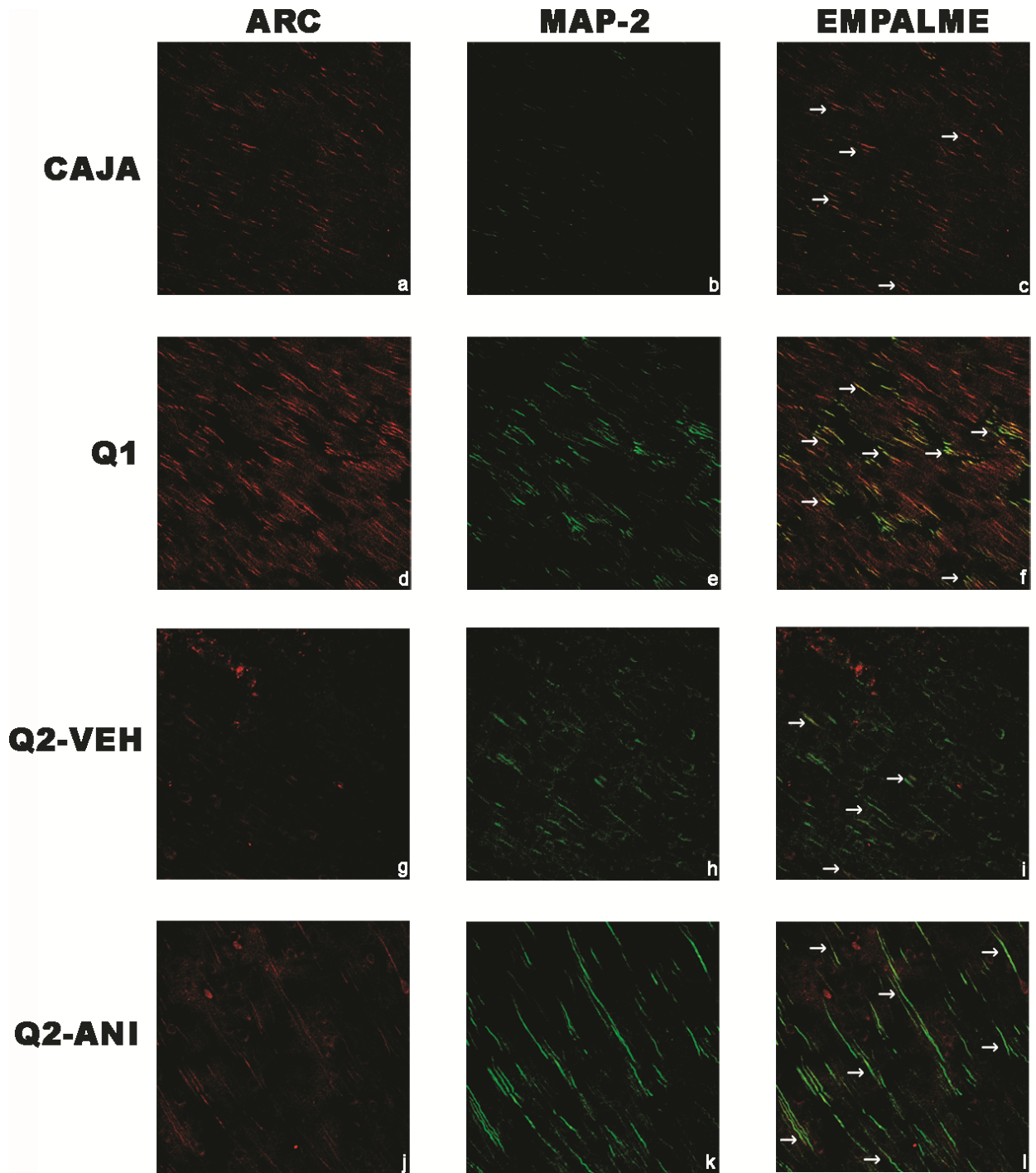


Figura 17. Imagenes representativas de cada uno de los grupos. Rojo: Arc, Verde: Map-2. Las regiones donde se observa la colocalización entre Arc y Map-2 aparece en amarillo. Las flechas ejemplifican algunas dendritas colocalizadas.

