



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

***“Efecto de la inhibición de la desacetilasa de histona
sobre la memoria de largo plazo”***

TESIS

Que para optar por el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

QFB. Gerardo Ramírez Mejía

Tutor Principal

Dr. Federico Bermúdez Rattóni
Instituto de Fisiología Celular

Comité Tutorial

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
Instituto Nacional de Cancerología

México, D.F. a 5 de Febrero de 2016



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.

Formato: mgdp_1
VoBo Comité Tutor,
revisión de manuscrito de tesis

09 / 10 / 2015
dd-mm-aaaa

A los miembros de Jurado de Examen

Por medio del presente manifiesto que hemos revisado el trabajo escrito del proyecto que lleva como título: **"Efecto de la inhibición de la desacetilasa de histona sobre la memoria de largo plazo"** del alumno **Gerardo Ramírez Mejía** y consideramos que tiene la calidad suficiente para ser presentado al jurado de examen.

Comité Tutor



**Dr. Federico Bermúdez
Rattoni**
Instituto de Fisiología
Celular
Tutor Principal



**Dra. María de Lourdes
Massieu Trigo**
Instituto de Fisiología
Celular
Comité Tutor



**Dr. Ernesto Soto Reyes
Solís**
Instituto Nacional de
Cancerología
Comité Tutor

TESIS
Efecto de la inhibición de la desacetilasa de histona sobre la memoria de largo plazo



Laboratorio de
Neurobiología del
Aprendizaje y la Memoria

Los estudios conductuales e histológicos se realizaron en el **Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria** del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del **Dr. Federico Bermúdez Rattoni**.

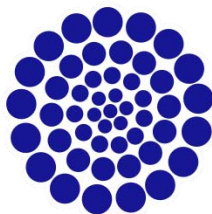
Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de Proyecto **155242**) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (**IN209413**).

También se contó con el apoyo de las Técnicas Académicas Dra. Israela Balderas Moreno y Q.F.B. Perla Moreno Castilla.

Los estudios de expresión génica se realizaron en el **Laboratorio de Carcinogénesis** de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología bajo la dirección del **Dr. Ernesto Soto Reyes Solís**.

Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de Proyecto **182997**).

TESIS
Efecto de la inhibición de la desacetilasa de histona sobre la memoria de largo plazo



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El alumno **Gerardo Ramírez Mejía** agradece al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgar la Beca Nacional con el **No. de registro de becario 308739** del periodo de Febrero de 2014 a Enero de 2016.

El alumno **Gerardo Ramírez Mejía** agradece al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado** por otorgar apoyo económico para asistir a los congresos internacionales de Neurociencias 2014 y 2015.

AGRADECIMIENTOS

Cero y van dos... nuevamente me encuentro en la dificultad de escribir esta parte de la tesis...

Agradezco nuevamente a **Dios** por permitirme iniciar y concluir esta etapa en mi vida y permitirme continuar por este camino.

Agradezco también a mis ejemplos de vida, mis modelos, mis padres: **Carlos Enrique Ramírez Arizpe** y **María Bernardita Mejía Pérez**, a pesar de que les entristeció mi partida y salida del hogar, siempre me apoyaron con más que palabras de aliento para que continuara, las porras desde lejos que sé recibía cada vez que les comentaba que tenía un examen tutorial. Y también gracias por escuchar mis largas historias y penas contadas al calor de una buena cena y un café cada vez que regresaba al hogar, porque siempre esperaron en vela hasta que llegaba. Muchas gracias por todo, saben bien que mucho en mi vida y en mi formación es debido a ustedes, toda mi templanza fue heredada de ustedes. A mi hermana **Raquel** porque es gracias a ti que se logró este sueño de ingresar al posgrado, porque no lo pensaste dos veces al decirme “sí, apúrate a llegar”; por alentarme a mejorar en mi trabajo, aunque todos en la familia de alguna manera sabemos que eres ejemplo de que debemos quitarnos el miedo y lanzarnos a cumplir nuestros sueños y metas, además de permanecer en mejora constante; gracias a ti no me pegó tan duro la salida de casa, porque me apoyaste en todos los sentidos cuando tomé la decisión de mudarme al D.F.; muchas gracias por todo “hemana”. A mi hermano **José Carlos**, sabes que, a pesar de decirlo pocas veces, eres otro de mis ejemplos a seguir, has sabido moverte en tu ámbito por tus propios medios; gracias por siempre hacerme reír incluso en el momento menos pensado, también por apoyarme en muchos sentidos. Al hermano que conocimos en el camino **Luis Andrés Gonzaga** porque mucho del poco espíritu analítico que tengo es gracias a las largas pláticas que teníamos cuando ambos teníamos trabajo por hacer, además también gracias por hacerme reír con tus disparates. Muchas gracias familia, los amo.

Agradezco también a **Onphalia Díaz** por todas las pláticas que tuvimos junto a Raquel, mientras degustábamos una pieza de pan con café antes de dormir y por la actitud siempre positiva que muestras.

Sigo en agradecimiento a mi sensei **Laura Ortega Hernández** porque mucho de lo que me enseñaste, lo sigo aplicando, sobre todo el respeto hacia los animales de experimentación y el cuidado que se debe tener al realizar los experimentos, además la importancia de la correcta y adecuada planeación. Muchas gracias.

Agradezco a mi jefe, el **Dr. Federico Bermúdez Rattoni** ya que nada de esto hubiese sido posible sin el Sí que me extendió cuando vine a visitarlo al lab hace más de dos años, por permitirme de esta manera ingresar al grupo de trabajo del famoso “BL-201” y por poner su confianza en mí al asignarme un proyecto. Muchas, muchas gracias.

A mis grandes amigos que conocí en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, algunos han tomado un camino un poco diferente, pero de alguna u otra forma seguimos en comunicación: **Daniel Ávila** (mi primer amigo en el posgrado, gracias por mejorar mi perspectiva crítica del mundo y por todas tus historias que comenzaban con un “la, la, la, la”, tú sabes; gracias también por enseñarme a hacer ORM en ratón), **Elvi Gil** (te conocí en el laboratorio vecino de “Neuroquímica” en la BUAP y por interés sobre el tema de “memoria” nos volvimos a encontrar aquí; has concretado mi idea de lo poderoso que puede ser un diseño experimental bien fundamentado; gracias por las pláticas eternas sobre temas diversos al iniciar el día en el lab, sabes que deberíamos reducirlas...), **María Romero** (si no me equivoco fuiste de las primeras personas con las que entablé conversación en el lab, fuimos casi contemporáneos cuando ingresamos, mis respetos por ser una médica que sale del estándar, por ser crítica a más no poder, pero al mismo tiempo mantenerte en tus

cabales, gracias por la confianza que depositas en mí para solicitar consejo, sé que muchas veces no puedo darte uno decente), **Fernanda López** (una de las personas que he conocido a la que le apasiona el mundo de la epigenética, muchas gracias por ser la “Dalai” del grupo, mucha de la tranquilidad fue debida a ti; gracias por tolerarme cuando estaba aburrido y no tenía a quien molestar; por las conversaciones que me permitieron enfocar mis preguntas; vas por buen camino, sigue así), **David Vallejo** (mi primer alumno no oficial, muchas gracias por aguantar los regaños al enseñarte a hacer cirugía –por cierto, no olvidaré a esa ratona C57, sabes a lo que me refiero-, también gracias por tu actitud positiva y objetiva, de alguna manera esa actitud me enseñó que a pesar de las trabas es posible ver el mundo de otra forma; sabes una pequeña parte de mi opinión sobre ti, sigue adelante), **Franco Chávez** (gracias por las pequeñas pláticas que hemos tenido desde que llegué al lab, de alguna manera me han ayudado a disminuir el estrés), **Lucy Landa** (gracias por mostrarme que la opinión debe expresarse a pesar de las consecuencias y por las largas historias durante las comidas), **Alejandro Bárcenas** (gracias por la actitud tranquila que transmitiste durante el tiempo que conviví contigo en el lab, por ser el “todólogo” del grupo que siempre tiene una buena y acertada opinión sobre temas tan variados, mis respetos). A todos, muchas gracias por los momentos que pasamos en el lab, aquellos fueron los causantes de tantas risas, pero también de corajes, ustedes lo saben. Siempre he pensado que este tipo de relaciones generan una segunda familia; porque aceptémoslo, nos vimos las caras por más horas de las que veíamos a nuestras familias. Muchas gracias por todo.

A los restantes miembros del BL-201: **Analí Díaz, Oscar Urrego, Israela Balderas, Perla Moreno, Kioko Guzmán, Daniel Osorio, Lorelei, Julio César, Rodrigo Pérez, Andrés, Raymundo e Inés**, por aguantar mis preguntas y necesidades en los seminarios, así también agradezco las preguntas que hacían cuando me tocaba estar al frente porque ayudó a enfocarme.

A la **Dra. María de Lourdes Massieu Trigo**, miembro del comité tutorial, por las observaciones que hizo al proyecto que ayudaron a pulirlo, además por la disposición y amabilidad mostrada cuando la visitaba en su laboratorio.

Al **Dr. Ernesto Soto Reyes Solís**, por todo el apoyo recibido para la realización de los experimentos que en tu ausencia hubiese sido difícil llevarlos a cabo. Me mostraste metodologías de las cuales nunca había tenido contacto, me recordaste la importancia de diseñar, organizar, pero sobre todo entender el experimento antes de hacerlo. Gracias por las observaciones al proyecto en tu papel de miembro del comité tutor, también por las palabras de ánimo que recibía cada vez que terminaba el examen tutorial. Muchas, muchas gracias.

Agradezco también a dos miembros del laboratorio de Carcinogénesis del INCan, a **Lissania Guerra e Iliana Alcalá** porque invirtieron su valioso tiempo en apoyarme para los experimentos que realicé en sus áreas de trabajo, además de mostrar siempre disposición en resolver mis dudas, muchas gracias.

...A todos ustedes, mi eterno agradecimiento...

“Todo tiene su tiempo y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora”
Eclesiastés 3, 1

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	A
ABREVIATURAS.....	B
RESUMEN	C
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aprendizaje y memoria.....	1
1.2 Mecanismos moleculares y celulares del aprendizaje y la memoria.	3
1.3 Modificaciones sobre la cromatina debidas al aprendizaje y la memoria ...	5
1.4 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF).	7
1.5 Modelos conductuales para el análisis de la memoria.	9
1.6 Envejecimiento.....	12
1.7 Inhibidores de las desacetilasas de histona y mejora cognitiva.	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo general:	20
4.2 Objetivos particulares:.....	20
5. DIAGRAMAS DE TRABAJO.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Sujetos experimentales.....	22
6.2 Cirugía estereotáxica.	22
6.3 Evaluación conductual: Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS).	22
6.4 Evaluación conductual: Memoria de Reconocimiento de Objetos (ORM). 24	
6.5 Conducta para la estimulación ante un sabor novedoso.....	25
6.6 Técnica de inmunohistoquímica y análisis de cantidad de fibras.	26
6.7 Evaluación conductual del CAS para el análisis de la expresión de mRNAs.	27
6.8 Extracción de RNA por el método de TRIzol.....	27
6.9 Gel para cuantificación de pureza de RNA.	28

6.10	Obtención de cDNA.	29
6.11	PCR en tiempo real para la cuantificación de cDNA.	30
6.12	Análisis estadístico.	31
7.	RESULTADOS.	32
7.1	Determinación del sitio de canulación.	32
7.2	La inhibición de la HDAC1 retrasa la extinción del CAS.	32
7.3	La inhibición de HDAC1 mejora la memoria de reconocimiento.	37
7.4	La inhibición de la HDAC1 no modifica la cantidad de fibras positivas a tirosina hidroxilasa en la corteza insular.	39
7.5	La inhibición de HDAC1 no altera la expresión de mRNA de <i>Bdnf</i> y <i>Th</i> . .	41
8.	DISCUSIÓN.....	42
9.	CONCLUSIONES.....	47
10.	REFERENCIAS.....	48
11.	ANEXOS.....	52
11.1	Estandarización de condiciones para PCR.....	52
11.2	Constancias.....	55
11.3	Congresos.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Comunicación neuronal y plasticidad	4
Figura 1.2. Equilibrio de acetilación-desacetilación de histonas.....	7
Figura 1.3. Aprendizaje gustativo como modelo de evaluación cognitiva	10
Figura 1.4. Participación de estructuras cerebrales en la memoria de reconocimiento	11
Figura 1.5. Cambios morfológicos y eléctricos debidos al envejecimiento.....	13
Figura 1.6. Disminución de marcadores de neurotransmisión asociados al envejecimiento	13
Figura 1.7. Alteraciones cognitivas debidas al envejecimiento.....	14
Figura 1.8. Modificaciones en la actividad de HDACs asociadas al envejecimiento	16
Figura 1.9. La inhibición de HDAC1 estabiliza la memoria.....	17
Figura 1.10. Efecto de la inhibición de HDAC1 sobre la inducción de LTP en el animal anestesiado	18
Figura 5.1. Diagrama de trabajo para el análisis conductual.....	21
Figura 5.2. Diagrama de trabajo para el análisis de expresión génica	21
Figura 7.1. Determinación del sitio de canulación	32
Figura 7.2. Aversión condicionada al sabor (CAS).....	33
Figura 7.3. La inhibición de la HDAC1 atenúa la preferencia por el sabor novedoso en animales envejecidos	33
Figura 7.4. La inhibición de la HDAC1 afecta la memoria de largo plazo de manera dependiente de la edad y de la intensidad del estímulo	34
Figura 7.5. La inhibición de la HDAC1 retrasa la extinción del CAS	36
Figura 7.6. Memoria de reconocimiento de objetos (ORM).....	38
Figura 7.7. La inhibición de la HDAC1 modifica la memoria de reconocimiento de manera dependiente de la edad.....	38
Figura 7.8. La inhibición de la HDAC1 no modifica la cantidad de fibras positivas a tirosina hidroxilasa en la corteza insular de animales viejos	40
Figura 7.9. La inhibición de la HDAC1 no modifica la expresión de <i>Bdnf</i> y <i>Th</i> a las 4 h post-adquisición	41
Figura 11.1. Estandarización de oligonucleótidos	53
Figura 11.2. Realización de qPCR en ratón intacto joven	54

ABREVIATURAS

BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
BLA	Amígdala basolateral
CAS	Condicionamiento aversivo al sabor
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
HDAC	Desacetilasa de histona
HDACi	Inhibidor (es) de las desacetilasas de histona
IC	Corteza insular
LTM	Memoria de largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
LTD	Depresión a largo plazo
ORM	Memoria de reconocimiento de objetos
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
STM	Memoria de corto plazo
TH	Tirosina Hidroxilasa

RESUMEN

Efecto de la inhibición de la desacetilasa de histona sobre la memoria de largo plazo

El aprendizaje y la memoria son procesos conjuntos para la adquisición, almacenamiento y recuperación de la información por el sistema nervioso central. El establecimiento de la memoria de largo plazo es conocido como consolidación, y en este proceso es de suma importancia la síntesis de proteínas como consecuencia de los cambios plásticos que suceden por estimulación del ambiente facilitando la comunicación celular. En diversos estados fisiológicos y patológicos existen alteraciones cognitivas que muchas veces son producto de las deficiencias en la consolidación de la memoria. Una etapa fisiológica en la que ocurren estas modificaciones es en el envejecimiento. El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de manera heterogénea a las células del cuerpo ocasionando alteraciones morfológicas y funcionales. La característica general del envejecimiento sobre el sistema nervioso es el deterioro gradual de las funciones cognitivas consecuencia de deficiencias en la función sináptica de regiones cerebrales importantes para la formación de la memoria.

La regulación epigenética incluyendo la acetilación de histonas, que es ocasionada por la comunicación neuronal a través de la neurotransmisión principalmente de tipo excitatoria, juega un papel importante en la consolidación de la memoria. Se ha observado que en el envejecimiento existe incremento en la actividad de las desacetilasas de histona que se traduce en una disminución en la expresión génica, hecho que está relacionado a las deficiencias cognitivas observadas en esta etapa fisiológica. Reportes de investigación muestran que el empleo de inhibidores inespecíficos de las desacetilasas de histona potencian la consolidación de la memoria en tareas dependientes de hipocampo y además evitan las alteraciones relacionadas al envejecimiento. A pesar de esto, poco se sabe sobre la participación de desacetilasas de histona específicas en el aprendizaje y la memoria, así como el efecto de la inhibición en estructuras diferentes a hipocampo, como lo es la corteza.

En el presente proyecto se evaluó el efecto de la inhibición de la HDAC1 mediante la microinyección del inhibidor MS-275 en la corteza insular en animales jóvenes (2-3 m) y viejos (15-16 m) y en dos tareas de memoria dependientes de esta estructura cerebral: memorias gustativa y de reconocimiento de objetos.

Los resultados fueron sorprendentes, pues al parecer existen efectos diferenciales de la HDAC1 dependientes de la edad, en el establecimiento de la memoria. Es decir, el bloqueo de esta enzima en animales jóvenes evita la formación de la memoria, mientras que en animales viejos ocurre el evento opuesto, una mejora en las capacidades de formación de las memorias analizadas con respecto a sus controles. Parte de los resultados conductuales obtenidos fueron inesperados, además de que el único tiempo elegido para la determinación de activación génica (*Th*, *Bdnf*) no permitió la correlación con la conducta, por lo que el análisis temporal ayudaría a resolver la verdadera participación de estos productos génicos en la consolidación de la memoria.



Efecto de inhibición de la desacetilasa de histona sobre la memoria de largo plazo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aprendizaje y memoria.

El aprendizaje y la memoria son el medio de adaptación de los seres vivos a las modificaciones del ambiente, por ello se relacionan a la evolución. Se define al **aprendizaje** como la adquisición de nueva información, mientras que la **memoria** es la retención, manipulación y recuperación de la información adquirida (Kandel y Pittenger, 1999; Morgado, 2005).

La memoria puede clasificarse de acuerdo a la duración en memoria de corto y de largo plazo. La **memoria de corto plazo** (STM, *short-term memory*) es la retención de la información durante un tiempo breve y se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares de las redes neuronales implicadas que, dependiendo al estímulo, pueden generar cambios persistentes y llevar a un proceso denominado **consolidación de la memoria** que se evidencia por la síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales. El objetivo de la consolidación es establecer la **memoria de largo plazo** (LTM, *long-term memory*) basada en cambios persistentes, por ejemplo la formación de nuevas espinas dendríticas, aumento en el número de vesículas o de terminales presinápticas (Kandel y Pittenger, 1999; Morgado, 2005).

A través de los estudios, se ha clasificado a la memoria en explícita e implícita. La **memoria explícita** puede ser subdividida en **episódica** (autobiográfica o eventos) y **semántica** (hechos). La memoria explícita se puede formar a través de uno o pocos ensayos y las áreas cerebrales relacionadas al dominio de este tipo de memoria son estructuras del lóbulo temporal, entre las que destacan el hipocampo y la corteza. Para la **memoria implícita** participan diferentes áreas cerebrales como el estriado dorsal (hábitos), el estriado ventral y el núcleo accumbens (condicionamiento operante), el cerebelo (habilidades motoras) y la amígdala (memoria de emociones); áreas que a pesar de tener una mayor participación, no son las únicas que intervienen en los procesos mencionados. La sub-clasificación de la memoria implícita es asociativa y no



asociativa. En la **memoria no asociativa**, el sujeto aprende sobre las propiedades de un solo estímulo, ocurriendo una **habituación** cuando se reconoce al estímulo como inocuo; o **sensibilización** si el estímulo es aversivo o atenta contra la integridad del sujeto, incrementándose la respuesta defensiva o de escape hacia el estímulo presentado (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2008; Kandel y Pittenger, 1999; Morgado, 2005).