Posteriormente se realizó el análisis utilizando el coeficiente de Manders para observar las diferencias entre los grupos Q2-ANI y Q2-VEH, y de esta forma poder comparar como se expresa Arc sobre las dendritas cuando detecta un estímulo gustativo novedoso y aversivo, contra la detección de un estímulo gustativo que ya es familiar pero continúa siendo aversivo.

El coeficiente de Manders (M1), utiliza una escala de 0 a 1, en donde, 0 indica que no hay empalme entre dos imágenes y, 1 el porcentaje de empalme es total, es decir ambas imágenes se encuentran traslapadas. Este coeficiente indicó en nuestro análisis, la proporción de pixeles rojos (inmunoreactividad a Arc) que se empalmo en pixeles verdes (inmunoreactividad a Map-2), Morin et al. 2011b.

Bajo este análisis, se comprobó que el área de colocación entre Arc y MAP2 en los dos grupos se debía a una mayor expresión dendrítica y no a un aumento global e inespecífico de los niveles de Arc en el área analizada. Los valores obtenidos con el plugin JACop. De acuerdo a la escala del coeficiente, Arc y MAP2 tienen una mayor superposición en el grupo Q2-ANI. Posteriormente, se realizó la prueba *t* de student para comparar las medias entre ambos grupos, el análisis mostró diferencias significativas ( $p=0.0109$ ), lo cual sugiere que el incremento en la superposición en el grupo Q2-ANI se debe a que el estímulo gustativo fue detectado como novedoso y aversivo (*figura 19*).

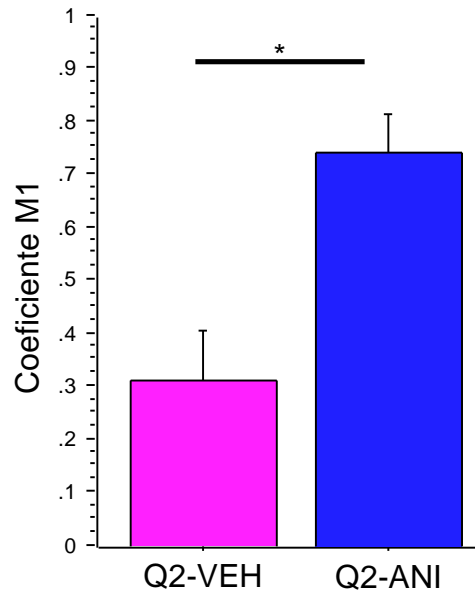


Figura 18. Coeficiente de Manders (M1). La gráfica muestra la media del coeficiente de Manders para cada uno de los grupos, \* $p=0.0109$ . Se gráfica el error estándar.

## **6. Discusión**

### **6.1 La quinina es reconocida como un estímulo aversivo**

En el primer experimento se obtuvo una curva de atenuación a la neofobia para los dos grupos, utilizando quinina a una concentración de 0.005% como estímulo gustativo, se observó que el volumen ingerido de quinina nunca rebasó el promedio de la línea base, mostrando un fenómeno contrario a lo que sucede cuando se utiliza sacarina (al 0.3% o 0.5%) como estímulo gustativo (Rodríguez-Ortiz, et al. 2005; Morin et al. 2011b). Por lo tanto, la quinina a esta concentración es reconocida como aversiva y familiar. También se observó que la primera presentación del estímulo gustativo provoca un decremento robusto en el volumen ingerido en comparación al volumen ingerido durante la línea base, mostrando una conducta neofóbica ante la primera presentación del estímulo gustativo.

### **6.2 La memoria de reconocimiento de sabor depende de la síntesis de proteínas.**

El grupo que le fue administrado bilateralmente anisomicina, mostró un decremento en el volumen ingerido el segundo día que se presentó el estímulo gustativo, lo cual sugiere un retraso en la formación del trazo de memoria gustativo en comparación al grupo vehículo. Utilizando el mismo fármaco se han encontrado resultados similares en la tarea de reconocimiento de objetos (Balderas et al, 2008) y en tareas de AN y CAS (Rodríguez-Ortiz, 2005). Esto muestra que es necesaria la síntesis de proteínas para la consolidación de un trazo mnémico.

### **6.3 El incremento en la expresión de Arc se debe a la novedad del estímulo gustativo.**

De acuerdo a la hipótesis planteada, nosotros esperábamos que los resultados mostraran un decremento en la expresión de Arc en dendritas en el grupo que se le administró anisomicina en comparación al grupo vehículo, sin embargo encontramos lo contrario. Ivanova y col. (2011), realizaron un estudio en donde analizaron mediante catFISH la expresión del transcrito de Arc en la corteza auditiva primaria presentando un estímulo auditivo novedoso y uno familiar. Ellos reportaron, que un estímulo auditivo presentado dos veces inducía una mayor actividad en neuronas marcadas con Arc en el citoplasma que un estímulo auditivo presentado sólo una vez. Igualmente, en nuestro laboratorio se observó una correlación directamente proporcional entre la familiaridad de un estímulo gustativo-seguro (sacarina) y la expresión de la proteína Arc en la corteza insular (Morin et al. 2011b).

Cuando un estímulo gustativo novedoso es presentado se desencadenan una serie de eventos moleculares que favorece la codificación de la memoria gustativa en la corteza insular (Berman et al. 1998). Dentro de estos de eventos participa la fosforilación del residuo tirosina en la subunidad 2B del receptor NMDA (Rosenblum et al., 1997) la activación de la enzima PKC (Bahar y Dudai, 1997; Yasoshima y Yamamoto, 1997), la síntesis de proteínas de *novo* (Rosenblum et al., 1993), y cambios en la activación colinérgica (Miranda et al., 2003). A través de experimentos realizados con microdiálisis en la corteza insular, se ha observado un incremento en la liberación de acetilcolina, seguida de la presentación de un sabor novedoso (sacarina o quinina) en

comparación a los niveles de acetilcolina liberados en presencia de un sabor familiar como el agua. A partir de la segunda presentación del estímulo (sacarina o quinina), la liberación de acetilcolina decreta hasta alcanza un nivel similar a la liberación seguida del presentación de agua (Miranda et al., 2000). Se puede concluir que la formación del trazo de memoria al sabor es iniciado por activación de receptores glutamatérgicos y muscarínicos, los cuales, están acoplados a una proteína G que puede activar a la enzima PKC y la liberación de calcio de almacenes intracelulares. Finalmente se facilita la activación de la cascada de señalización de las MAPK, que permitirá la fosforilación de ERK1-2 media hora después de la ingesta de sacarina (al 0.1%) novedosa en la corteza insular (Berman et al, 1998). Bernstein y Koh (2007) observaron un incremento en la expresión de c-fos (un gen de expresión inmediata que depende de la señalización de las MAPK), una hora después de la presentación de sacarina al 0.5% como estímulo gustativo novedoso, y la expresión de la proteína regresa a su estado basal 4 horas después de la presentación del estímulo, tanto en la corteza insular como en la amígdala central, mientras que al utilizar la sacarina como estímulo familiar (presentación del estímulo por 7 días), no encontraron diferencias significativas en ninguna de las estructuras. Además, recientemente se encontró una correlación en la expresión de Arc entre la novedad del estímulo y la laterización hemisférica por Inberg y col. (2013), observaron a través de western blot en cada hemisferio de la corteza insular, un incremento en la expresión de la proteína al presentar sacarina (0.3%) en comparación al grupo control (presentación de agua). También encontraron, que la familiaridad del estímulo gustativo tiene una correlación inversa desde la segunda presentación del estímulo cuando se observa la expresión de la proteína por hemisferio, es decir, conforme el estímulo gustativo se vuelve familiar la

expresión de la proteína decremento. Estos resultados aluden los datos presentados en este trabajo, en donde se observa una mayor expresión de la proteína tanto para el grupo al que se le presentó quinina por primera vez y fue sacrificado una hora después (Q1), como al grupo en el que se evitó la formación del trazo de memoria gustativo mediante la administración de anisomicina y también fue sacrificado una hora después de la segunda presentación del estímulo gustativo (Q2-ANI), lo cual sugiere que el incremento en la expresión de la proteína se debe a la detección del estímulo gustativo como novedoso. Igualmente, se encontró en el grupo Q2-VEH, el cual ya es reconocido como un estímulo familiar para el animal, un decremento en la expresión de la proteína.