La **memoria asociativa** se genera cuando el sujeto aprende la relación entre dos estímulos o entre un comportamiento y un estímulo. Este tipo de memoria tiene el potencial de crear asociaciones casi infinitas (Cardinal *et al.*, 2002). En esta clasificación se encuentra el **condicionamiento operante** o instrumental, que se basa en la relación entre un comportamiento y un estímulo de recompensa o castigo. También se ubica el **condicionamiento clásico** o Pavloviano, denominado así en honor a Iván Pavlov quien lo descubrió y describió (Kandel y Pittenger, 1999).

El condicionamiento clásico tiene como característica la presentación de dos estímulos, uno denominado **estímulo condicionado** o neutro (EC) que produce una respuesta considerada irrelevante; el segundo es el **estímulo incondicionado** (EI) biológicamente relevante y genera una **respuesta incondicionada** (RI). En el condicionamiento se presentan ambos estímulos, produciéndose una asociación, como resultado cuando se presenta sólo el EC se genera una respuesta, considerada refleja, que se denomina **respuesta condicionada** (RC); (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2008; Cardinal *et al.*, 2002; Kandel y Pittenger, 1999; Morgado, 2005).

En el condicionamiento clásico se forman memorias de tipo causa-efecto, surgidos de la asociación del EC con el EI, de tal forma que al presentar al EC, éste predice al EI, teniendo alto valor adaptativo. Si se considera la situación donde el EC no predice al EI, se induce a los sistemas de memoria a “deshacer” la asociación ya establecida por medio de la extinción, la cual no debe ser confundida con el olvido. De acuerdo a experimentos, la **extinción** parece ser un nuevo trazo de memoria que “compite” con la memoria original para ser expresada y se genera como respuesta a una nueva contingencia; es decir, una vez



condicionado al sujeto experimental, si se le presenta repetidamente el EC y este no es seguido del EI, se genera extinción:

Condicionamiento (aprendizaje): $EC^+ + EI^+ \rightarrow RI$ - - - - - $EC \rightarrow RC$

Extinción (re-aprendizaje): $EC^+ + EI^- \rightarrow RC$ - - - - - $EC \rightarrow$ nueva RC

Donde “+” es presente y “-” es ausente. Esto indica que durante la extinción el sujeto aprende que el EI ya no ocurre después del EC

Los procesos de aprendizaje y memoria se han relacionado a componentes celulares y moleculares, los cuales se describirán brevemente.

1.2 Mecanismos moleculares y celulares del aprendizaje y la memoria.

La comunicación entre neuronas se modifica en respuesta a la frecuencia e intensidad; esta propiedad se denomina **plasticidad sináptica** (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2008). El mecanismo propuesto para la memoria de corto plazo se basa en cambios de tipo covalente que optimizan la comunicación neuronal, al mantenerse esta situación se genera consolidación de la memoria. Por estudios eléctricos se sabe que si una neurona es estimulada a altas frecuencias se genera potenciación a largo plazo (*long term potentiation*, LTP), esta LTP se relaciona con el aprendizaje, mientras que el mantenimiento de la LTP a la formación de la memoria que requiere la síntesis de proteínas, entre las que se incluyen receptores celulares y proteínas de citoesqueleto. El modelo propuesto para la formación de la memoria se ilustra en la **figura 1.1**. La alteración de alguno de estos puntos del proceso modifica los procesos del aprendizaje y la memoria (Barco *et al.*, 2006).

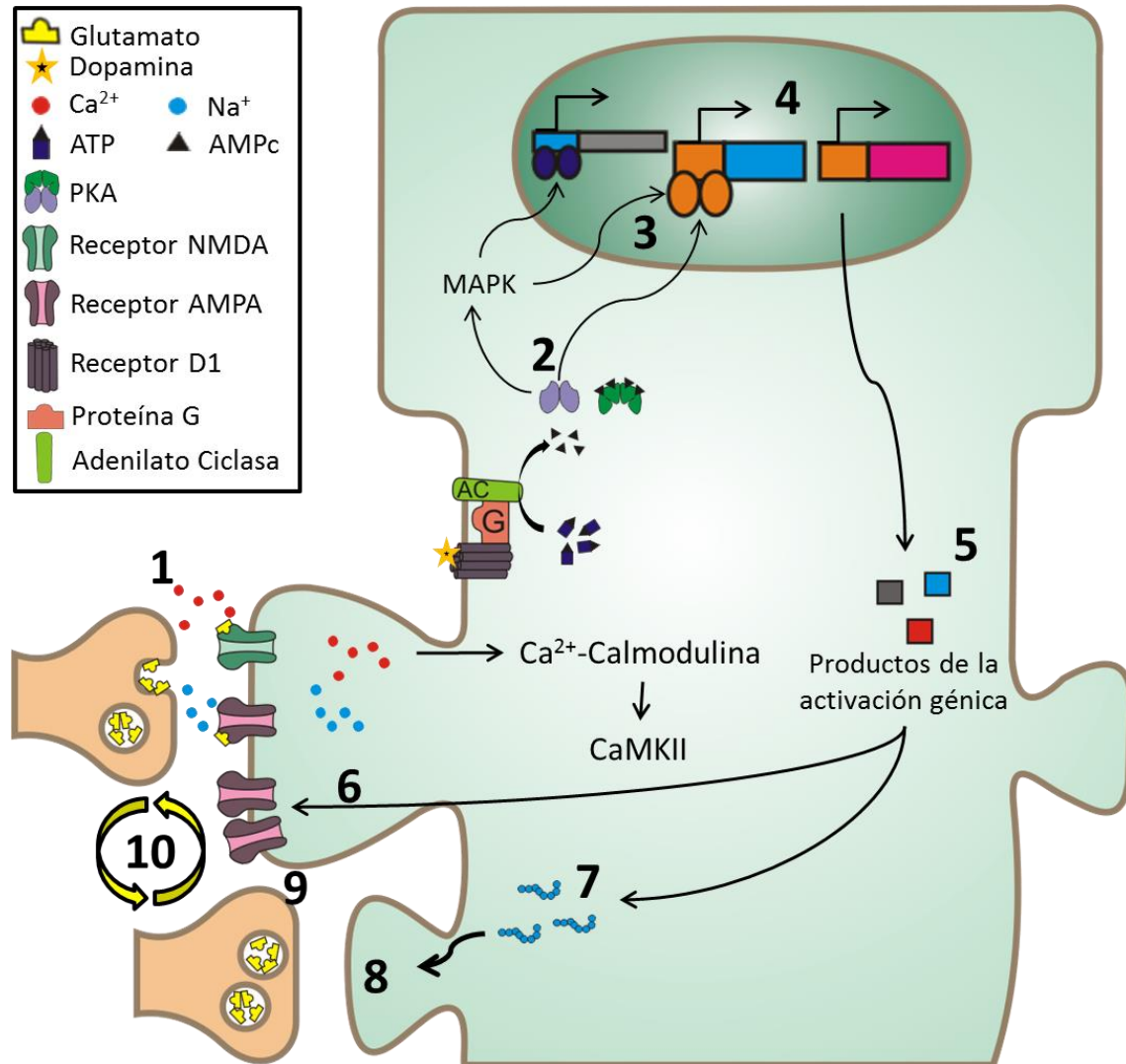


Figura 1.1. Comunicación neuronal y plasticidad. Se han identificado 11 puntos para la formación de la memoria. 1) Liberación de neurotransmisor y fortalecimiento de comunicación (memoria de corto plazo); 2) equilibrio entre cinasas y fosfatasas; 3) transporte retrógrado de la información de la sinapsis al núcleo; 4) activación de factores de transcripción, modificación de cromatina y expresión de genes; 5) generación de productos de la activación; 6) llegada a la sinapsis de productos génicos; 7) síntesis local de proteínas en sinapsis activas; 8) formación y crecimiento de nuevas sinapsis; 9) activación de sinapsis silenciosas preexistentes y 10) mecanismos de perpetuación y persistencia de la memoria. Ca^{2+} /calmodulina proteína cinasa II (CaMKII); Proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK); Proteína cinasa A (PKA). (Modificado de Barco *et al.*, 2006).

Estudios posteriores mostraron que lo ocurrido en núcleo es aún más complejo de lo que se creía, ya que se observó que a este nivel existen diferentes modificaciones sobre la cromatina.



1.3 Modificaciones sobre la cromatina debidas al aprendizaje y la memoria

La epigenética es definida como los cambios heredados por mitosis o meiosis en la funcionalidad de un gen que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del DNA. Una definición más amplia propone que la epigenética es la adaptación estructural de regiones cromosómicas para registrar, señalar o perpetuar estados de actividad alterados (Bird, 2007).

Las modificaciones epigenéticas pueden dividirse en tres grandes grupos que tienen relación entre ellos: 1) metilación del DNA, 2) modificaciones covalentes de histonas y 3) RNA no codificantes. Éstas han sido relacionadas a diversos estados fisiológicos y patológicos.

En el núcleo, el DNA está empaquetado formando cromatina, las unidades repetidas son los nucleosomas, que consisten en DNA que envuelve al octámero de histonas (2 copias de cada una de las siguientes: H2A, H2B, H3 y H4). Una de las modificaciones que ha llamado la atención es la acetilación de histonas, proceso relacionado a la activación de genes. La acetilación de histonas está catalizada por las acetiltransferasas de histona (HATs) que utilizan acetil-CoA como donador de grupos acetilo. Esta acetilación ocasiona un cambio en las cargas, produciéndose cargas negativas en las histonas, con lo que se repelen con el DNA, ocasionando así la apertura de la cromatina y por ende favoreciendo la unión de los factores de transcripción y promoviendo así la transcripción, **figura 1.2**. Las enzimas que remueven o eliminan los grupos acetilo de las histonas son las desacetilasas de histona (HDAC) que pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: 1) zinc dependientes y 2) NAD dependientes. Las HDAC se agrupan por la homología en secuencia en clase I (HDAC1-3 y 8), clase II (HDAC4-7, 9 y 10), clase III (Sirtuinas 1-7), clase IV (HDAC11); siendo las clases I, II y IV zinc dependientes, mientras que las de clase III son NAD dependientes (Baltan *et al.*, 2011; Choi y Howe, 2009).

Los estudios dirigidos a analizar las vías de señalización asociadas a la memoria muestran que uno de los principales puentes entre la información recibida en la sinapsis y la respuesta nuclear es por la actividad de MAPK,



concretamente debidas a la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) que a su vez activa a las cinasas de serina-treonina o a la proteína cinasa activada por estrés o mitógeno (RSK2/MSK), las cuales a nivel nuclear ocasionarán la activación de factores de transcripción como el elemento de unión de respuesta a AMPc (CREB) y Elk1. La activación de estos factores de transcripción ocasiona el reclutamiento de HATs (como CBP y p300) que acetilan histonas y por lo tanto relajan la cromatina. Una enzima importante en la regulación del proceso es la fosfatasa de MAPK 3 (MKP-3) cuyo blanco es ERK desactivándolo y regulando así la activación génica. Otro factor importante en la regulación es la actividad que tienen las HDACs sobre las regiones amino-terminales de las histonas, cuya finalidad es favorecer la compactación de la cromatina, **figura 1.2** (Day y Sweatt, 2011).

De esta manera, la regulación fina del proceso dinámico acetilación-desacetilación de histonas es importante en el aprendizaje y la memoria, hecho que es necesario para la expresión génica asociada a la consolidación de la memoria (Beldjoud *et al.*, 2015; Levenson *et al.*, 2004; Swank y Sweatt, 2001).

Un factor, además de los previamente descritos, que contribuye al proceso del aprendizaje y la memoria es la presencia de factores de crecimiento (Beckinschtein *et al.*, 2008; Wetzell *et al.*, 2015), los cuales regulan diversos procesos celulares. En seguida se describen brevemente las características de uno de los factores neurotróficos más importantes, el factor neurotrófico derivado del cerebro.

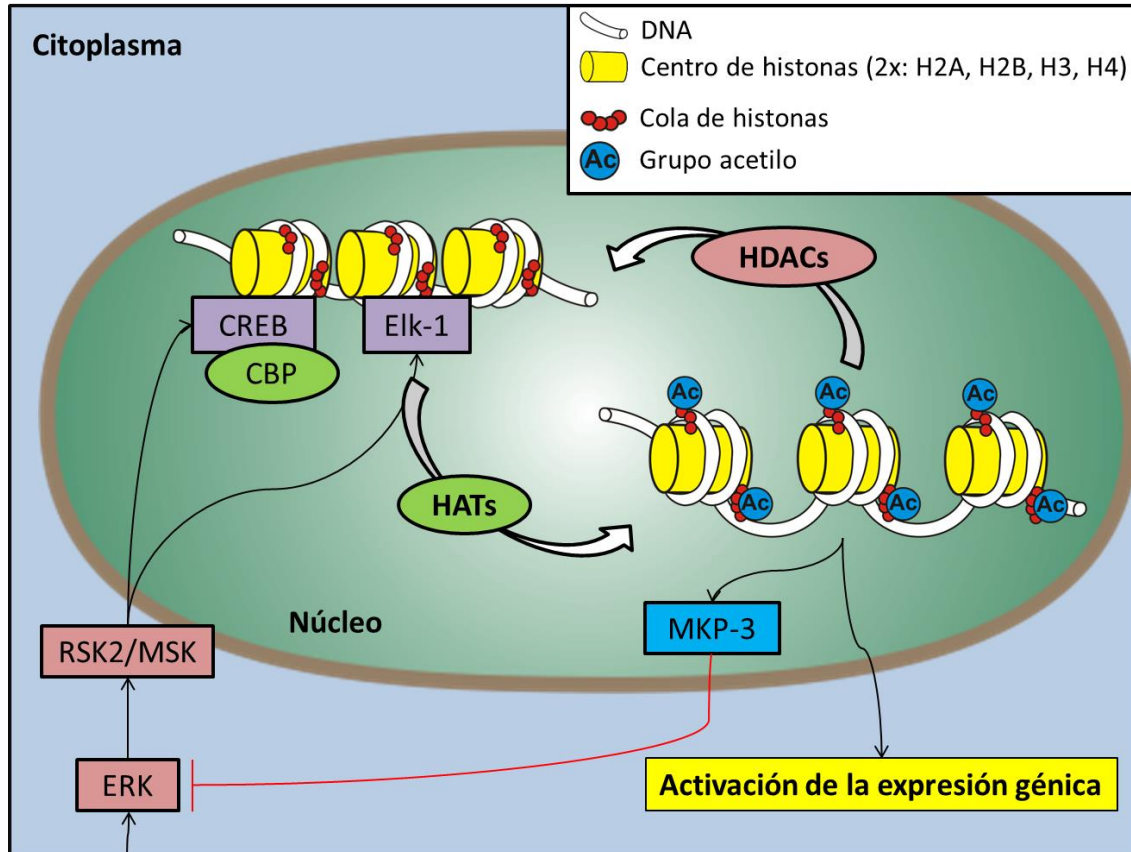


Figura 1.2. Equilibrio de acetilación-desacetilación de histonas. Las modificaciones a nivel nuclear llegan a través de la activación de ERK, que a su vez activa a RSK2 o a MSK, éstos a su vez activan a los factores de transcripción CREB o Elk-1, los cuales reclutan a HATs como CBP o p300 que añaden grupos acetilo a las regiones amino-terminales de las histonas, este evento tiene como consecuencia la descompactación de la cromatina y el favorecimiento de la expresión génica. La regulación de esta vía de señalización es mediada por MKP-3, fosfatasa cuyo blanco es ERK que al desfosforilarlo disminuye esta señal. El proceso de desacetilación es realizado por el reclutamiento y activación de HDACs que ocasionan compactación de la cromatina y con ello silenciamiento génico (modificado de Day y Sweat, 2011).

1.4 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF).

Los factores de crecimiento son proteínas que regulan varios aspectos de la función celular en que se incluyen la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación. En el sistema nervioso, los factores de crecimiento son referidos como factores neurotróficos, entre los que se encuentra el factor de crecimiento derivado del cerebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF; Friedman, 2012).

El gen de *Bdnf* se localiza en el cromosoma 2 en el ratón (en el humano en el cromosoma 11) codifica para la generación de 11 isoformas de mRNA (I, IIA, IIB, IIC, III, IV, V, VI, VII, VIII, IXA) y se encuentra distribuido de manera importante en



el sistema nervioso central, entre otras estructuras se encuentra en regiones importantes para la memoria: hipocampo y corteza (Aid *et al.*, 2007).

El BDNF es una proteína no glicosilada de 119 aa, sin embargo este deriva de la proteólisis (por furina o plasmina) de un polipéptido aún mayor, el proBDNF de 247 aa (en Andero *et al.*, 2014; Barker, 2009).

La importancia del BDNF en el sistema nervioso es debida a su participación en la modulación del crecimiento y ramificación axonal y dendrítico, mantenimiento de la sinapsis, en la neurotransmisión y la plasticidad sináptica, regulando así la función y viabilidad neuronal (en Andero *et al.*, 2014; Gorski *et al.*, 2003).

La participación del BDNF en el aprendizaje y la memoria ha sido demostrada en diversos trabajos, los cuales concluyen que el desequilibrio de este factor ocasiona alteraciones en el aprendizaje y la memoria; es decir el bloqueo o deficiencia, así como el exceso de BDNF afectan al sistema de manera negativa (Bekinschtein *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009; Papaleo *et al.*, 2011).

En diversos modelos de aprendizaje y memoria, que se describirán más adelante, se ha observado que el BDNF incrementa su expresión posterior a la adquisición de dicho aprendizaje, así también se ha mostrado la importancia de este factor durante el proceso de extinción en diversas estructuras cerebrales, además que es importante para la estabilización de la memoria (Castillo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2011; Mizuno *et al.*, 2000; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2014). El comportamiento de este factor neurotrófico lo hace uno de los mejores candidatos asociados a los procesos complejos del aprendizaje y la memoria.

El análisis de la memoria ha podido realizarse gracias a diferentes estrategias experimentales que permiten observar el cambio en el comportamiento de los animales. A continuación se describirán brevemente los modelos conductuales que se emplearon en el presente proyecto.



1.5 Modelos conductuales para el análisis de la memoria.

Los estudios del aprendizaje y la memoria han permitido conocer aspectos variados de estos procesos; esto ha sido posible por el desarrollo de modelos conductuales.

Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS). Este modelo, también denominado aversión condicionada al sabor (*conditioned taste aversión, CTA*), permite al sujeto adaptarse al medio para evitar sustancias tóxicas y sobrevivir. Los animales aprenden a preferir alimentos con efectos positivos post-ingesta y evitar aquellos con efectos negativos post-ingesta (Yamamoto y Ueji, 2011). Cuando un estímulo gustativo (EC) es novedoso para el sujeto, éste es cauteloso y tiene poca ingesta del EC; a este evento se le denomina **neofobia**. La información gustativa se almacena hasta realizar una asociación con un valor hedónico. Las sustancias tóxicas (EI, v.g. LiCl) pueden producir malestar gastrointestinal (RI), asociándose al EC y con ello adquiere un valor hedónico negativo. De esta manera, cuando se vuelve a presentar el sabor, ocurre disminución en su ingesta, entendiéndose como aversión (RC), **figura 1.3**. Esta forma de aprendizaje es el denominado “efecto García”, CAS o CTA (Bermúdez-Rattoni, 2004; Reilly y Bornovalova, 2005, Yamamoto y Ueji, 2011). Las estructuras cerebrales que participan en esta memoria son numerosas pero dos que han sido ampliamente estudiadas son la amígdala basolateral (BLA) y la corteza insular (IC; Bermúdez-Rattoni, 2004).

En estudios electrofisiológicos se muestra que la inducción de LTP de la vía BLA-IC antes del condicionamiento afecta el CAS, de tal forma que ocasiona retraso en el proceso de extinción (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000), de manera inversa el CAS evita la generación de LTP en la vía BLA-IC (Rodríguez-Durán *et al.*, 2011); todo esto sugiere que la comunicación entre estas dos áreas cerebrales es específica y juega un papel importante en la consolidación del CAS.

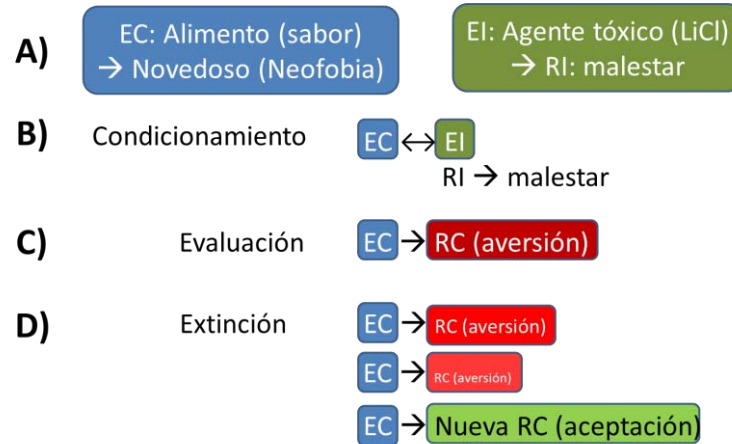


Figura 1.3. Aprendizaje gustativo como modelo de evaluación cognitiva. El aprendizaje gustativo emplea la presentación (A) de un alimento novedoso como estímulo condicionado (EC) y un agente tóxico como estímulo incondicionado (EI) que genera malestar como respuesta incondicionada (RI). En el condicionamiento, ambos estímulos se asocian (B), observándose sólo la RI. En la evaluación de la memoria de largo plazo (C) únicamente se presenta el EC y se observa aversión como respuesta condicionada (RC). En la extinción se presenta nuevamente el EC y paulatinamente decrece la RC hasta observar una nueva RC que es aceptación (E). (A partir de la descripción textual de Bermúdez-Rattoni, 2004; Reilly y Bornovalova, 2005; Yamamoto y Ueji, 2011; adaptado según el esquema de Cardinal *et al.*, 2002).

Memoria de reconocimiento de objetos (*object recognition memory, ORM*). Esta tarea se ha descrito como la habilidad de conocer algo previamente experimentado (un estímulo o todo un acontecimiento). Este tipo de memoria tiene al menos dos componentes: uno es la discriminación de la familiaridad del estímulo y el otro es la parte contextual (espacial o temporal). Una parte importante de este modelo conductual es la **novedad**, que es entendida como la alteración de lo esperado que está basado en la información previa. Este modelo conductual aprovecha el comportamiento exploratorio innato del roedor, además que no requiere de manipulaciones externas, reforzadores o castigos, simplemente se necesita de una habituación previa que puede realizarse en un periodo relativamente corto (Antunes and Biala 2012; en Balderas *et al.*, 2015).

Este modelo conductual consiste de tres fases: habituación, familiarización y prueba. En la primera fase se busca que el animal se habitúe a la caja ya que un contexto novedoso genera estrés, además la habituación favorecerá la exploración del animal hacia los objetos disminuyendo drásticamente la exploración del contexto. En la etapa de familiarización o adquisición se le presentan al sujeto



experimental dos objetos idénticos (A + A) para que los explore, esperando que el tiempo de exploración de cada objeto sea aproximadamente el mismo. En la fase de prueba o evaluación de la memoria se mantiene uno de los objetos previos y se le presenta un objeto nuevo (A + B) en la posición que ocupaba el anterior, de esta manera el animal que haya aprendido explorará durante más tiempo al objeto novedoso (Antunes y Biala, 2012).

En este tipo de memoria participan diferentes estructuras del lóbulo temporal, pero principalmente destaca la corteza perirrinal y la IC, **figura 1.4** (Balderas *et al.*, 2008). Un reporte reciente sugiere que la actividad de BLA modifica la activación de la IC para mejorar la consolidación de la memoria de reconocimiento, lo cual nuevamente evidencia la importancia de la comunicación entre BLA y IC (Beldjoud *et al.*, 2015).

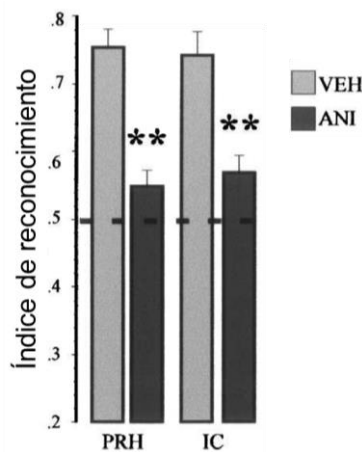


Figura 1.4. Participación de estructuras cerebrales en la memoria de reconocimiento. Posterior a la etapa de familiarización se inhibió la síntesis de proteínas en corteza perirrinal (PRH) o corteza insular (IC). Cuando se evaluó la memoria de largo plazo se observó que los sujetos experimentales no son capaces de reconocer al objeto novedoso. Esto no ocurre al bloquear la síntesis proteica en otras áreas cerebrales del lóbulo temporal. Vehículo (VEH), Anisomicina (ANI). (Tomado y modificado de Balderas *et al.* 2008).

Estos modelos conductuales han permitido evaluar cómo están afectados el aprendizaje y la memoria en diversos estados fisiológicos o patológicos. Una etapa ampliamente estudiada en la que se observan alteraciones en la memoria es el envejecimiento.



1.6 Envejecimiento.

El envejecimiento es una etapa fisiológica considerada como un fenómeno emergente debido al incremento en la esperanza de vida de los individuos. Se trata de un proceso irreversible que afecta de forma heterogénea a las células que conforman a los seres vivos, las cuales con el paso del tiempo se ven sometidas a un deterioro progresivo morfofuncional, debido a fallos en la homeostasis y acumulación de daño que puede conducir las a la muerte. (Peinado *et al.*, 2000; Rattan, 2004).

Durante el envejecimiento, en el cerebro ocurren cambios como la disminución del tamaño neuronal en regiones como el hipocampo y la corteza, también hay reducción de espinas dendríticas asociadas al incremento en la inflamación y generación de estrés oxidativo; estos cambios se han observado en diferentes especies animales incluido el hombre (Burke y Barnes, 2006; De Brabander *et al.*, 1998; Dickstein *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2003; Richwine *et al.*, 2008). Estas modificaciones en la morfología neuronal indican alteraciones en la eficiencia de la comunicación entre las neuronas, lo cual es evidente cuando se realizan análisis electrofisiológicos de LTP. En animales envejecidos existe disminución en la LTP comparado con animales jóvenes, lo cual se asocia directamente a las modificaciones morfológicas, **figura 1.5** (McGahon *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1993).

Aunado a las modificaciones morfológicas y eléctricas se han observado alteraciones en los sistemas de neurotransmisión, por ejemplo la disminución de marcadores catecolaminérgicos como la expresión de tirosina hidroxilasa en el cerebro medio (Dickerson *et al.*, 2009) e incluso reducción en los neurotransmisores como la dopamina y noradrenalina en diferentes regiones en donde se incluye la corteza cerebral, **figura 1.6** (Arivazhagan y Panneerselvam, 2002).

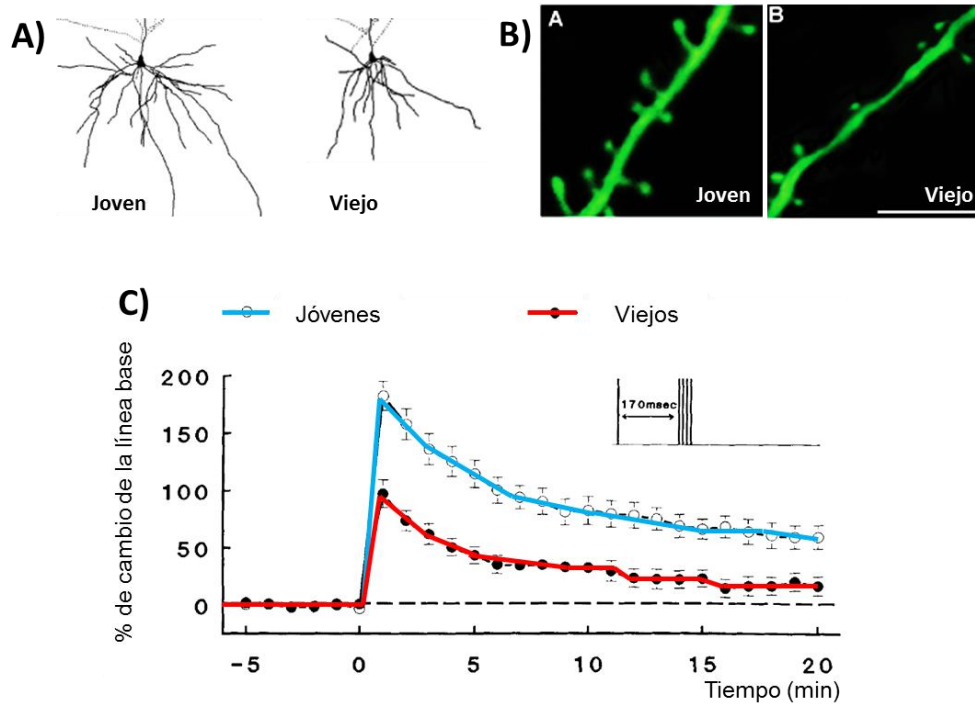


Figura 1.5. Cambios morfológicos y eléctricos debidos al envejecimiento. En A se presentan neuronas representativas de la corteza cerebral de humano, mostrando una disminución evidente en la arborización dendrítica en sujetos envejecidos. En B se observa disminución en la densidad de espinas dendríticas de neuronas corticales de ratas envejecidas. En C se muestra una disminución en el mantenimiento de LTP del grupo envejecido (A tomado y modificado de Brabander *et al.*, 1998; B Duan *et al.*, 2003 citado en Dickstein *et al.*, 2007; C tomado y modificado de Moore *et al.*, 1993).

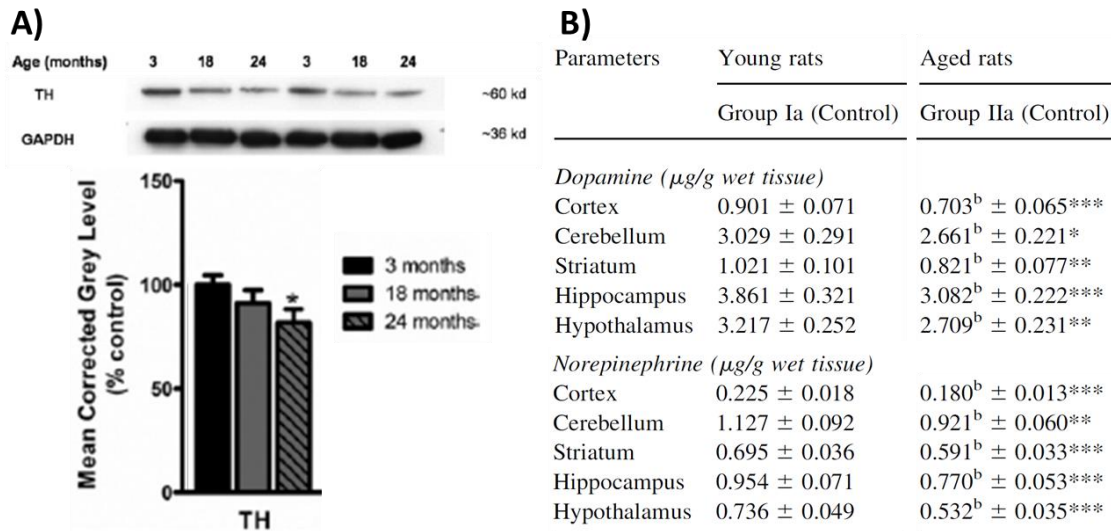


Figura 1.6. Disminución de marcadores de neurotransmisión asociados al envejecimiento. A) Los niveles de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) se encuentran disminuidos en la zona ventral del mesencéfalo de ratas envejecidas. B) Los niveles de catecolaminas están disminuidos en animales viejos en diversas zonas cerebrales (A tomado y modificado de Dickerson *et al.*, 2009; B tomado y modificado de Arivazhagan y Panneerselvam, 2002).



Existe controversia respecto a los niveles de BDNF en el cerebro ya que algunas investigaciones no muestran diferencia en animales envejecidos, mientras que otras muestran disminución significativa en los niveles de esta neurotrofina, un comportamiento similar es mostrado por el receptor de alta afinidad (TrkB; Cattelan *et al.*, 2015; Silhol *et al.*, 2005, 2007).

Todos estos cambios pueden ser los responsables de las deficiencias observadas en la conducta, ya que animales envejecidos presentan alteración en la memoria de reconocimiento, así como la memoria de miedo comparado con animales jóvenes, **figura 1.7** (Bennett *et al.*, 2006; Burke *et al.*, 2010; Peleg *et al.*, 2010). Si se analizan estos resultados en conjunto indican que los sistemas asociados a estos dos grandes tipos de memoria (implícita –miedo condicionado- y explícita –reconocimiento-) están afectados, bloqueando el adecuado establecimiento de la memoria.

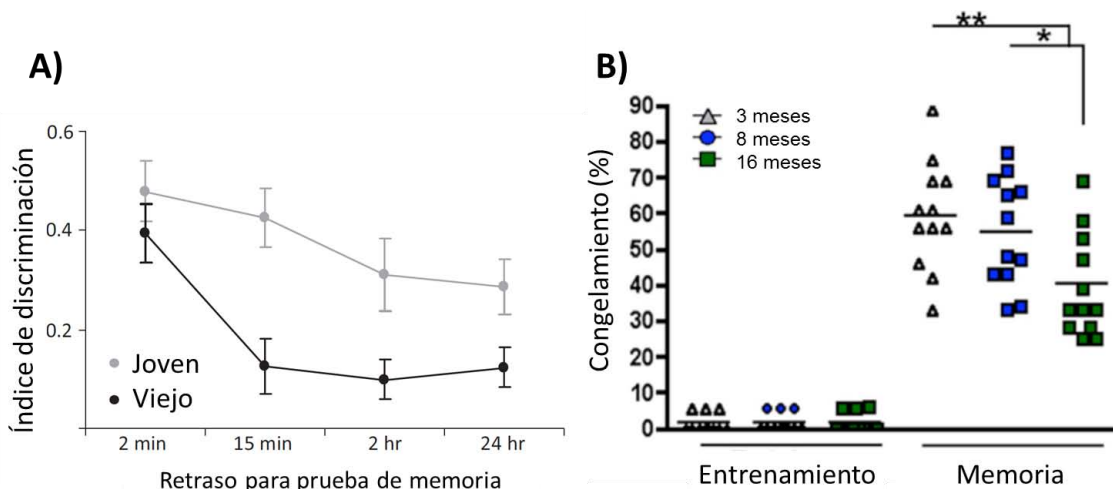


Figura 1.7. Alteraciones cognitivas debidas al envejecimiento. A) Existen deficiencias en la memoria de reconocimiento de animales envejecidos, mostrado como una disminución en el índice de reconocimiento del objeto novedoso. Se evaluó memoria de corto plazo (15 min y 2 h) y memoria de largo plazo (24 h). B) Deficiencias en la memoria de miedo en animales envejecidos. Se evidencia por la disminución en el porcentaje de congelamiento evaluado a las 24 h post-entrenamiento. (A tomada y modificada de Burke *et al.*, 2010; B tomada y modificada de Peleg *et al.*, 2010).

Los estudios para paliar las deficiencias asociadas al envejecimiento han sido variadas, se ha realizado análisis del incremento ligero de estrés (choque térmico, radiación, metales pesados, pro-oxidantes, alcoholes, cámaras



hiperbáricas, ejercicio y restricción calórica), tratamientos hormonales, medios enriquecidos (Bennet *et al.*, 2006; Patel, 2012; en Rattan, 2004) entre muchos otros, mostrando mejora sobre el envejecimiento.

En estas aproximaciones también se han evaluado fármacos que afectan el estado de la cromatina, concretamente se han empleado inhibidores de las desacetilasas de histona (HDACi), que presentan efectos semejantes a los de medios enriquecidos (Patel, 2012).

1.7 Inhibidores de las desacetilasas de histona y mejora cognitiva.

Durante el proceso de aprendizaje ocurren modificaciones a nivel nuclear para la expresión adecuada de proteínas asociadas al mantenimiento de la memoria, se ha observado que existen modificaciones en los niveles de acetilación de histonas debidas al aprendizaje (Dagnas and Mons, 2013; Peleg *et al.*, 2010). En el envejecimiento se han reportado incrementos importantes en la actividad de las HDACs lo cual repercute en la memoria de animales envejecidos, **figura 1.8A** (Dos Santos *et al.*, 2013).

Este incremento en la actividad de las HDACs tiene sus consecuencias naturales, ya que en animales viejos se ha observado que posterior a un aprendizaje existe reducción en la acetilación de histonas, hecho que se relaciona con deficiencias en la memoria, **figura 1.8B** (Peleg *et al.*, 2010). Por ello se ha propuesto que el empleo de inhibidores de las desacetilasas de histona (HDACi) mejora las deficiencias cognitivas de animales envejecidos.

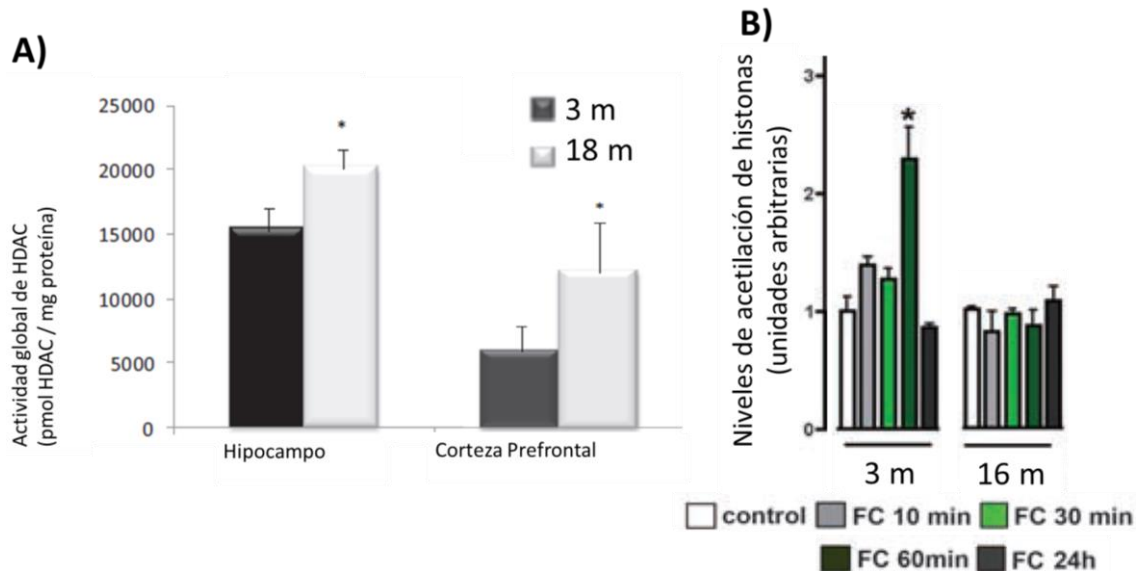


Figura 1.8. Modificaciones en la actividad de HDACs asociadas al envejecimiento. A) En la evaluación de la actividad global de las HDACs en regiones importantes asociadas a la memoria, se observó que en animales envejecidos existe incremento en la actividad enzimática. B) Posterior al aprendizaje de miedo, se sacrificaron sujetos experimentales a diferentes tiempos y se observó disminución a los 60 min en los niveles de acetilación en H4K12 –lisina 12 de la histona 4- en animales envejecidos (A tomada y modificada de Dos Santos *et al.*, 2013; B tomada y modificada de Peleg *et al.*, 2010).