#### **6.4 El incremento en la expresión de Arc se debe a la propiedad aversiva del estímulo gustativo.**

Los antecedentes mostrados en este trabajo relacionados a la expresión de Arc, proponen que el incremento en la expresión de la proteína se debe a dos razones, 1) el estímulo gustativo es reconocido como familiar y, 2) el sabor del estímulo gustativo (sacarina) posee una propiedad hedónica o apetitiva, donde el volumen ingerido siempre se encuentra por encima de la LB (Morin et al, 2011b). Como se mencionó anteriormente, el primer experimento nos mostró que el estímulo gustativo presentando resulta aversivo, el volumen ingerido siempre se observa por debajo de la LB. Acolla y col. (2007), mediante imagenología intrínseca observaron la activación de las neuronas de la corteza insular a partir de la presentación de distintos estímulos gustativos, sacarosa (500 mM) y cloruro de sodio (500 mM), como estímulos gustativos apetitivos, y quinina (20 mM) y ácido cítrico (10 mM), como estímulos gustativos aversivos,

encontraron una activación diferencial sobre la corteza insular, los estímulos gustativos apetitivos compartían las mismas zonas de activación neuronal, mismo resultado se observó con los estímulos gustativos aversivos. El mismo grupo de trabajo realizó la tarea de CAS, utilizando sacarina al 0.1%, para observar la representación de la activación de las neuronas de la corteza insular, encontraron que al presentar a la sacarina aversiva como estímulo gustativo, las neuronas de la corteza insular activadas se localizan en la misma área donde la activación neuronal provocada por la quinina es representada. En la fase de extinción de CAS, se observó que los estímulos gustativos presentados ya no compartían la misma zona de activación neuronal, se propone que tales resultados se deben a la presencia de un shift hedónico (Accolla et al, 2008). Probablemente, los resultados mostrados en este trabajo respondan a este proceso. En resultados no publicados en nuestro laboratorio, se ha observado un incremento en la expresión de Arc en la amígdala en la fase de adquisición de CAS, sin embargo, la expresión en la corteza insular bajo el mismo tratamiento no presenta un incremento. Es necesario, continuar la curva de AN para observar como es la expresión de la proteína en los días sucesivos, así como realizar el mismo experimento en la amígdala.

### **6.5 Expresión de Arc en dendritas**

De acuerdo a la cinética de Arc se ha observado que su transcrito se traslada del núcleo a las dendritas (Guzowski et al., 1999), en donde se realiza la traducción de la proteína, una hora después de presentar algún estímulo (Link et al. 1995; Lyford et al., 1995; Ramírez-Amaya et al, 2005, Morin et al., 2011b). El incremento de la proteína Arc en dendritas está relacionado con la plasticidad sináptica (Korb et al., 2011). Se ha



observado la distribución de la proteína en las espinas dendríticas en relación a su morfología, que la localización de la proteína es mayor en espinas dendríticas delgadas y menor en espinas dendríticas cortas y gruesas, este shift sugiere que Arc es necesario para modificar procesos celulares en respuesta a la actividad sináptica, y de este modo formar nuevas memorias y olvidar viejas memorias (Peebles et al. 2010). En este trabajo se encontró que la proteína localiza en dendritas una hora después de la presentación del estímulo gustativo en las cuatro condiciones, pero se observa un incremento sustancial en Q2-ANI y Q1 en comparación a los grupos restantes, este resultado sugiere, que la superposición de la proteína en dendritas se debe a la consolidación de nueva información, y el decremento en el grupo Q2-VEH, es ocasionado debido a que el estímulo gustativo ya no es reconocido como novedoso.

Por otro lado, Arc ha recibido un papel importante en la plasticidad homeostática, como ya se mencionó en los antecedentes de este trabajo, participa en la inserción y remoción de receptores AMPA sobre la membrana postsináptica, de manera indirecta a su expresión. Se ha establecido en cultivos celulares, que el incremento de receptores AMPA está asociado a una baja actividad neuronal, mientras que el decremento de receptores AMPA, indica un aumento en los procesos excitatorios sinápticos (Turrigiano, 2008). En relación a nuestros datos, el incremento en la expresión de Arc sobre dendritas seguido de la presentación de un estímulo gustativo novedoso, podría provocar la endocitosis de receptores AMPA y por tanto un incremento en la actividad sináptica, necesario para la consolidación del trazo mnémico.