En diversas conductas animales se ha mostrado que el empleo de HDACi inespecíficos mejora la memoria (Hawk *et al.*, 2011; Núñez-Jaramillo *et al.*, 2014; Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011). A pesar de esto, poco se ha analizado el efecto de la inhibición de HDACs de manera específica, pero se ha mostrado que la inhibición de la HDAC1 en el hipocampo genera una memoria de miedo mucho más estable (Bahari-Javan *et al.*, 2012), por otro lado la inhibición de esta enzima en condiciones semejantes en la misma estructura cerebral produce mejora en la memoria de localización, **figura 1.9** (Hawk *et al.*, 2011).

A pesar de estas evidencias, poco se ha estudiado en cuanto a las modificaciones sobre las enzimas que participan en la síntesis de neurotransmisores. Se ha reportado que la activación del promotor del gen de tirosina hidroxilasa se incrementa ante la presencia de HDACi (Kim *et al.*, 2003) y que esta activación está asociada además a la presencia de un estímulo despolarizante (Akiba *et al.*, 2010).

Se ha observado que los HDACi también modifican la transcripción del mRNA de *bdnf* incrementándolo, lo que podría estar relacionado a la mejora de los



procesos cognitivos así como sobre la comunicación neuronal (Intlekofer *et al.*, 2013; Koppel y Timmusk, 2013).

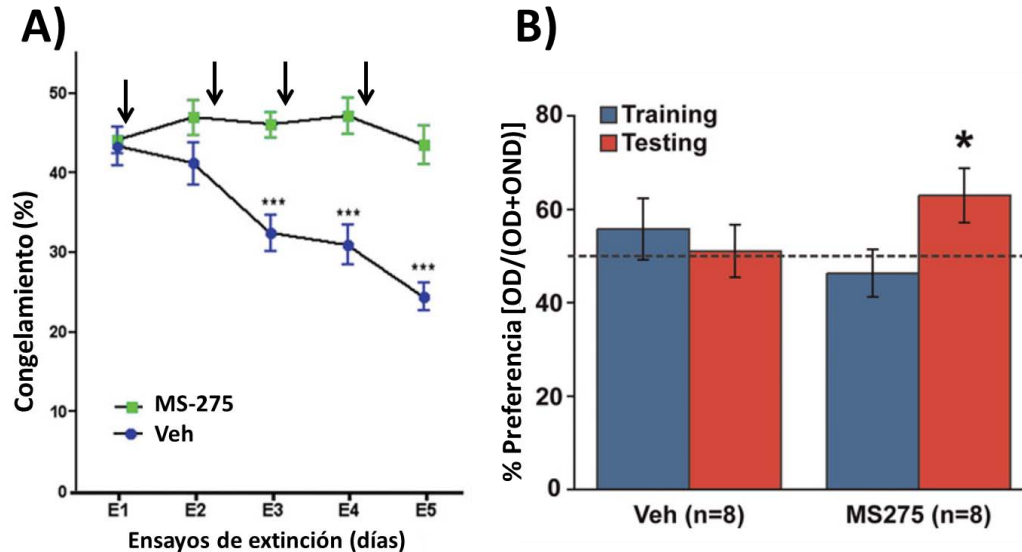


Figura 1.9. La inhibición de HDAC1 estabiliza la memoria. A) Se evaluó la memoria de miedo condicionado, después de cada ensayo se inyectó el inhibidor de la HDAC1 (flechas) en el hipocampo y se observó un retraso en la extinción de esta memoria. B) Se analizó la inhibición de la HDAC1 en hipocampo posterior al aprendizaje en el modelo de localización de objeto, mostrándose incremento en el reconocimiento del objeto movido (A tomada y modificada de Bahari-Javan *et al.*, 2012; B tomada y modificada de Hawk *et al.*, 2011).

Estudios electrofisiológicos muestran que los HDACi, como el butirato de sodio o la tricostatina A, son capaces de mejorar el mantenimiento de la LTP en el hipocampo (Levenson *et al.*, 2004; Vecsey *et al.*, 2007). Estudios electrofisiológicos de colaboración del grupo de trabajo muestran que la inhibición de la HDAC1 en la vía BLA-IC tiene efectos positivos sobre la inducción de LTP tanto en animales jóvenes como en animales viejos, **figura 1.10**.

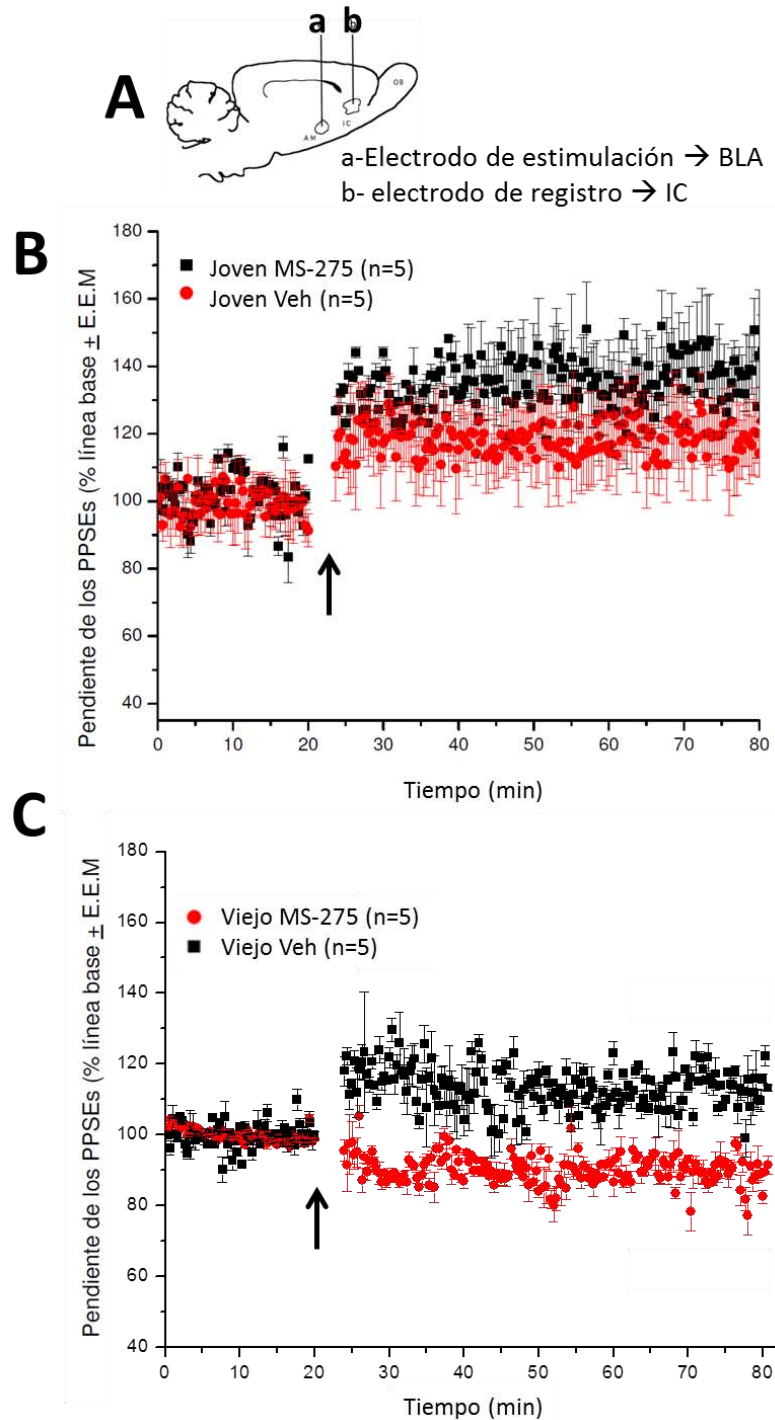


Figura 1.10. Efecto de la inhibición de HDAC1 sobre la inducción de LTP en el animal anestesiado. En A se muestran los sitios de localización de los electrodos (estimulación en BLA; registro en IC); a través del electrodo de registro se infundió el MS-275 1.5 h antes de la estimulación de alta frecuencia (HFS). En B se observa que el MS-275 genera una ligera inducción de LTP en animales jóvenes. En C se presentan dos eventos interesantes; por un lado el grupo viejo vehículo no induce LTP, al contrario parece generar LTD, esto es evitado por la inyección del MS-275 en la IC, ya que el grupo viejo MS-275 puede generar LTP de manera semejante a los animales jóvenes (Datos obtenidos de estudios en colaboración con el laboratorio de la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez).



2. JUSTIFICACIÓN

En el envejecimiento, el cerebro muestra diversas alteraciones, una de ellas es la disminución de LTP que puede ser asociada con el decremento en la expresión de tirosina hidroxilasa y factores neurotróficos como el BDNF, éstos a su vez pueden ser consecuencia del incremento en la actividad de desacetilasas de histona (HDAC) y estas modificaciones repercuten directamente en los procesos de memoria (Arivazhagan *et al.*, 2002; Cattelan *et al.*, 2015; Dickerson *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2013; McGahon *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1993; Peleg *et al.*, 2010; Silhol *et al.*, 2005, 2007). Por otro lado, estudios indican que el empleo de inhibidores inespecíficos de las desacetilasas de histona (HDACi) mejoran la memoria dependiente de hipocampo en sujetos experimentales jóvenes (Levenson *et al.*, 2004; Stefanko *et al.*, 2009), además se ha demostrado que la inyección intrahipocampal de los HDACi mejora el aprendizaje en modelos de animales envejecidos (Bahari-Javan *et al.*, 2012; Peleg *et al.*, 2010). Evidencias preliminares en el grupo de trabajo muestran que el empleo del inhibidor específico de la HDAC1 en animales viejos mejora la generación y el mantenimiento de LTP, sin embargo es necesaria la ampliación de estos estudios para lograr entender la relación que existe entre los efectos a nivel conductual y los procesos moleculares, específicamente la expresión de *Bdnf* y *Th*, debido a que estudios *in vitro* ya han mostrado que los HDACi son capaces de favorecer la expresión del mRNA de *Bdnf* (Intlekofer *et al.*, 2013; Koppel y Timmusk, 2013) y de *Th* (Akiba *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003).

Por todo lo anterior se propuso evaluar las modificaciones en una tarea conductual relacionada a la vía BLA-IC, como el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) y corroborar el efecto sobre la memoria en una prueba conductual asociada a la IC, como la memoria de reconocimiento de objetos (ORM), así mismo se determinaron las modificaciones en la expresión de *Bdnf* y de *Th*.



3. HIPÓTESIS

La inhibición de la desacetilasa de histona ocasiona incremento en la expresión de *Bdnf* y de *Th*, de esta manera se favorece el establecimiento de la memoria gustativa y de reconocimiento en ratones viejos y jóvenes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar las modificaciones en la memoria gustativa y de reconocimiento así como en la expresión de *Bdnf* y *Th* ante la inhibición de la desacetilasa de histona en ratones jóvenes y viejos.

4.2 Objetivos particulares:

Ante la inhibición de la HDAC en ratones jóvenes y viejos:

- Evaluar las modificaciones en la memoria gustativa.
- Evaluar las modificaciones en la memoria de reconocimiento.
- Determinar la transcripción de Tirosina Hidroxilasa.
- Determinar la transcripción del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro.



5. DIAGRAMAS DE TRABAJO

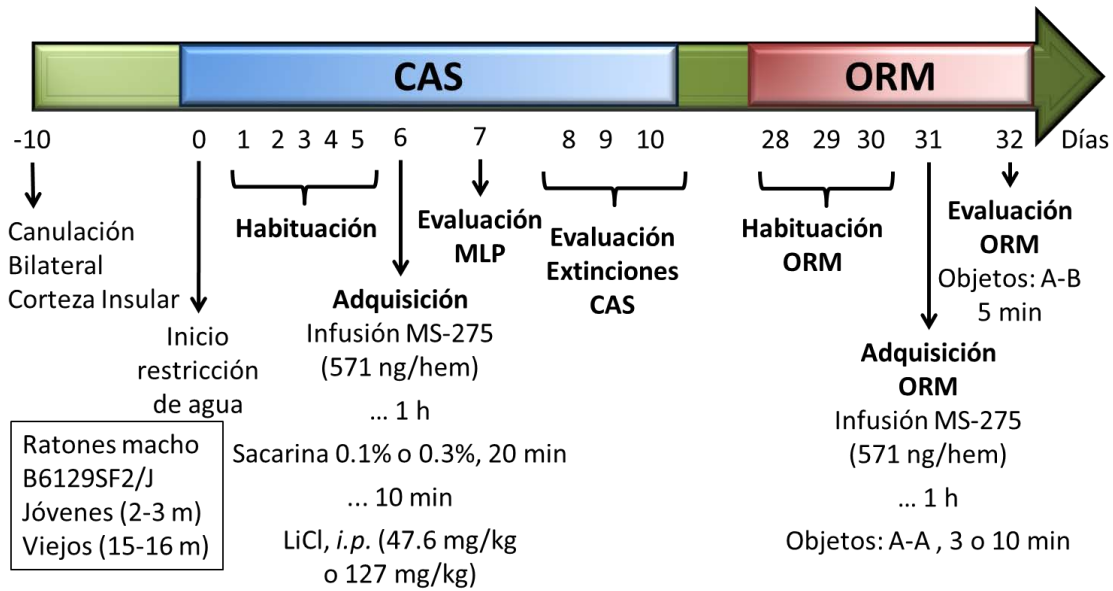


Figura 5.1. Diagrama de trabajo para el análisis conductual. La descripción detallada se encuentra en la sección 6. Materiales y métodos, subsecciones 6.1-6.4.

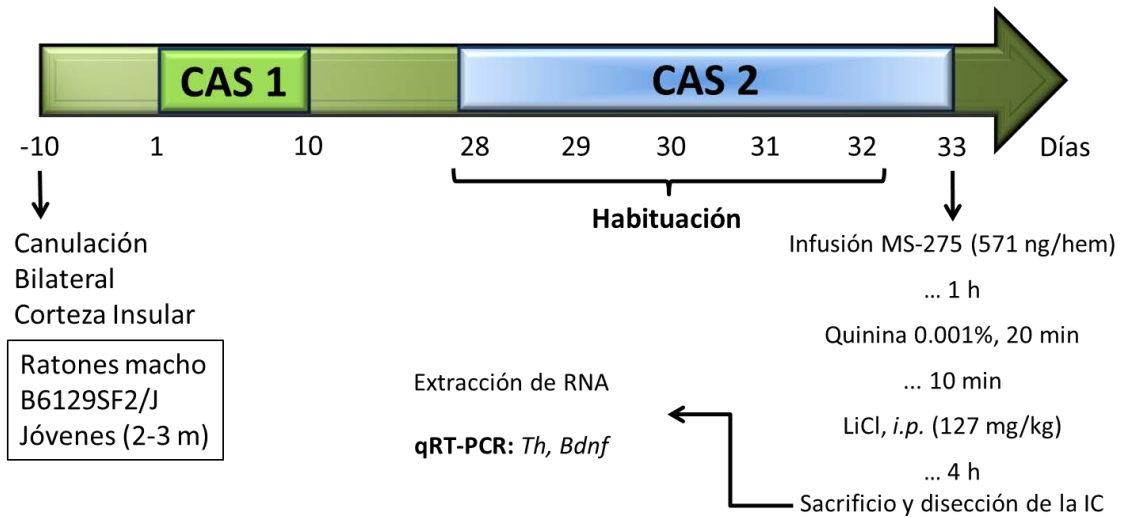


Figura 5.2. Diagrama de trabajo para el análisis de expresión génica. La descripción detallada está en la sección 6. Materiales y métodos, subsecciones 6.7 - 6.11.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sujetos experimentales.

Se emplearon ratones macho de la cepa B6129SF2/J jóvenes (2-3 m) y viejos (15-16 m) al momento de la cirugía, provenientes del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales de acrílico transparente, con libre acceso a agua y alimento (hasta el momento de iniciar la evaluación conductual de CAS, a partir de la cual se sometieron a restricción de agua), a una temperatura entre 18° y 26° C, con un $\pm 50\%$ de humedad y un ciclo de luz oscuridad de 12 h cada uno. Los protocolos de conducta se realizaron durante la fase de luz. Todos los procedimientos de mantenimiento, cirugía y disección estuvieron sujetos a los protocolos aprobados por los comités nacionales según la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001) sobre el manejo y uso de animales de laboratorio.

6.2 Cirugía estereotáxica.

Las coordenadas para la colocación de cánulas se eligieron con base al atlas de referencia Allen (Dong, 2008). La cirugía se llevó a cabo bajo anestesia inhalada (isofluorano 1.25–2.0 %; ViP 3000 Matrix). Una vez anestesiado el animal se colocó en un aparato estereotáxico con adaptador para ratón (Stoelting Co. Wood Dale) y se implantaron cánulas guía de acero inoxidable (8 mm; Small Parts) de manera bilateral en la corteza insular (IC) en las coordenadas AP: +1.4 mm; ML: ± 3.3 mm; DV: -3.0 mm.

6.3 Evaluación conductual: Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS).

El CAS es un modelo de aprendizaje condicionado, en el cual el sujeto debe aprender a relacionar un sabor novedoso (EC) con un malestar gástrico (EI); así al presentar nuevamente el EC, el sujeto evita consumir la bebida con el sabor novedoso (EC; Bermúdez-Rattoni, 2004).

Soluciones empleadas. *Solución vehículo (Veh).* Se preparó la solución vehículo de DMSO 28% (Sigma, D-8779) en Solución Salina Isotónica (SSI; PiSA).



Entinostat (MS-275). Se preparó la solución de MS-275 (Sigma, EPS002) a una concentración de 10.9 mM en DMSO, antes de usarse se diluyó a una concentración final de 3 mM con SSI. La concentración de DMSO resultante fue de 28%.

CAS fuerte: Sacarina 0.3%; LiCl 127 mg/kg (0.4 M; 7.5 ml/kg).

CAS débil: Sacarina 0.1%; LiCl 47.6 mg/kg (0.15 M, 7.5 ml/kg).

Sacarina. Se realizó con sacarina grado analítico (Sigma, S1002) disuelta en agua purificada.

Cloruro de litio (LiCl). Se preparó a partir de la sal grado analítico (Baker, 2374-01) con agua desionizada.

Procedimiento. Posterior a la recuperación de la cirugía, se inició la restricción de agua presentándose líquidos en dos periodos de acuerdo al siguiente esquema: el primer periodo fue entre 10 y 12 h, durante 20 min; el segundo periodo entre 18 y 19 h, durante 10 min, este último para evitar deshidratación de los animales.

Durante 5 días se realizó la *habituación* con el fin de estabilizar los consumos basales; se le presentaron al animal dos bebederos de agua purificada durante 20 min. El día 6 se infundió 0.5 μ l de la solución vehículo (grupo Veh) o 0.5 μ l de la solución de entinostat (grupo MS-275) en cada hemisferio cerebral a una velocidad de 0.25 μ l/min, al finalizar la inyección se esperaron 3 minutos de difusión. Una hora después se realizó la *adquisición* del condicionamiento; se le presentaron al sujeto dos bebederos de sacarina (0.3% para CAS fuerte o 0.1% para CAS débil) durante 20 min al cabo de los cuales se esperaron 10 min y se administró por vía intraperitoneal (*i.p.*) LiCl (127 mg/kg para CAS fuerte o 47.6 mg/kg para CAS débil).

El día 7 (24 h después de la adquisición) se le presentaron al animal dos bebederos uno de sacarina (0.3% o 0.1%) y otro con agua purificada para evaluar la memoria de largo plazo (LTM). De los días 8 al 10, nuevamente se realizaron evaluaciones para la extinción del CAS (E1, E2 y E3) presentándole al animal un bebedero con sacarina y un segundo con agua purificada. Se registraron los volúmenes de líquido consumidos.



6.4 Evaluación conductual: Memoria de Reconocimiento de Objetos (ORM).

El modelo de ORM permite evaluar la capacidad de los sujetos de reconocer objetos nuevos en comparación con objetos previamente presentados. No requiere de estímulo externo, castigo o recompensa, así el sujeto invierte más tiempo en explorar el objeto nuevo que el familiar. Esta conducta se inició 18 días después de concluido el CAS.

Soluciones empleadas. *Solución vehículo (Veh).* Se preparó la solución vehículo de DMSO 28% (Sigma, D-8779) en Solución Salina Isotónica (SSI).

Entinostat (MS-275). Se preparó la solución de MS-275 (Sigma, EPS002) a una concentración de 10.9 mM en DMSO, antes de usarse se diluyó a una concentración final de 3 mM con SSI. La concentración de DMSO resultante fue de 28%.

Procedimiento. Del día 18 al 20 post-cirugía, los animales fueron habituados durante 5 min en cajas de madera (33 x 33 x 30 cm) previamente desodorizadas con etanol al 70% y con una ligera capa de aserrín.

El día 21 se infundieron 0.5 μ l de la solución vehículo (grupo Veh) o 0.5 μ l de la solución de entinostat (grupo MS-275) en cada hemisferio cerebral a una velocidad de 0.25 μ l/min, al finalizar la inyección se esperaron 3 minutos de difusión. Una hora después se realizó la adquisición; a los animales se les presentaron dos objetos idénticos, en la caja descrita anteriormente, durante un tiempo de 10 min (ORM fuerte) o de 3 min (ORM débil). La capacidad del sujeto de reconocer al objeto nuevo depende del tiempo de duración de la fase de familiarización (Antunes y Biala, 2012).

Es importante mencionar que los grupos fueron invertidos, es decir, aquellos animales que recibieron solución vehículo en el CAS, para el ORM recibieron solución MS-275 y viceversa.

El día 22 se evaluó la memoria de largo plazo, para lo cual uno de los objetos se cambió y se le permitió al sujeto explorar durante un tiempo de 5 min.



La posición del objeto novedoso se realizó de manera contrabalanceada en los sujetos de un mismo grupo para evitar preferencias sobre un lugar de la caja (Antunes y Biala, 2012).

Se videograbaron las etapas de adquisición y memoria de largo plazo y por análisis de los videos se registró el tiempo de exploración en cada uno de los objetos.

6.5 Conducta para la estimulación ante un sabor novedoso.

Para realizar una primera aproximación para evaluar los efectos del MS-275 sobre la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) se procedió como se describe a continuación.

Soluciones empleadas. *Solución vehículo (Veh).* Se preparó la solución vehículo de DMSO 28% (Sigma, D-8779) en Solución Salina Isotónica (SSI).

Entinostat (MS-275). Se preparó la solución de MS-275 (Sigma, EPS002) a una concentración de 10.9 mM en DMSO, antes de usarse se diluyó a una concentración final de 3 mM con SSI. La concentración de DMSO resultante fue de 28%.

Quinina 0.001%. Se preparó con la sal grado analítico (Sigma, Q-1125) disuelta en agua purificada.

Procedimiento. A los sujetos experimentales (animales viejos; 15-16 m) se les infundió 0.5 µl de la solución vehículo (grupo Veh) o 0.5 µl de entinostat (grupo MS-275). Una hora más tarde se les presentaron dos bebederos de solución de quinina 0.001% durante 20 min.

Al finalizar la presentación del sabor, 40 min más tarde, los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico a una dosis de 75 mg/kg y perfundidos con SSI y paraformaldehído 4%.



6.6 Técnica de inmunohistoquímica y análisis de cantidad de fibras.

Se evaluó la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en la corteza insular de animales envejecidos (15-16 m; ver subsección 6.5 Conducta para la estimulación del sabor novedoso). Posterior al sacrificio y perfusión, se extrajeron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído 4% aproximadamente por 1 semana. Una vez fijados, se les realizó 1 lavado con SSI y se cambiaron a sacarosa 30%, 42 h más tarde se realizaron cortes de 40 μm en el criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Leica CM1520). Los cortes se recuperaron y almacenaron en sacarosa 15% hasta su utilización.

Se seleccionaron 2 cortes por animal y se lavaron 3 veces (10 min c/u) con solución de buffer trizma (TBS). Se realizó un lavado (10 min) con TBS + tritón 0.1% (TBST) y se incubó el anticuerpo primario (anti-TH; conejo; 1:1000; Sigma T8700) en TBST con albúmina de suero bovino al 5% (TBST-BSA) durante 12 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en agitación.

Al siguiente día se realizaron seis lavados con TBS (10 min c/u) y se incubó el anticuerpo secundario (anti-conejo Cy3; 1:200; Millipore AP187C) en TBST-BSA durante 2 h en oscuridad y agitación a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con TBS (10 min c/u en oscuridad), para finalizar con el montaje de los tejidos en portaobjetos silanizados con medio de montaje para fluorescencia (Dako, S3023). Las fotomicrografías fueron obtenidas en microscopio confocal (Olympus Fluoview FV10).

Una vez obtenidas las imágenes, se realizaron los mapas correspondientes a la corteza insular, posteriormente fueron transformadas a imágenes binarias con ayuda del filtro Hessian del programa Image J, finalmente se realizó densitometría de estas imágenes para conocer de manera indirecta la densidad de fibras en la corteza insular, área de interés en el presente proyecto.



6.7 Evaluación conductual del CAS para el análisis de la expresión de mRNAs.

Se siguió el mismo protocolo conductual como se describió en el apartado 6.3 Evaluación conductual Condicionamiento aversivo al sabor (CAS), empleando animales jóvenes que ya habían realizado un CAS de sacarina.

Soluciones empleadas. *Solución vehículo (Veh).* Se preparó la solución vehículo de DMSO 28% (Sigma, D-8779) en Solución Salina Isotónica (SSI).

Entinostat (MS-275). Se preparó la solución de MS-275 (Sigma, EPS002) a una concentración de 10.9 mM en DMSO, antes de usarse se diluyó a una concentración final de 3 mM con SSI. La concentración de DMSO resultante fue de 28%.

Butirato de sodio (NaBu). Se preparó la solución de NaBu (Sigma, B5887) a una concentración de 100 µg/µl en DMSO 28%.

Quinina 0.001%. Se preparó con la sal grado analítico (Sigma, Q-1125) disuelta en agua purificada.

Cloruro de litio (LiCl) 0.4 M. Se preparó a partir de la sal grado analítico (Sigma) con agua desionizada.

Procedimiento. A los sujetos experimentales se les infundió 0.5 µl de la solución vehículo (grupo Veh), 0.5 µl de entinostat (grupo MS-275) o 0.5 µl de butirato de sodio (grupo NaBu), este último como control positivo. Al cabo de 1 h se les presentaron dos bebederos de solución de quinina 0.001% durante 20 min. Diez minutos más tarde se administraron con LiCl (127 mg/kg, *i.p.*). A partir de este momento se consideraron 4 horas para el sacrificio de los animales por dislocación y decapitación para la disección de la corteza insular con material de cirugía estéril.

6.8 Extracción de RNA por el método de TRIzol.

Una vez obtenida la corteza insular, el tejido se transfirió a un tubo cónico y se adicionaron 500 µl de TRIzol (Invitrogen Cat. 15596) para homogeneizar el tejido con una pipeta. Una vez homogeneizado, se adicionaron 500 µl más de TRIzol y se mezcló en vórtex por 5 s. Después se incubó durante 15 min a 30 °C.



Finalizado el tiempo se agregaron 200 μ l de cloroformo por cada 1 ml de trizol empleado al inicio. Se mezcló en vórtex por 15 seg formándose una emulsión de aspecto turbio. Se dejó incubar durante 3 min a temperatura ambiente.

Después de la incubación se centrifugaron las muestras por 15 min, 12000 rpm a 4 °C. Posteriormente se transfirió sólo la parte acuosa (fase superior) a un tubo nuevo evitando tomar la interfase de color blanco. A este sobrenadante transferido se le adicionaron 500 μ l de isopropanol y se mezcló en vórtex por 15 s, con posterior incubación de 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se centrifugó por 15 min, 12000 rpm a 4 °C. Al terminar la centrifugación se formó un pellet, por lo cual se retiró y descartó el sobrenadante con una pipeta evitando remover el pellet. Se lavó con 1 ml de etanol 70 % para remover el exceso de sales y se mezcló por 15 s con posterior centrifugación de 5 min, 7500 rpm a 4 °C. Con cuidado se retiró el etanol y se descartó. Se dejó secar el pellet aproximadamente durante 5 min.

Al pellet se le adicionaron 20 μ l de agua inyectable (PiSA) raspando las paredes del microtubo, resuspendiendo de manera vigorosa y se incubó por 5 min a 60 °C. Finalizada la incubación se centrifugó por 1 min a 13000 rpm a 4 °C. Se procedió a alicuotar (3 alícuotas de 6 μ l) y el remanente se conservó para cuantificar en el nanodrop a 260 nm (blanco de lectura: agua inyectable). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

6.9 Gel para cuantificación de pureza de RNA.

Soluciones empleadas. *FA gel buffer 10x.* Se preparó con una concentración final de 200 mM MOPS (libre de ácidos), 50 mM acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$), 10 mM EDTA a pH 7.0 con NaOH.

Buffer de corrida. Preparado con 100 ml de FA gel buffer 10 x, 20 ml formaldehído 37 % (12.3 M) y 880 ml de agua libre de RNAsa.

Buffer de carga 5x. Se preparó con 16 μ l azul de bromofenol acuoso (ó 20 mg de azul de bromofenol sólido), 80 μ l de EDTA 500 mM (pH 8), 720 μ l de formaldehído 37 % (12.3 M), 2 ml de glicerol 100 %, 3084 μ l de formamida, 4 ml de FA gel buffer



10x y se aforó a 10 ml con agua libre de RNAsa. La estabilidad de este buffer es aproximadamente 3 meses a 4 °C.

Gel FA 1.2%. A 1.2 g de agarosa se adicionaron 10 ml de FA gel buffer 10x, se aforó a 100 ml con agua libre de RNAsa. Se calentó para fundir la agarosa y se dejó enfriar un poco. Posteriormente se añadieron 1.8 ml de formaldehído al 37 % (12.3 M). Se agregó además 1 µl de GelRed™. Una vez preparado el gel se dejó equilibrar en el buffer de corrida al menos por 30 min.

Preparación de las muestras de RNA. En un microtubo se adicionó el volumen del extracto de RNA para 200 ng y se añadieron 2 µl de buffer de carga (para un volumen final de 10 µl). Con agua libre de RNAsa se llevaron todas las muestras al mismo volumen (10 µl). Se incubaron las muestras a 65 °C por 5 min. Una vez cargadas las muestras en el gel, se realizó la electroforesis durante 45 min a 95 V.

6.10 Obtención de cDNA.

Se empleó el kit de Applied Biosystems, GeneAmp, RNA-PCR core kit (N808-0143) y las muestras se procesaron por duplicado.

Preparación del Master Mix (MM) para 1 reacción (rx). Se preparó de acuerdo a lo indicado en el inserto del kit:

- 25 mM MgCl ₂ solution	4 µl
- 10x PCR buffer II	2 µl
- DEPC treated di water	*
- dGTP	2 µl
- dATP	2 µl
- dCTP	2 µl
- dTTP	2 µl
- RNase inhibitor	1 µl
- MuLV reverse transcriptase	1 µl
- Oligo d(T) ₁₆	1 µl
Total	17 µl

*El volumen de agua DEPC dependerá del volumen de la muestra, en la cual debe adicionarse 1 µg de RNA y el volumen máximo fue de 3 µl.



Al tubo de reacción se añadió primero el MM, posteriormente la muestra y finalmente el agua DEPC en volumen suficiente para tener un volumen total de reacción de 20 μ l.

El termociclador se programó 1 ciclo de 30 min a 42 °C, seguido de 1 ciclo de 5 min a 99 °C y terminar con 1 ciclo de tiempo infinito a 20 °C. Con esto se obtiene cDNA y debe almacenarse a -20 °C.

6.11 PCR en tiempo real para la cuantificación de cDNA.

Se usó el kit MAXima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific K0221, K0222 ó K0223).

Para una reacción se adiciona al tubo de reacción lo siguiente:

- SYBR 2x 10 μ l
- Oligo F 1 μ l
- Oligo R 1 μ l
- cDNA 2 μ l
- H₂O 6 μ l

Vol. Total 20 μ l

Cada muestra se realizó por cuadruplicado para cada gen y se colocaron en una placa de tubos de reacción para qPCR de 96 tubos. Los controles negativos se realizaron de la misma forma, excepto que en lugar de cDNA se adicionó H₂O.

La reacción se PCR se programó de la siguiente manera en el termociclador (StepOne™, Applied Biosystems): 1 ciclo de 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C seguido de 1 min a 60 °C; 1 ciclo de 15 s a 95 °C seguido de 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C.

Al finalizar la reacción el equipo reportó los valores de C_T para cada una de las muestras, dichos valores fueron procesados según el método de $\Delta\Delta C_T$.



6.12 Análisis estadístico.

- Para el CAS, los volúmenes consumidos el día de la adquisición fueron comparados con los niveles basales de agua, se realizó una prueba *t* de *Student* con una $p < 0.05$ para analizar modificaciones en el reconocimiento del sabor novedoso.
- En la memoria de largo plazo del CAS se obtuvo el porcentaje de consumo para sacarina y agua, de acuerdo al siguiente cociente:

$$\text{Índice de consumo} = \frac{\text{Vol}_{\text{Sacarina o Agua}}}{(\text{Vol}_{\text{Sacarina}} + \text{Vol}_{\text{Agua}})}$$

Se graficó el Índice de consumo \pm ESM y se realizó una prueba *t* de *Student* con una $p < 0.05$ entre agua y sacarina para conocer la capacidad de discriminación del sujeto frente al sabor aversivo.

- De manera semejante, en las evaluaciones de la extinción del CAS se obtuvo el porcentaje de consumo (% Consumo) de acuerdo al siguiente cociente:

$$\% \text{ Consumo} = \left(\frac{\text{Vol}_{\text{Sacarina}}}{(\text{Vol}_{\text{Sacarina}} + \text{Vol}_{\text{Agua}})} \right) \times 100$$

Se graficó el % Consumo \pm ESM y se realizó un ANOVA de dos vías post-test Bonferroni con una $p < 0.05$.

- Para el ORM se obtuvo el índice de reconocimiento para el objeto nuevo y el familiar, de acuerdo al cociente:

$$\text{Índice de reconocimiento} = \frac{\text{tiempo}_{\text{Familiar o Novedoso}}}{(\text{tiempo}_{\text{Familiar}} + \text{tiempo}_{\text{Novedoso}})}$$

Se graficó el Índice de reconocimiento \pm ESM y se realizó una prueba *t* de *Student* con una $p < 0.05$ entre el objeto familiar y el objeto nuevo.

- Para el análisis de la expresión génica de *Th* y *Bdnf* se obtuvo el nivel relativo de expresión con el método de $\Delta\Delta C_T$. Se graficó la expresión relativa de mRNA \pm ESM de cada grupo experimental. Posteriormente se realizó un ANOVA de una vía post-test Bonferroni con una $p < 0.05$.



7. RESULTADOS.

7.1 Determinación del sitio de canulación.

Posterior a las pruebas conductuales, los animales fueron anestesiados y perfundidos. Con el objetivo de analizar el sitio de canulación, realizado en la corteza insular anterior con coordenadas AP:+1.4; ML: \pm 3.3; DV: -3.0, **figura 7.1**.

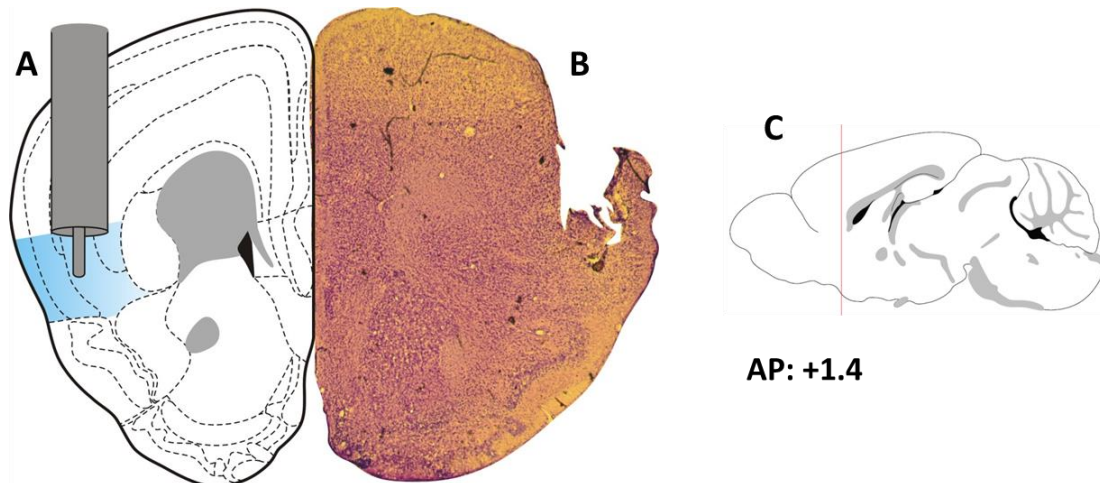


Figura 7.1. Determinación del sitio de canulación. Se muestra en A el diagrama coronal del sitio de canulación, remarcando en azul el área que corresponde a la corteza insular. En B se muestra un corte coronal, teñido con violeta de cresilo, correspondiente al diagrama de A, con coordenadas AP: +1.4; ML: \pm 3.3; DV: -3.0. En C se muestra el diagrama sagital de cerebro de ratón mostrando AP: +1.4. (A, tomada y modificado de Dong, 2008).

7.2 La inhibición de la HDAC1 retrasa la extinción del CAS.

De acuerdo a la metodología planteada (**figura 5.1 y 7.2**), se realizó la adquisición del CAS, 1 hora después de la administración intracraneal del MS-275. Para proseguir con la etapa de adquisición, en la cual se le presentaron al sujeto dos bebederos con sacarina (sabor novedoso) y el registro del consumo sirve para evaluar un parámetro importante en el CAS que es la neofobia, entendida como la renuencia del sujeto por consumir un sabor novedoso (Bermúdez-Rattoni, 2004).