## **6.6 Arc participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento de sabor.**

La capacidad de los inhibidores de la síntesis de proteínas para bloquear la formación de la memoria gustativa en la corteza durante las primeras horas posteriores a la ingesta de un sabor, establecen el marco conceptual que representa la consolidación de la memoria, la cual depende de la modulación de la expresión génica (Goelet et al., 1986). Se administró el fármaco inmediatamente después de la presentación del sabor de acuerdo a los resultados observados en Morin y col. (2011b).

El análisis cualitativo muestra un incremento de la proteína tanto en la inmunoreactividad contra Arc como en su colocación en dendritas para el grupo Q2-ANI, como para el Q1. Estos resultados podrían reafirmar que la expresión de la proteína se debe al reconocimiento de la quinina como un estímulo gustativo novedoso, asimismo, vinculan con la definición de Arc como un marcador de la actividad neuronal y su participación en la consolidación de la memoria en diferentes tareas conductuales.

Sin embargo, durante el análisis cuantitativo se encontraron diferencias significativas en la superposición de Arc en dendritas, entre el grupo Q2-ANI y Q1 que difícilmente son observable en el análisis cualitativo. Se sugiere que la anisomicina evitó la consolidación del trazo de memoria gustativo, y el decremento observado en Q2-ANI podría deberse a la necrosis generada por la canulación. Para corroborar que el incremento de Arc en dendritas se debe a la detección del estímulo gustativo como novedoso, es necesario adicionar otro grupo control en el experimento, el cual sea

sacrificado una hora después de la segunda presentación del estímulo gustativo y no sea canulado.

### **6.7 Limitaciones del estudio y perspectivas**

Los resultados mostrados en este trabajo presentan limitaciones experimentales, es necesario continuar y proponer nuevos experimentos que resuelvan los cuestionamientos que se presentaron durante el desarrollo del proyecto:

- Ampliar la “n” para el primer experimento conductual de AN, y así disminuir el error estándar que presentan los datos.
- Ampliar la “n” para el segundo experimento, para obtener un resultado más concluyente.
- En el segundo experimento, es preciso continuar con la curva de AN hasta la quinta presentación de quinina (Q5), realizar la técnica inmunofluorescencia en cada uno de los días, de esta forma podremos observar si continúa decrementando la expresión de la proteína Arc de acuerdo a la familiaridad del estímulo.
- En este trabajo sólo se realizó un análisis cualitativo entre todos los grupos, y obtuvo un coeficiente de superposición de Arc en dendritas entre los grupos que se les administró anisomicina. Sin embargo, un análisis más detallado incluye contar el número de dendritas positivas marcadas con Arc, así como de neuronas.

- Se sabe que la región agranular de la corteza insular participa en procesos de gusto y olfato (Gaboot et al., 2003). Sería interesante realizar un estudio diferencial para observar la expresión de Arc en las diferentes regiones de la corteza insular ante un estímulo gustativo.
- También se ha observado a través de imagenología *in vivo* de dos fotones un mapa gustativo en la corteza insular, en donde la presentación de cada una de las cinco cualidades gustativas (amargo, ácido, dulce, umami y salado) es localizada en una región específica de la corteza insular (Chen et al., 2011). Sería de importancia analizar la expresión de Arc ante la presentación de estímulos gustativos con una cualidad gustativa diferente, como glutamato monopotásico, cloruro de sodio o ácido cítrico.

## **7. Conclusiones**

Al finalizar este trabajo se concluye que la consolidación de la memoria gustativa es dependiente de la síntesis de proteínas de novo, y que la traducción de Arc es necesaria para que se lleva a cabo dicho proceso celular.

El incremento en la expresión de la proteína Arc en dendritas de la corteza insular depende de la novedad y de las características cualitativas del estímulo gustativo dentro de la formación de un trazo de memoria gustativa.

## 8. Referencias

- Accolla, R., Bathellier, C., Petersen, H. y Carleton, A. (2007). Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *The Journal of Neuroscience*, 27: 1396-1404.
- Agranoff, B., David, R. y Brink, J. (1966). Chemical studies on memory fixation in goldfish. *Brain research*, 1:303-309.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter. P. (2008). *Molecular biology of the cell*. Garland Science. EU: New York.
- Bahar, A. y Dudai, Y. (1997). Molecular mechanisms of conditioned taste aversion memory in the rat insular cortex: potential involvement of protein kinase C. *Social Neuroscience Abstract*, 23:823.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. y Bermúdez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning and memory*, 15:618-624.
- Bear, M., Connors, B. y Paradiso M. (2007). *Neuroscience: exploring the brain*. Lippincott Williams & Wilkins. EU: Baltimore.
- Berman, D., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. y Dudai, Y. 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*, 8:10037–10044
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanism of taste-recognition memory. *Nature Reviews*, 5: 209-217.