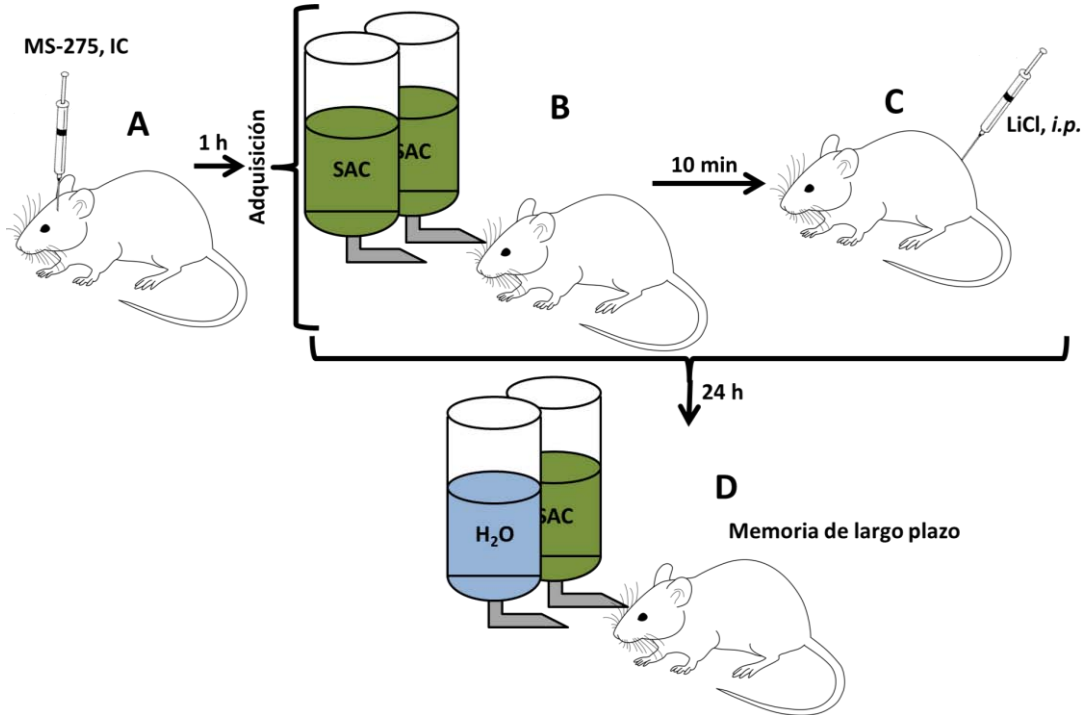


Figura 7.2. Aversión condicionada al sabor (CAS). Posterior al proceso de habituación, se inyectó al animal MS-275 (A) en la corteza insular (IC). Un hora más tarde se realizó la adquisición en la cual se le presentaron al sujeto dos bebederos de sacarina (SAC) durante 20 min (B), 10 min después se administró por vía intraperitoneal (*i.p.*) el cloruro de litio (LiCl) para inducir malestar (C). La evaluación de la memoria de largo plazo se realizó 24 h y se le presentó al ratón un bebedero de agua y otro de sacarina; aquél animal que aprendió consume poca sacarina y más agua. En las extinciones también sólo se presentaron los bebederos de agua y sacarina.

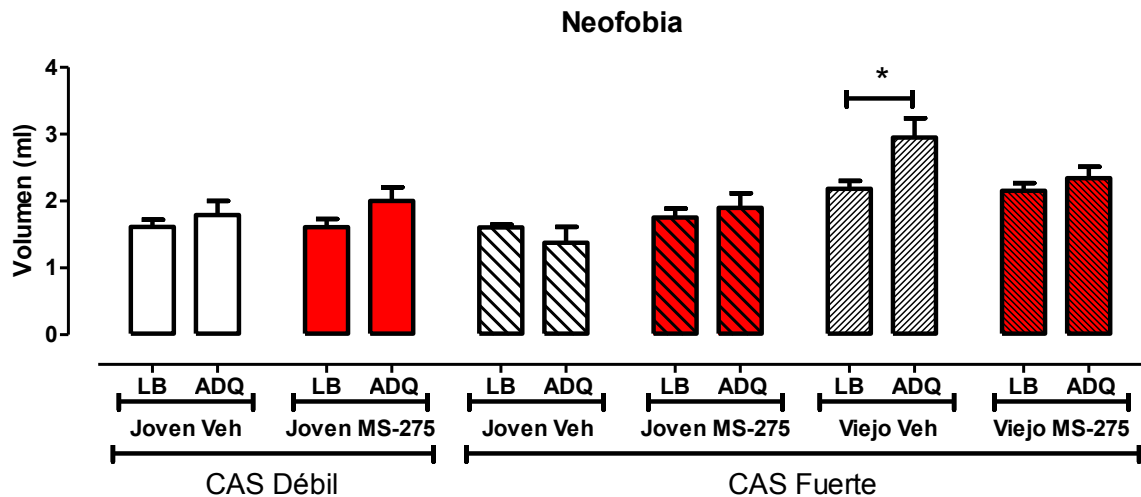


Figura 7.3. La inhibición de la HDAC1 atenúa la preferencia por el sabor novedoso en animales envejecidos. En la gráfica se muestra la neofobia de animales jóvenes y viejos ante un sabor novedoso (sacarina). Se observa que únicamente el grupo Viejo Veh tiene preferencia hacia el sabor novedoso, evidenciado como incremento en el consumo durante la adquisición (ADQ) en comparación con la línea basal (LB). En LB se midió el volumen consumido de agua, mientras que en ADQ se midió el consumo de sacarina. * $p < 0.05$, *t* de Student.



En el análisis de la neofobia de los sujetos experimentales se observa que los grupos Joven Veh y Joven MS-275 carecen de ésta, sin embargo el grupo Viejo Veh presenta preferencia por la sacarina, dicha preferencia no se observa en el grupo Viejo MS-275, **figura 7.3**. Esta atenuación de la preferencia sugiere que la inhibición de la HDAC1 podría modificar la comunicación neuronal relacionada a la percepción del sabor novedoso asociada a una etapa.

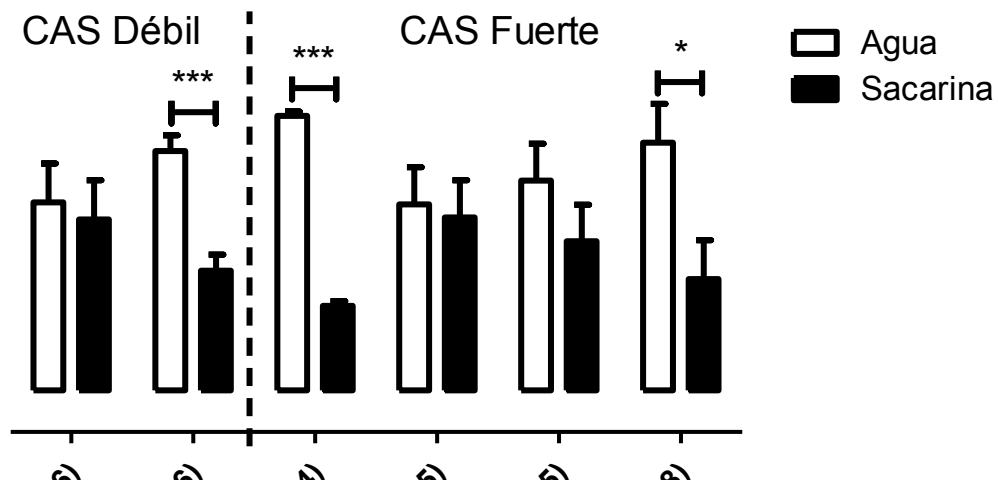


Figura 7.4. La inhibición de la HDAC1 afecta la memoria de largo plazo de manera dependiente de la edad y de la intensidad del estímulo. Se muestran los índices de consumo (Índice de consumo = Vol agua o sacarina / Vol total) para cada bebedero y cada grupo. CAS débil: Sac 0.1%, LiCl 48 mg/kg; CAS fuerte: Sac 0.3%, LiCl 127 mg/kg. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ *t* de Student.

El análisis de la memoria de largo plazo (LTM) se realizó por la obtención de un índice de discriminación (Índice de consumo = Vol de agua o sacarina / Vol Total) para cada bebedero (sacarina y agua), **figura 7.4**. Se observa que en la condición CAS débil (Sac 0.1%, LiCl 48 mg/kg), el grupo Joven Veh no logra discriminar la sacarina del agua (los consumos son equiparables), esto indica que de manera normal éstas condiciones no son suficientes para generar una memoria de aversión, por otra parte la inhibición de la HDAC1 parece potenciar este tipo de



memoria, ya que el grupo Joven MS-275 logra discriminar la sacarina del agua, es decir, generaron aversión.

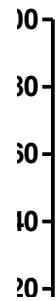
Por otro lado, en la condición CAS fuerte (Sac 0.3%, LiCl 127 mg/kg) el grupo Joven Veh sí genera aversión, denotado por el bajo consumo de sacarina respecto del agua. Uno de los resultados interesantes es el hecho de que la inhibición de la HDAC1 en los animales jóvenes (grupo Joven MS-275) genera un efecto contraproducente, ya que evita el establecimiento de la memoria de largo plazo de manera adecuada, observado por consumos semejantes entre sacarina y agua, **figura 7.4.**

En el grupo Viejo Veh bajo la condición de CAS fuerte se observa que el estímulo “normal” que produce aversión en animales jóvenes, no es suficiente denotado por los consumos entre agua y sacarina que son semejantes, se observa además un efecto positivo sobre la memoria de largo plazo ante la inhibición de la HDAC1 en los animales viejos (grupo Viejo Ms-275) ya que logran discriminar a la sacarina del agua, mostrando aversión hacia la primera solución, **figura 7.4.**

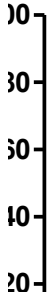
Los resultados obtenidos de la LTM en el CAS indican alteraciones en el sistema de comunicación neuronal de los animales viejos que evita la formación de una adecuada memoria aversiva (comparar grupos CAS débil Joven Veh contra CAS fuerte Viejo Veh), mientras que la inhibición de la HDAC1 ocasiona un efecto positivo sobre el establecimiento del CAS (comparar grupos CAS débil Joven MS-275 contra CAS fuerte Viejo MS-275). Por otra parte, además es interesante denotar que la HDAC1 parece tener una función diferencial dependiente de la edad en los animales, ya que su inhibición en el grupo joven (CAS fuerte), tiene efectos negativos en el establecimiento del CAS, sin embargo tiene efectos totalmente opuestos en animales viejos (comparar grupos CAS fuerte Joven MS-275 contra CAS fuerte Viejo MS-275), **figura 7.4.**



A Joven CAS Débil



B Joven CAS Fuerte



C Viejo CAS Fuerte

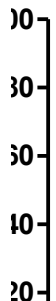


Figura 7.5. La inhibición de la HDAC1 retrasa la extinción del CAS. En A se muestra a los grupos jóvenes con CAS débil denotando que la inhibición de la HDAC1 retrasa la extinción del CAS. En B se observan los grupos jóvenes con CAS fuerte, los cuales no tienen diferencias en el proceso de extinción. En C se grafican los grupos viejos con CAS fuerte, mostrando que la inhibición de la HDAC1 en animales viejos retrasa la extinción del CAS. Evaluaciones para extinción (E1, E2, E3). % Consumo= Vol sacarina / (Vol sacarina + Vol agua). *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ ANOVA de dos vías post-test Bonferroni.



Las evaluaciones del proceso de extinción (E1, E2, E3) del CAS muestran que la inhibición de la HDAC1 en la condición de CAS débil del grupo Joven, ocasiona un retraso en el proceso de extinción, entendiéndose como una mejora en la estabilidad de la memoria, es decir, el trazo de memoria original es más fuerte, **figura 7.5 A**. En el caso de la condición de CAS fuerte los grupos jóvenes, con y sin inhibición de la HDAC1, no presentan diferencias en la extinción, que de hecho es ausente, **figura 7.5 B**. En la condición CAS fuerte, el grupo viejo con inhibición de la HDAC1 presenta también retraso de la extinción, y el mantenimiento de esta memoria es semejante a los grupos jóvenes del CAS fuerte, **figura 7.5 C**.

En conjunto, los datos muestran que el animal viejo tiene alteración en el proceso de extinción del CAS (bajo la condición fuerte), ya que sólo el grupo Viejo Veh extingue rápidamente, esta alteración podría deberse a modificaciones en la detección de que el sabor es novedoso y ello repercute directamente a nivel de consolidación, generándose una memoria más lábil a través del tiempo. Por otro lado la inhibición de la HDAC1 es capaz de mejorar el proceso en el animal viejo, ya que el grupo Viejo MS-275 se comporta de manera semejante a los grupos jóvenes, y es evidente que se genera una memoria mucho más estable, es decir, se produce una memoria duradera.

7.3 La inhibición de HDAC1 mejora la memoria de reconocimiento.

Con la metodología planteada (**Figura 5.1 y 7.6**) en la cual los animales fueron inyectados en la IC con la solución vehículo (grupo Veh) o con la solución de entinostat (grupo MS-275), 1h más tarde se realizó la adquisición en donde se le presentaron 2 objetos idénticos, 24 h después se hizo la evaluación de la memoria de largo plazo.

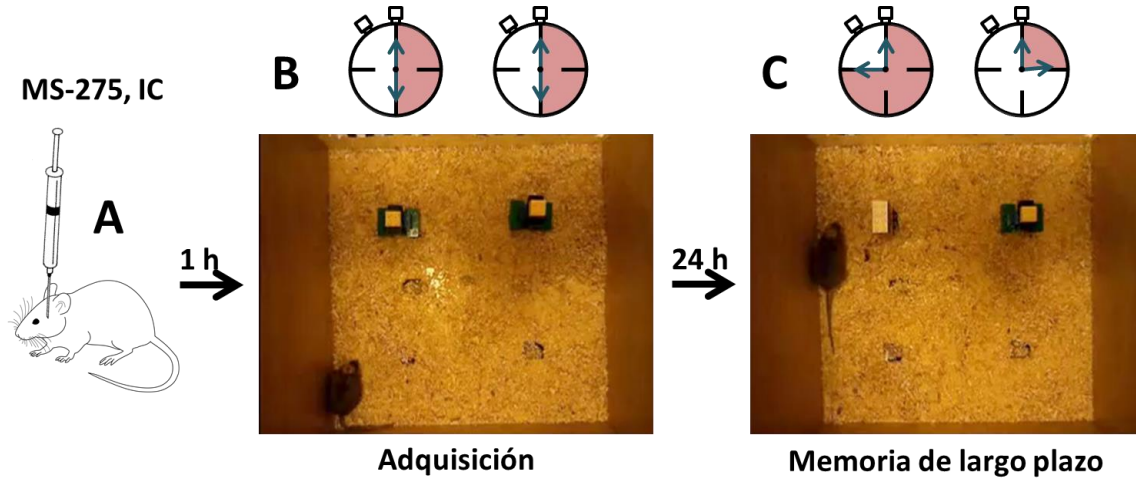


Figura 7.6. Memoria de reconocimiento de objetos (ORM). El ORM se basa en la capacidad del sujeto de discriminar lo nuevo de lo previamente experimentado. Posterior a la habituación en el campo, se inyectó al animal MS-275 (A) en la corteza insular (IC). Una hora más tarde se realizó la adquisición (B) en la cual se colocaron 2 objetos iguales durante 10 min para que el sujeto los explorara; al cuantificar los tiempos de exploración éstos son semejantes. Para la evaluación de la memoria de largo plazo (C) 24 h después, se cambió uno de los objetos por uno nuevo. Se sabe que el sujeto aprende debido a que explora más tiempo al objeto nuevo.

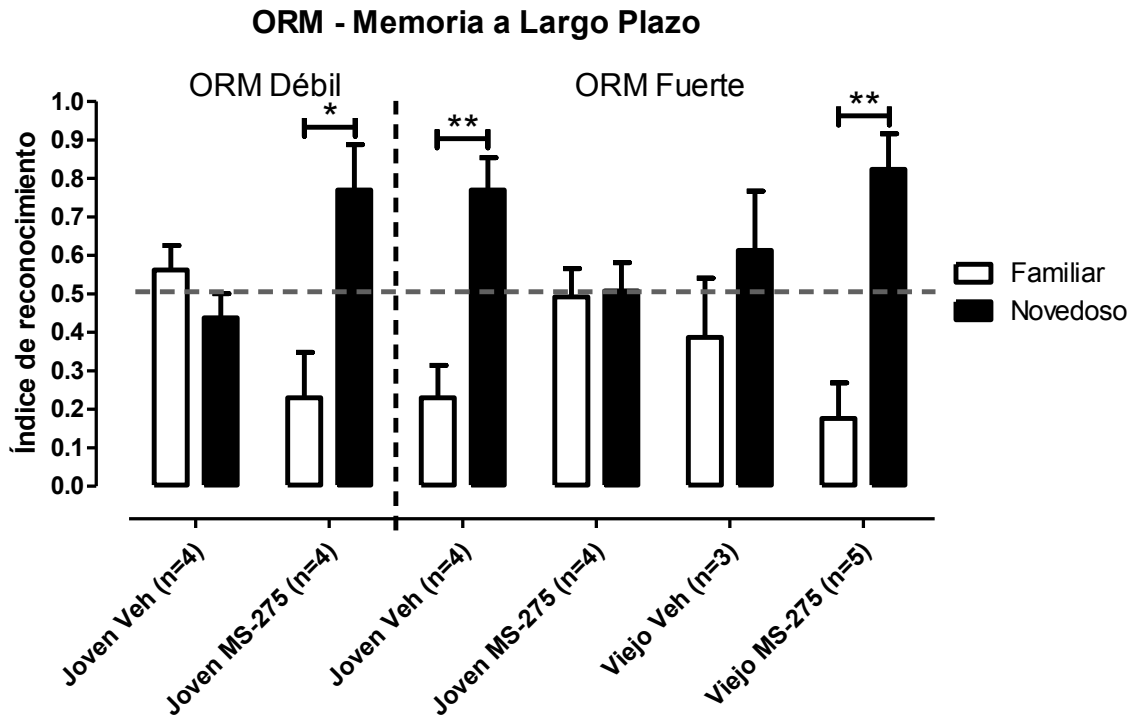


Figura 7.7. La inhibición de la HDAC1 modifica la memoria de reconocimiento de manera dependiente de la edad. Se observa que la inhibición de la HDAC1 ocasiona efectos diferenciales sobre la memoria de reconocimiento dependiendo de la edad y del tiempo de adquisición. ORM débil: adquisición 3 min, LTM 5 min. ORM fuerte: adquisición 10 min, LTM 5 min. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, *t* de Student.



Los datos muestran que ante una adquisición corta (ORM débil), el grupo joven no puede reconocer al objeto nuevo del familiar, sin embargo el grupo inyectado con el MS-275 es capaz de reconocer el objeto nuevo. Esto se relaciona directamente al tiempo en el cual los animales exploraron ambos objetos durante la fase de adquisición, que si no es suficiente, esta memoria no puede formarse adecuadamente, además nos indica la potenciación debida a la inhibición de la HDAC1. En caso de tener una adquisición normal (ORM fuerte), el grupo Joven Veh es capaz de reconocer al objeto novedoso, mientras el grupo Viejo Veh no logra reconocerlo, **figura 7.7**.

La inhibición de la HDAC1 tiene un efecto diferencial (semejante a lo observado en el CAS fuerte) y parece estar asociado a la edad; en el grupo Joven MS-275 altera la memoria de reconocimiento y este grupo no puede reconocer al objeto novedoso sobre el familiar, por otra parte el grupo Viejo MS-275 mejora la memoria de reconocimiento, ya que se incrementa el índice de reconocimiento del objeto novedoso, **figura 7.7**.

7.4 La inhibición de la HDAC1 no modifica la cantidad de fibras positivas a tirosina hidroxilasa en la corteza insular.

Cuando se realizó la inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa, el análisis de la cantidad de fibras positivas muestra que la inhibición de la HDAC1 no tiene efecto sobre la cantidad de fibras en el área de la corteza insular, esto 1 h post-estimulación novedosa (2 h 20 min post-inyección del inhibidor), **figura 7.8**.