- Bermúdez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., y McGaugh L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning and Memory*, 1072: 0502-0505.
- Bernstein, I. y Koh, M. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chemical Senses*, 32: 99-103
- Bramham, C., Alme, M., Bittins, M., Kuipers, S., Nair, R., Pai, B., Panja, D., Schubert M., Soule, J., Tiron, A., Wibrand, K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Experimental Brain Research*, 200:125–140
- Bolte S. y Cordeleieres F. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224:213.232
- Carlson, N. (2006). *Psicofisiología de la conducta*. McGraw Hill. México: DF.
- Cechetto D. y Saper C. (1987). Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *Journal computational neurology*, 262: 27-45.
- Chen, X., Gabitto, M., Peng, Y., Ryba, N. y Zuker, C. (2011). A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain. *Science*, 333: 1262-1266.
- Davis, H. y Squire, R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin*, 96: 518-559.
- Dash, P., Moore, A., y Kobori, N. (2007). Molecular activity underlying working memory. *Learning and memory*, 14: 554-563.
- Domjan, Mi. (2010). *The principles of learning and behavior*. (2010). Wadsworth. EU: California.

- Dudai, Y (2002). *Memory from A to Z, keywords, concepts and beyond*. Oxford: Oxford University Press.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of psychology*, 55: 51-86.
- Escobar M. y Derrick, B. (2007). Long term potentiation and depression as putative mechanisms of memory formation. En: Bértmudez- Rattoni, F.: *Neural Plasticity and Memory, from genes to brain imaging*. Frontiers in Neuroscience. CRS Press. EU.
- Flexner, J., Flexner L. y Stellar E. (1963). Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*, 3575: 57-59
- Frankland, P., Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6:119–130.
- Gabbott, P., Warner, T., Jays, P. y Bacon, S. (2003). Areal and synaptic interconnectivity (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain research*, 993: 59-71.
- Goelet, P., Castellucci, V., Schacher, S. y Kandel, E. (1986). The long and the short of long-term memory- a molecular framework. *Nature*, 322:419–422.
- Guzowski, J., Mcnaughton, B., Barnes, C y Worley, P. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2:1120–1124
- Guzowski, J., Lyford, G., Stevenson, G., Houston, F., McGaugh, J., Worley, P. y Barnes, B. (2000). Inhibition of activity-dependent Arc protein expression in the

- rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of Neuroscience*, 20:3993–4001.
- Guzowski, J. y Worley, P. (2001). Cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization (catFISH). *Current Protocols in Neuroscience*.
  - Hawkins, R., Kandel, E. y Bailey C. (2006). Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. *Biology Bulletin*, 3:174-191
  - Hebb, D. (1949). *The Organization of Behaviour*. John Wiley & Sons.
  - Inberg, S., Elkobi, A., Edri, E. y Ronsenblum, K. (2013). Taste familiarity is inversely correlated with Arc/Arg3.1 hemispheric lateralization. *The Journal of Neuroscience*, 33: 11734-11743.
  - Ivanova, T., Matthews, A., Gross, C., Mappus, R., Gollnick, C., Swanson, A., Bassell, G. y Liu, R. (2011). Arc/Arg3.1 mRNA expression reveals a sub-cellular trace of prior sound exposure in adult primary auditory cortex. *Neuroscience*, 181: 117–126.
  - Kandel Eric R. (2007). *Principles of Neural Science*. McGraw Hill. EU.
  - Kandel, Eric R. (2009). The biology of memory: a forty-year perspective. *The Journal of Neuroscience*, 29:12748 –12756
  - Kelly A., Laroche S. y Davis S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *The Journal of Neuroscience*, 23:5354–5360.