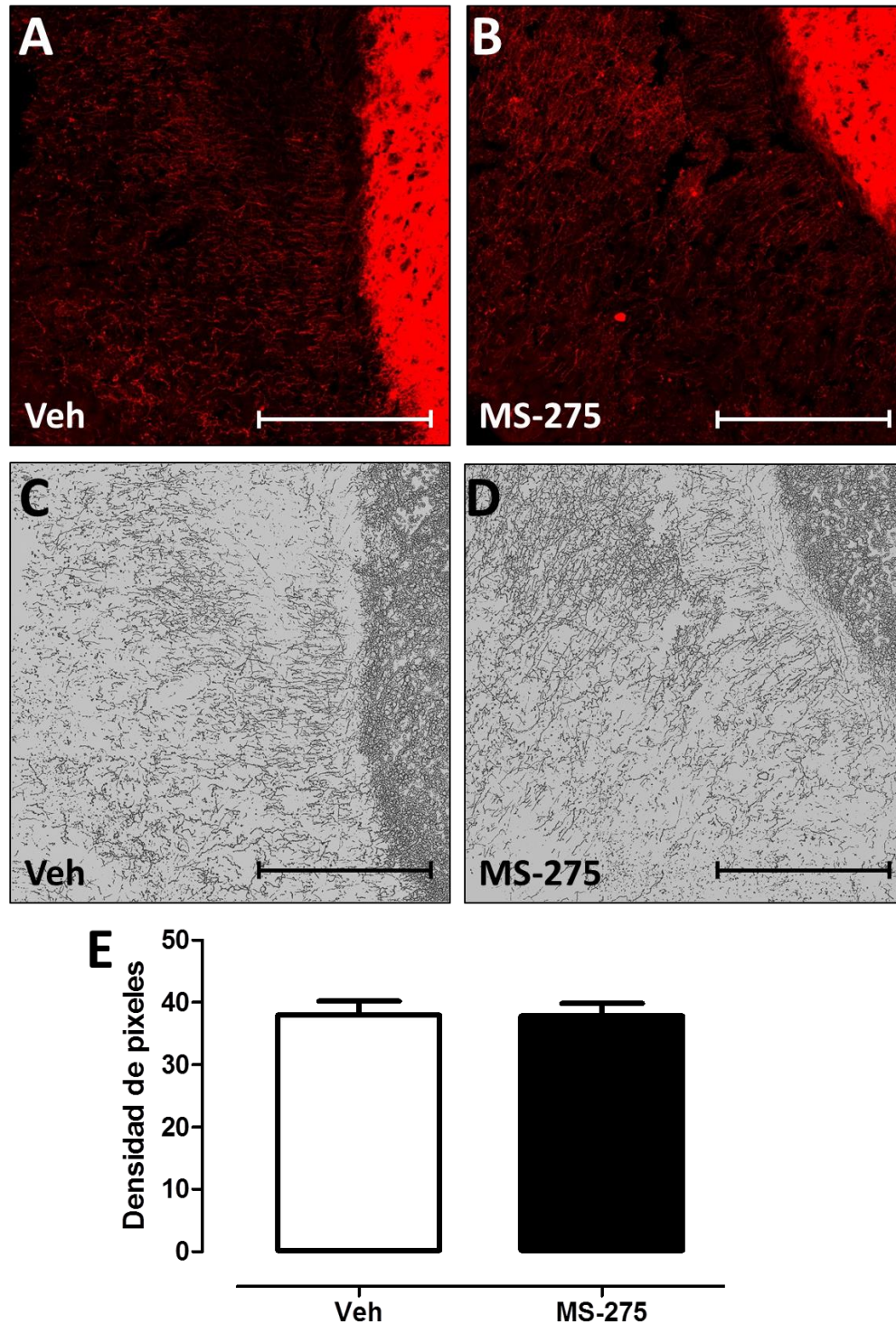


Figura 7.8. La inhibición de la HDAC1 no modifica la cantidad de fibras positivas a tirosina hidroxilasa en la corteza insular de animales viejos. Se muestran en A y B la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa observada en rojo; en C y D se muestran las imágenes binarias obtenidas a partir de las imágenes de A y B con ayuda del filtro Hessian (Image J); en E se muestra la cuantificación de las fibras mostradas en C y D, no mostrando diferencia entre ambos grupos (Barra de escala = 500 μ m).



7.5 La inhibición de HDAC1 no altera la expresión de mRNA de *Bdnf* y *Th*.

El análisis de los niveles de mRNA de *Bdnf* y de *Th* en la IC no muestra diferencia entre los grupos experimentales, **figura 7.9**. Es importante mencionar que sólo se realizó la determinación a 1 tiempo, correspondiente a las 4 h post-adquisición (5.5 h post-inyección del inhibidor), momento en el cual está reportado que ocurre el incremento en la transcripción de *Bdnf* en la IC. Es probable que debido a esto se presentara efecto “techo” y esta pueda ser la causa de no observar modificaciones en los niveles de expresión.

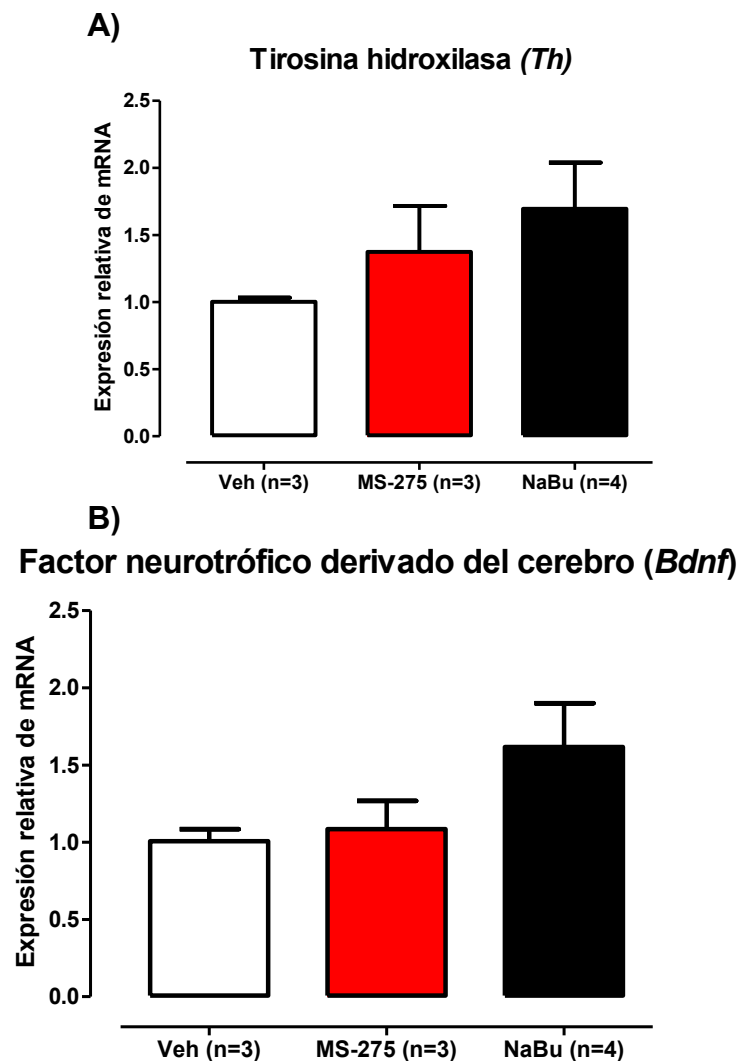


Figura 7.9. La inhibición de la HDAC1 no modifica la expresión de *Bdnf* y *Th* a las 4 h post-adquisición. Se muestran los niveles de expresión relativa de los mRNAs de *Th* (A) y de *Bdnf* (B). No se muestran diferencias entre los grupos experimentales.



8. DISCUSIÓN

El envejecimiento es una etapa fisiológica considerada como un fenómeno emergente debido al incremento en la esperanza de vida de los individuos y que al tratarse de un proceso irreversible es de suma importancia abordar metodologías para evitar las consecuencias observadas en esta etapa de la vida. Debido al deterioro del organismo, se presentan alteraciones que afectan la calidad de vida del individuo. Específicamente en el aprendizaje y la memoria se ha observado una reducción en la capacidad del sujeto en cuanto a la formación de memoria de corto plazo como la de trabajo, también se ha reportado que estas deficiencias se extienden a la memoria de largo plazo (Peinado *et al.*, 2000).

El estudio de los procesos relacionados al envejecimiento en modelos animales ha permitido tener una idea más clara sobre el aprendizaje y la memoria de esta manera se han propuesto tratamientos para mejorar estas condiciones (Arivazhagan *et al.*, 2002; Burke y Barnes, 2006; Cattelan *et al.*, 2015; Dickerson *et al.*, 2009; Dickstein *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2003; McGahon *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1993; Richwine *et al.*, 2008; Silhol *et al.*, 2007). Estas aproximaciones han sido abordadas desde diferentes enfoques y todas ellas muestran efectividad al paliar algunas de las alteraciones presentadas en el envejecimiento (Bennet *et al.*, 2006; Pattel, 2012).

En el aprendizaje y la memoria se ha observado que posterior a la adquisición de una nueva información, ocurren cambios en la cromatina de regiones cerebrales implicadas en este proceso, concretamente se han observado modificaciones en la acetilación de histonas las cuales no se presentan en modelos envejecidos (Peleg *et al.*, 2010) que se asocian al incremento en la actividad enzimática de las desacetilasas de histona (HDAC; Dos Santos *et al.*, 2013) esto ha conducido al análisis de la inhibición de estas enzimas sobre procesos cognitivos. Sin embargo, poco se ha sabe sobre la función de cada una, es decir, en la mayoría de los estudios se han realizado inhibiciones inespecíficas que afectan a la mayoría de las HDAC.

En este proyecto se planteó la inhibición de una de las 18 desacetilasas de histona descritas, específicamente la HDAC1, la aproximación se realizó con el



empleo del inhibidor específico para dicha enzima el entinostat o MS-275 (Khan *et al.*, 2008). Esto debido a que los antecedentes y los estudios de colaboración, **figura 1.10**, sugieren que esta enzima puede tener un papel importante en la modulación de la memoria (Bahari-Javan *et al.*, 2012).

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la HDAC1 por el MS-275 muestra efectos interesantes sobre las memorias gustativa y de reconocimiento. En la adquisición del condicionamiento aversivo al sabor (CAS) cuando se presentan dos bebederos de sacarina para la evaluación de la neofobia se observa que la inhibición de la HDAC1 en la corteza insular (IC) de animales viejos ocasiona modificaciones en la comunicación neuronal, al menos con lo relacionado a la señalización del estímulo novedoso, debido a que el grupo viejo vehículo (Viejo Veh) presenta preferencia por la sacarina, mientras que el grupo Viejo MS-275 no la presenta, **figura 7.3**. Algo que llama la atención es la ausencia de neofobia en el resto de los grupos experimentales, esto parece deberse a la presentación de dos botellas de sacarina lo cual ocasiona que el animal alterne en el consumo entre los bebederos y finalmente incremente el consumo total en comparación con el modelo de CAS de una botella.

Para evaluar la intensidad de los estímulos aunado a la inhibición de la HDAC1 sobre la formación de la memoria gustativa se realizaron dos condiciones de CAS: débil y fuerte. En condiciones de CAS débil (sacarina 0.1%, LiCl 47.6 mg/kg) en animales jóvenes no se establece una memoria de largo plazo (LTM; Joven Veh), mientras que la inhibición de la HDAC1 ejerce un efecto potenciador sobre la formación de esta memoria (Joven MS-275). En condiciones de CAS fuerte (sacarina 0.3%, LiCl 127 mg/kg) que sí genera una memoria en animales jóvenes (Joven Veh) pero no en viejos (Viejo Veh) la inhibición de la HDAC1 en los animales jóvenes produce un bloqueo en la formación de la LTM (Joven MS-275) mientras que favorece la formación de esta en animales viejos (Viejo MS-275), **figura 7.4**. Previamente se ha demostrado que la inyección de un inhibidor inespecífico, como el butirato de sodio, en la corteza insular (IC) de animales jóvenes mejora la memoria aversiva gustativa (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2014), esto parece contradecir los resultados descritos anteriormente; sin embargo es



importante considerar que el trabajo realizado por Núñez-Jaramillo en el 2014 es semejante a nuestras condiciones de CAS débil. Esto sugiere que la HDAC1 está estrechamente relacionada con la consolidación de la memoria gustativa.

En esta misma tarea fueron evaluadas las extinciones que permitieron conocer la estabilidad de la memoria original. Se observó que la inhibición de la HDAC1 en condiciones de CAS débil en jóvenes y de CAS fuerte con envejecimiento existe un retraso en la extinción, lo que indica que el bloqueo de la HDAC1 contribuye a generar una memoria más estable y por lo tanto duradera, **figura 7.5 A y C**. Es importante que en condiciones de CAS fuerte con jóvenes no existen diferencias en el comportamiento durante la extinción y sólo son evidentes en la LTM, **figura 7.5 B**, a pesar de esto el mantenimiento de los porcentajes de consumo alrededor del 50% indican no discriminación de sacarina respecto del agua. Está reportado que la inhibición de la HDAC1 en hipocampo durante las evaluaciones de la memoria de miedo, favorece la estabilización de ésta (Bahari-Javan *et al.*, 2012) produciendo un retraso en la extinción. Sin embargo en nuestras condiciones experimentales la inhibición de la HDAC1 en la corteza insular previa al aprendizaje es suficiente para generar una memoria fuerte que impide la modificación de la memoria original.

La otra tarea conductual analizada fue la memoria de reconocimiento (ORM) llevada a cabo en dos condiciones: débil y fuerte. En el ORM débil (adquisición 3 min) en animales jóvenes no se establece una LTM (Joven Veh), mientras que la inhibición de la HDAC1 potencia la formación de esta memoria (Joven MS-275). En el ORM fuerte (adquisición 10 min) que sí genera una memoria en animales jóvenes (Joven Veh) pero no en viejos (Viejo Veh) la inhibición de la HDAC1 en los animales jóvenes produce un bloqueo en la formación de la LTM (Joven MS-275) mientras que favorece la formación de ésta en animales viejos (Viejo MS-275), **figura 7.7**. Anteriormente se ha mostrado que el empleo de inhibidores inespecíficos administrados por vía intraperitoneal son capaces de favorecer la memoria de reconocimiento de animales jóvenes y viejos (Reolon *et al.*, 2011) y potenciar las memorias débiles en animales jóvenes (Stefanko *et al.*, 2009) sin embargo, debido a la inespecificidad de los fármacos



empleados no permite conocer la participación específica de la HDAC1 en la formación de esta memoria. De manera semejante se ha mostrado que la inhibición de la HDAC1 en el hipocampo favorece la formación de la memoria de localización de objeto (Hawk *et al.*, 2011), este evento refuerza lo reportado en el presente proyecto sobre la participación de la IC en la memoria de reconocimiento. En general el comportamiento conductual de los grupos experimentales en ambas tareas es semejante, por lo que se propone que la participación de la HDAC1 modula de manera semejante la memoria gustativa y de reconocimiento.

De acuerdo a los resultados conductuales, es probable que en la IC de animales jóvenes la regulación de la acetilación de histonas se altere por la inhibición de la HDAC1 ocasionando un bloqueo en la formación de la memoria mientras que en animales envejecidos existan deficiencias en la acetilación de histonas posterior a la adquisición de la memoria gustativa o de reconocimiento (Beldjoud *et al.*, 2015), lo cual podría estar asociado directamente a las alteraciones cognitivas mostradas que son atenuadas por la inhibición de la HDAC1.

También se ha demostrado que las catecolaminas en especial la dopamina, participan en los procesos de formación de la memoria gustativa y de reconocimiento (Guzmán-Ramos *et al.*, 2010, 2012). En nuestros resultados asociados a esta hipótesis no se observaron modificaciones en la cantidad de fibras de Tirosina Hidroxilasa en la IC de animales envejecidos, **figura 7.8**, esto indica que las terminales mantienen su viabilidad posterior a la inhibición de la HDAC1 (2 h post-inhibición), debido a que no ocurre ramificación de dichas terminales.

De acuerdo a nuestro diseño experimental el sacrificio de los animales se realizó a las 4 h post-adquisición (5.5 h post-inhibición) del CAS debido a que Ma *et al.* en el 2011 reportó el incremento en la expresión de mRNA de *Bdnf* a este tiempo. A pesar de esto, en los resultados no se observaron modificaciones en los niveles de expresión de mRNA de *Th* y *Bdnf* en los grupos administrados con el inhibidor, **figura 7.9**. Aunque estudios *in vitro* muestran que el uso de HDACi favorecen la transcripción de *Th* y de *Bdnf* (Akiba *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003;



Koppel y Timusk, 2013) y estudios *in vivo* reportan que la administración sistémica de butirato de sodio aumenta la expresión de *Bdnf* en el hipocampo (Intlekofer *et al.*, 2013), en nuestros resultados no se modifica la expresión de los mRNAs de *Th* y *Bdnf*. Lo anterior se puede explicar por el efecto techo donde no es posible incrementar aún más la tasa de transcripción de estos genes. Un análisis temporal posterior a la inhibición podría ayudar a resolver este punto.

Por un lado es probable que la sobre-activación del gen de *Bdnf* en el animal joven genere efectos negativos sobre la memoria, ya que se ha reportado anteriormente que el exceso de BDNF tiene efectos contraproducentes sobre la cognición (Cunha *et al.*, 2009) por otra parte esta misma sobre-activación tiene efectos positivos en el animal viejo, como se ha demostrado al inyectar BDNF para favorecer la retención del CAS (Castillo *et al.*, 2006).



9. CONCLUSIONES

- Bajo condiciones de aprendizaje fuerte, la inhibición de la HDAC1 en la corteza insular mejora el establecimiento de la memoria aversiva gustativa en animales envejecidos, pero evita la adecuada formación de ésta en animales jóvenes.
- En condiciones débiles de aprendizaje, la inhibición de la HDAC1 en la corteza insular favorece el establecimiento de la memoria aversiva gustativa en animales jóvenes.
- En condiciones de aprendizaje fuerte, la inhibición de la HDAC1 en la corteza insular favorece la formación de la memoria de reconocimiento en animales viejos, mientras que se bloquea en animales jóvenes.
- Las condiciones débiles de aprendizaje junto a la inhibición de la HDAC1 en la corteza insular potencia la memoria en animales jóvenes.
- No existe modificación en la cantidad de fibras positivas a Tirosina Hidroxilasa en la corteza insular de animales envejecidos 2 h post-inhibición de la HDAC1.
- No existe modificación en los niveles de expresión de mRNA de Tirosina Hidroxilasa (*Th*) y del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*Bdnf*) a las 4 h post-adquisición (5.5 h post-inhibición de la HDAC1).



10. REFERENCIAS

- Aid T, Kazantseva A, Piirso M, Palm K, Timmusk T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85: 525-535.
- Akiba Y, Cave JW, Akiba N, Langley B, Ratan RR, Baker H. (2010). Histone deacetylase inhibitors de-repress tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb and rostral migratory stream. *Biochem Biophys Res Comm* 393: 673-677.
- Andero R, Choi DC, Ressler KJ. (2014). Chapter six: BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation and psychiatric disorders. In *Progress in Molecular Biology and translational Science* Vol 122, 169-192 pp.
- Antunes M, Biala G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13: 93-110.
- Arivazhagan P, Panneerselvam C. (2002). Neurochemical changes related to ageing in the rat brain and the effect of DL- α -lipoic acid. *Exp Gerontol* 37: 1487-1492.
- Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bähr M, Burkhardt S, Delalle I, Kügler S, Fischer A and Sananbenesi F. (2012). HDAC1 regulates fear extinction in mice. *J Neurosci* 32: 5062-5073
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of temporal lobe. *Learn Mem* 15: 618-624.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behav Brain Res* 285: 213-222.
- Baltan S, Bachleda A, Morrison RS, Murphy SP. (2011). Expression of histone deacetylases in cellular compartments of the mouse brain and the effects of ischemia. *Transl Stroke Res* 2: 411-423.
- Barco A, Bailey CH, Kandel ER. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 97: 1520-1533.
- Barker PA. (2009). Whither proBDNF? *Nature Neurosci* 12: 105-106.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2008). BDNF and memory formation storage. *The Neuroscientist* 14: 147-156.
- Beldjoud H, Barsegyan A, Roozendaal B. (2015). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala enhances object recognition memory and induces chromatin remodeling in the insular cortex. *Front Neurosci* 9: Article 108.
- Bennett, J., McRae, P., Levy, L., Frick, K. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem*, 85, 139-152.
- Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 209-217.
- Bermúdez-Rattoni F, Prado-Alcalá R. (2008). *Memoria. Dónde reside y cómo se forma*. México: Editorial Trillas.
- Bird A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396-398.
- Brabander JM, Kramers RJK, Uylings BM. (1998). Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *Europ J Neurosci* 10: 1261-1269.
- Burke SN, Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7: 30-40.
- Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. (2010). Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci* 124: 559-573.



- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J and Everitt BJ. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 321-352.
- Castillo DV, Figueroa-Guzmán Y, Escobar ML. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 1067: 250-255.
- Cattelan Souza L, Silva Antunes M, Borges Filho CB, Del Fabbro L, Gomes de Gomes M, Rossito Goes AT, Donato F, Prigol M, Peterini Boeira S, Jesse CR. (2015). Flavonoid chysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharm Biochem Behav* 134: 22-30.
- Choi JK, Howe LJ. (2009). Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol* 87: 139-150.
- Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, Berardi N, Brambilla R. (2009). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Disease* 33: 358-368.
- Dagnas M, Mons N. (2013). Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze. *Hippocampus* 23: 581-591.
- Day JJ, Sweatt JD. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70: 813-829.
- De Brabander JM, Kramers RJK, Uylings HBM. (1998). Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *Europ J Neurosci* 10: 1261-1269.
- Dickerson JW, Hemmerle AM, Numan S, Lundgren KH, Seroogy KB. (2009). Decreased expression of ErbB4 and tyrosine hydroxylase mRNA and protein in the ventral midbrain of aged rats. *Neurosci* 163: 482-489.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. (2007). Changes in the structural complexity of aged brain. *Aging Cell* 6: 275-284.
- Dickstein DL, Weaver CM, Luebke JI, Hof PR. (2013). Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neurosci* 251: 21-32.
- Dong HW. (2008). Allen Reference Atlas. A digital color brain atlas of the C57BL/6J male mouse. John Wiley & Sons Inc. China.
- Dos Santos SA G, Rostiola E V, Moysés F, Reck C L, Agustini L C, Rodrigues S I. (2013). Histone deacetylase activity is altered in brain áreas from aged rats. *Neurosci Lett* 556: 152-154.
- Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR. (2003). Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex* 13: 950-961.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 852: 208-212.
- Friedman W. (2012). Chapter 29 Growth Factors. In: Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology, 8th edition. Edited by: Siegel GJ and Brady ST. Academic Press. USA.
- Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S and Jones KR. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* 23: 6856-6865.
- Guzmán-Ramos K, Osorio-Gómez D, Moreno-Castilla P, Bermúdez-Rattoni F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *J Neurochem* 114: 226-236.
- Guzmán-Ramos K, Moreno-Castilla P, Castro-Cruz M, McGaugh JL, Martínez-Coria H, LaFerla FM, Bermúdez-Rattoni F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn Mem* 19: 453-460.



- Hawk JD, Florian C, Abel T. (2011). Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learn Mem* 18: 367-370.
- Intlekofer KA, Berchtold NC, Malvaez M, Carlos AJ, McQuown SC, Cunningham MJ, Wood M and Cotman CW. (2013). Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neuropharmacology* 38: 2027-2034.
- Kandel E, Pittenger C. (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Phil Trans R Soc Lond* 354: 2027-2052.
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M. (2008). Determination of the class and isoform selectivity of small molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 409: 581-589.
- Kim HS, Park JS, Hong SJ, Woo MS, Kim SY, Kim KS. (2003). Regulation of tyrosine hydroxylase gene promoter by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 950-957.
- Koppel I, Timmusk T. (2013). Differential regulation of *Bdnf* expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Neuropharmacology* 75: 106-115.
- Levenson JM, O'Riordan J, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279: 40545-40559.
- Ma L, Wang DD, Zhang TY, Yu H, Huang Y, Huang SH, Lee FS and Chen ZY. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *J Neurosci* 31: 2079-2090.
- McGahon BM, Martin DSD, Horrobin DF, Lynch MA. (1999). Age-related changes in LTP and antioxidant defenses are reversed by an α -lipoic acid-enriched diet. *Neurobiol Aging* 20: 655-664.
- Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* 20: 7116-7121.
- Moore CI; Browning MD; Rose GM. (1993). Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3 (1): 57-66.
- Morgado I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol* 40: 289-297.
- Núñez-Jaramillo L, Reyes-López J, Miranda I. (2014). Sodium butyrate into insular cortex during conditioned taste aversion acquisition delays aversive taste memory extinction. *NeuroReport* 25: 386-390.
- Papaleo F, Silverman JL, Aney J, Tian Q, Barkan CL, Chadman KK, Crawley JN. (2011). Working memory deficits, increased anxiety-like traits and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem* 18: 534-544.
- Patel TR. (2012). Environmental enrichment: Aging and memory. *Yale J Biol Med* 85: 491-500.
- Peinado MA, del Moral ML, Esteban FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Jiménez A, Hernández-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J, Pedrosa JA. (2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol* 31: 1054-1065.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A. (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328: 753-756.
- Rattan SIS. (2004). Aging, anti-aging, and hormesis. *Mech Ageing Develop* 125: 285-289.



- Reilly S and Bornoalova MA (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: A critical review. *Neurosci Behav Rev* 29: 1067-1088.
- Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schröder N, Wood MA, Roesler R. (2011). Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Brain Behav Res* 221: 329-332.
- Richwine AF, Parkin AO, Buchanan JB, Chen J, Markham JA, Juraska JM, Johnson RW. (2008). Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation. *Psychoneuroendocrinol* 33: 1369-1377.
- Rodríguez-Durán LF, Castillo DV, Moguel-González M, Escobar ML. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiol Learn Mem* 95: 519-526.
- Rodríguez-Serrano LM, Ramírez-León B, Rodríguez-Durán LF, Escobar ML. (2014). Acute infusión of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction. *Neurobiol Learn Mem* 116:139-144.
- SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*.
- Silhol M, Arancibia S, Murice T, Tapia-Arancibia L. (2007). Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in Young and aged rats. *Neurosci* 146: 962-973.
- Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L. (2005). Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neurosci* 132: 613-624.
- Swank MW, Sweatt JD. (2001). Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J Neurosci* 21: 3383-3391.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *PNAS* 106: 9447-9452.
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood M. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27: 6128-6140.
- Wetzell BB, Muller MM, Flax SM, King HE, DeCicco-Skinner K, Riley AL. (2015). Effect of preexposure on methylphenidate-induced taste avoidance and related BDNF/TrkB activity in the insular cortex of rat. *Psychopharmacol* 232: 2837-2847.
- Xi J, Ma L, Zhang TY, Yu H, Wang Y, Kong L and Chen ZY. (2014). Involvement of BDNF signaling transmission from basolateral amygdala to infralimbic prefrontal cortex in conditions taste aversion extinction. *J of Neurosci* 34: 7302-7313.
- Yamamoto T and Ueji K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Front Systems Neurosci* 5: 1-7.



11. ANEXOS

11.1 Estandarización de condiciones para PCR.

Estandarización de condiciones para oligonucleótidos por PCR punto final. Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes:

BDNF-F	5'-TAAATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACA-3'
BDNF-R	5'-AGTTGTGCGCAAATGACTGTTT-3'
Actb-F	5'-CCTCCCTGGAGAAGAGCTATG-3'
Actb-R	5'-TTACGGATGTCAACGTCACAC3'
TH-F	5'-GTGGAGTTTGGGCTGTGTAA-3'
TH-R	5'-TTGGCATCACTGAAGCTCTC-3'

Mezcla de reacción. Para una reacción se requiere lo siguiente:

Componentes del Master Mix (GeneAmp® RNA PCR Core Kit, Cat. N8080143):

- Buffer (10x) 2.0 µl
- Mg²⁺ 50 mM 0.8 µl
- dNTPs 0.5 µl
- H₂O 12.6 µl
- Taq pol 0.1 µl
- Oligo F 10 µM 1.0 µl
- Oligo R 10 µM 1.0 µl

Los oligos F y R se adicionaron al Master Mix para cada uno de los genes a analizar. Finalmente a 18 µl de mezcla de reacción se le adiciona 2 µl de cDNA.

Se eligieron 4 temperaturas de reacción para cada gen: 58, 60, 62 y 64 °C con sólo una repetición por temperatura. Los controles negativos se realizaron de la misma forma en la que fueron realizadas las muestras, sólo que en lugar de cDNA se adicionó 1 µl de agua libre de RNAsa y éstos reaccionaron a 64 °C.

El termociclador se programó con 1 ciclo de 5 min a 95 °C; 40 ciclos de 30 s a 95 °C, seguido de 1 min a cada una de las temperaturas seleccionadas (58, 60, 62 ó 64 °C) posteriormente 35 s a 72 °C; finalmente 1 ciclo de 7 min a 72 °C seguido de tiempo indefinido a 23 °C.



Gel de agarosa 2% para observación de productos de amplificación.

Soluciones empleadas. *Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 5x.* Se preparó a una concentración final de 445 mM Tris base, 445 mM de borato y 10 mM de EDTA aforado con agua libre de DNA y RNAsa.

El gel se preparó con 2 g de agarosa en 100 ml de TBE 0.5x, se calentó la mezcla para que la agarosa se suspendiera, posteriormente se adicionó 1 µl de GelRed.

Terminada la PCR punto final, se adicionaron de 3 a 5 µl de buffer de carga y se cargaron las muestras en el gel; para el marcador de peso molecular se adicionó 1 µl. Se corrió el gel a 75 V hasta que el azul de bromofenol llegó aproximadamente a la mitad del gel (aproximadamente 1 h).

Una vez terminado el corrimiento del gel, se observó en cámara de luz UV. La presencia de las bandas sugirió que la mejor temperatura de amplificación para los tres genes: *Bdnf*, *Th* y *Actina b (Actb)* fue de 60 °C, además de que corresponde al promedio teórico de los oligonucleótidos, **figura 11.1.**

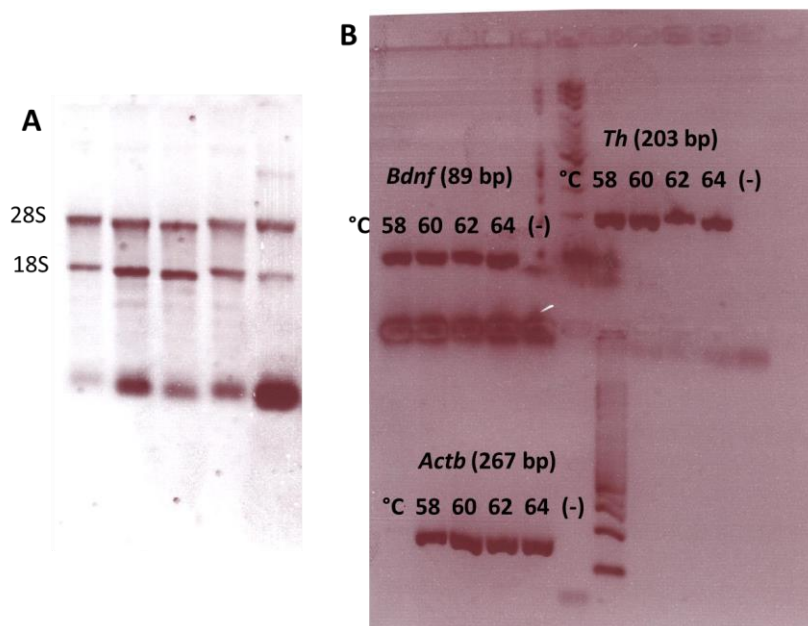


Figura 11.1. Estandarización de oligonucleótidos. Se realizó la extracción del tejido (estriado, corteza insular e hipocampo) de 2 ratones intactos jóvenes para estandarizar la reacción de PCR. En A se muestra en el gel la integridad de RNA, observando las bandas características que corresponden a los RNA ribosomales 28S y 18S. En B se muestra el gel correspondiente a PCR punto final de cada uno de los genes de interés (*Bdnf*, *Th* y *Actina b*) analizados en la corteza insular.



Una vez determinada la temperatura de amplificación (60 °C) se realizó qPCR para la cuantificación de mRNA, **figura 11.2**. Por un lado se observó, gracias a las curvas de disociación, que los amplicones son específicos para cada gen, ya que sólo se observaron 3 picos, **figura 11.2 C**, correspondientes a cada uno de los genes analizados, por otra parte se aprovechó el análisis para cuantificar los niveles de mRNA de dos animales intactos, mostrando un evento esperado: un nivel alto de mRNA de *Th* en estriado en comparación con el existente en la corteza insular o el hipocampo, esto ocurre de manera contraria para *Bdnf*.

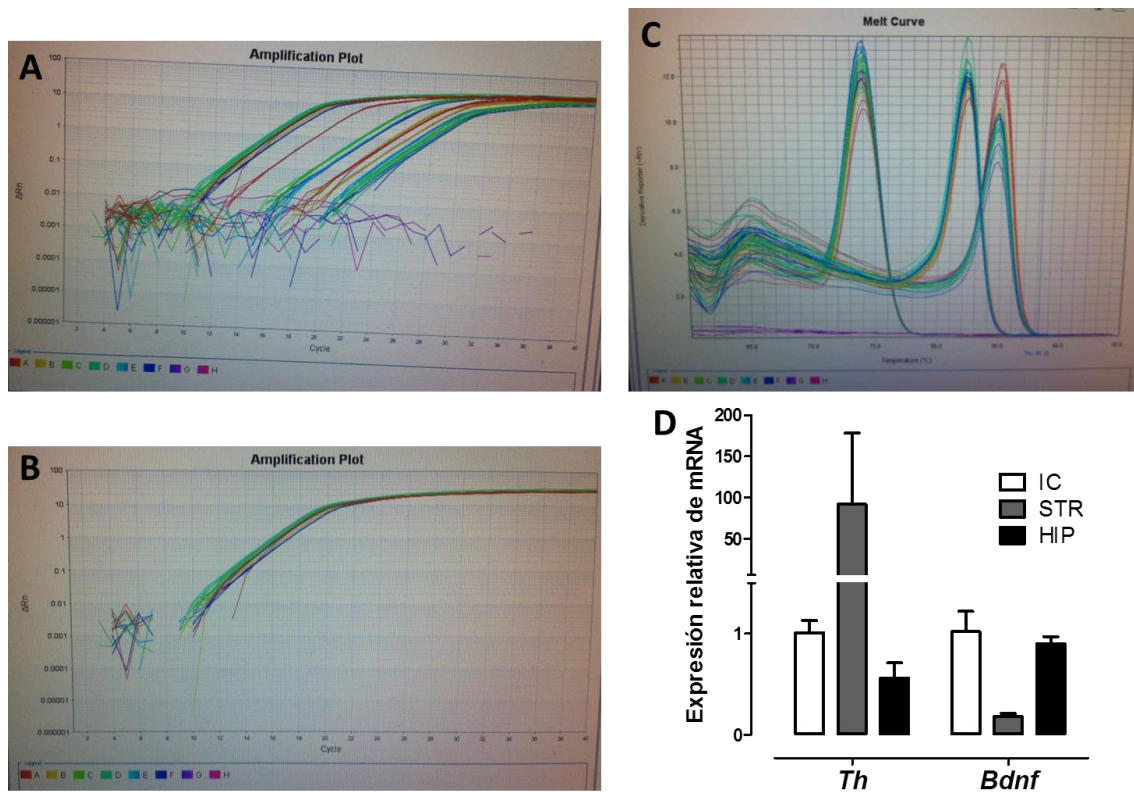


Figura 11.2. Realización de qPCR en ratón intacto joven. En A se muestra la curva de amplificación de cada muestra realizada por cuadruplicado, observándose que todas las muestras llegan a una meseta de amplificación. En B se observa sólo la curva de amplificación de actina b, mostrando homogeneidad en la amplificación de cada una de las muestras. En C las curvas de disociación indican que los amplicones son únicos para cada uno de los genes analizados, ya que sólo se observan 3. En D la gráfica corresponde a lo obtenido por análisis según el método de $\Delta\Delta C_T$, se observa que existe una gran cantidad de mRNA de *Th* en estriado, mientras existe poco en la corteza insular e hipocampo, ocurriendo lo contrario para el mRNA de *Bdnf*. Corteza insular (IC), Estriado (STR), Hipocampo (HIP).



11.2 Constancias

El alumno recibió la capacitación adecuada para el trabajo con los animales de experimentación.

	
<p>Instituto de Fisiología Celular</p>	
<p>El Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México</p>	
<p>Otorga la presente</p>	
<h1>Constancia</h1>	
<p><i>A:</i></p>	<p><i>QFB Gerardo Ramírez Mejía</i></p>
<p>Como asistente del:</p>	
<p>“Taller de Manejo y Uso de Animales de Laboratorio”</p>	
<p>Impartido en la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular del 3 al 5 de marzo de 2014.</p>	
	
<p>Dr. Julio Merán Andrade Secretario Académico I.F.C.</p>	<p>MVZ Claudia V. Rivera Cerecedo Jefe Unidad Académica Bioterio</p>
<p>Duración 9 hrs. Cd. Universitaria, México D.F. a 4 de Marzo de 2014</p>	



El Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de
México

Otorgan la presente

Constancia

A:

QFB Gerardo Ramírez Mejía

Como **Asistente** del "Curso de Cirugía Básica en Roedores"
Realizado en la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular


DR. JULIO MORAN ANDRADE
Secretario Académico


MVZ CLAUDIA V. RIVERA CERECEDO
Jefe Unidad Académica Bioterio

Valor Curricular 6 hrs.
México D.F. a 9 de junio de 2014.



11.3 Congresos



Parte de los resultados del presente proyecto, fueron enviados, aceptados y presentados en el *44th Annual Meeting* y en el *45th Annual Meeting* de la *Society for Neuroscience*, celebradas en la ciudad de Washington D.C. del 15 al 19 de noviembre de 2014 y en la ciudad de Chicago del 17 al 21 de octubre de 2015 respectivamente, con los siguientes títulos:

2014

“The inhibition of histone deacetylase rescues synaptic plasticity and memory function in aged mice”

G. Ramirez-Mejia, P. Moreno-Castilla, L. Rodriguez-Duran, M.L. Escobar, F. Bermudez-Rattoni.

2015

“Age-dependent effect of histone deacetylase inhibition on synaptic plasticity and memory”

G. Ramirez-Mejia, P. Moreno-Castilla, L. Rodriguez-Duran, M.L. Escobar, F. Bermudez-Rattoni.