- Korb, E. y Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends of neuroscience*, 34: 591–598.
- 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. *Proc Natl Acad Sci*, 92:5734–5738
- Lyford, G., Yamagata, K., Kaufmann, W., Barnes, C., Sanders, L., Copeland, N., Gilbert, D., Jenkins, N., Lanahan, A. y Worley, P. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14:433–445.
- Manders, E., Verbeek F. y Aten J. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 169: 375-382.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory - a century of consolidation. *Science*, 287:248–51.
- Mc Gaugh J.L. (2007). Searching for Memory in the Brain: Confronting the Collusion of Cells and Systems. En: Bermúdez, F.: *Neural Plasticity and Memory, from genes to brain imaging*. Frontiers in Neuroscience. CRS Press. EU.
- Mendoza, L. (2009). *Expresión de la proteína Arc en la corteza insular durante el aprendizaje gustativo*. Universidad Nacional Autónoma de México. México: Distrito Federal.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B. y Bramham, C. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *Journal of Neuroscience*, 27:10445–10455

- Milner, B., Squire, L. y Kandel, E. (1998). Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, 20:445-468.
- Miranda, M., Ramirez-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., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L. y Bermúdez-Rattoni, F. (2003). Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiology of learning and memory*, 80: 211-222
- Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G. y Guzowski, J. (2008). Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89: 269–284.
- Morin, J.P. (2011a). *Caracterización de la expresión de Arc en la formación de la memoria de reconocimiento al sabor*. Universidad Nacional Autónoma de México. México: Distrito Federal.
- Morin, J.P., Quiroz, C., Mendoza-Viveros L., Ramírez-Amaya, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (2011b). Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated one cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel. *Learning and memory*, 18:610–616.
- Panja, D., Dagyte, G., Bidinosti, M., Wibrand, K., Kristiansen, A., Sonenberg, N., y Bramham, C. (2009). Novel Translational Control in Arc-dependent Long Term Potentiation Consolidation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 31498–31511

- Paxinos G, y Watson C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic. San Diego, CA.
- Peebles, C, Yoo, J., Thwina, M., Palopa, J., Noebelsd, J. y Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and mantains network stability in vivo. *PNAS*, 107: 18173–18178
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, ML., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., y col. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52: 437–444.
- Purves, D., Agustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A. y White, L. (2008). *Neuroscience*. Sinauer Associates. Sunderland: Massachussets
- Ramirez-Amaya, V. (2007). Molecular mechanisms of synaptic plasticity underlying long term memory formation. En: Bértmudez, F.: *Neural Plasticity and Memory, from genes to brain imaging*. Frontiers in Neuroscience.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley P. y Barnes C. (2005). Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific. *The Journal of Neuroscience*, 25:1761–1768
- Rodríguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R., 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.

- Rosenblum, K., Meiri, N. y Dudai, Y (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavior Neural Biology*, 59:49 –56.
- Rosenblum, K., Berman, D., 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.
- Sadoris, P., Holland, P. y Gallagher, M. (2009). Associatively Learned Representations of Taste Outcomes Activate Taste-Encoding Neural Ensembles in Gustatory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 29:15386 –15396
- Shepherd, J. y Bear, M. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature neuroscience*, 14: 279-284
- Steward, O. y Worley, P. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*, 30:227–240.
- Squire, L. y Kandel E. (2000). *Memory: From mind to molecules*. W.H. Freeman y Co. EU: New York.
- Squire, L., Bloom, F., Spitzer, N., Squire, LR., Berg, D., du Lac, S. y Ghosh, A. (2008). *Fundamental Neuroscience*. Academeci Press. USA
- Sweatt, D. (2010). *Mechanisms of memory*. Academic Press. USA: San Diego, California.
- Tortosa, F. y Civera, C. (2006). *Historia de la psicología*. McGRAW-HILL. España: Madrid.
- Turrigiano, G. (1999). Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends in neuroscience*, 22:221-227

- Turrigiano, G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135:422–435
- Tsien, J. (2006). Learning and memory. En Siegel, G., Albers, R., Brady S. y Price, D. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Academic Press. Canada.
- Waung, M., PfeiVer, B., Nosyreva, E., Ronesi, J. y Huber, K. (2008). Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*, 59:84–97
- 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
- Yasoshima, Y. y Yamamoto, T. (1997). Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. *Neuron Report*, 8:1363–1367.
- Ying, S., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M., Hunt, S., Bliss, T. y Bramham, C. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *The Journal of Neuroscience*, 22:1532–1540