



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
Instituto de Neurobiología

**CAMBIOS PLÁSTICOS EN EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS  
SABORES (CAS): GAP-43 Y SINAPTOFISINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Que presenta:

M. en C. Lucia Elhy Grijalva Contreras

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Raúl Paredes Guerrero  
Instituto de Neurobiología

Comité Tutor:

Dra. María Isabel Miranda Saucedo  
Instituto de Neurobiología  
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Querétaro, Qro. Marzo 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Agradecimientos Institucionales**

Agradecemos la asistencia técnica de Francisco Javier Camacho, Deisy Gasca, Martín García, Alejandra Castillo, Analía Castro y Jessica González Norris, a CONACYT por la beca otorgada. A mis compañeros del laboratorio D11 que siempre estuvieron apoyándome gracias, Mariana, Dulce, Elisa, Rebeca, Pau.

#### **A mi esposo**

Has hecho todo para que yo llegue a este punto. Quiero agradecerte todo lo que me has apoyado, el esfuerzo que realizaste para que yo pudiera cumplir con este proyecto. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome, eres al que más tengo que agradecer porque siempre formamos un gran equipo. Sin ti no habría logrado mi sueño y no existen suficientes palabras para agradecerte todo lo que hemos logrado juntos. Gracias.

#### **A mis niñas**

Que fueron mi constante motor para la realización de este proyecto, que vinieron a aderezarlo y a enriquecerlo de nuevos matices, ellas crecieron con este proyecto y les agradezco su paciencia y los días donde mamá no jugo por estar redactando la tesis. Gracias.

#### **A mis padres**

Siempre han sido un pilar fundamental en mi vida, les agradezco enormemente por siempre mostrarme el camino a la superación, gracias por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar mi meta. Hoy realizo mi última tesis, pero siempre estaré agradecida por su esfuerzo y dedicación. Gracias.

#### **A mi asesor**

Le agradezco infinitamente el constante apoyo, más que un asesor de tesis fue una pieza fundamental en mi desarrollo como investigadora, le agradezco todo su tiempo y su paciencia. Gracias.

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPITULO 1 CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES (CAS).....</b>	<b>11</b>
1.1 Características generales.....	11
1.2 Neuroanatomía del CAS.....	12
1.3 Integración de la información.....	13
1.4 Estructuras involucradas en la memoria gustativa.....	14
1.4.1 Amígdala.....	14
1.4.2 Corteza Insular .....	15
<b>CAPITULO 2 PLASTICIDAD NEURONAL.....</b>	<b>17</b>
2.1 Mecanismos asociados a la plasticidad.....	20
2.1.1 Sinaptogénesis.....	20
2.1.2 Neurogénesis.....	22
2.1.3 Expresión de proteínas.....	23
2.1.3.1 GAP-43.....	25
2.1.3.2 Sinaptofisina.....	27
<b>CAPITULO 3 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO 4 HIPOTESIS Y METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
4.1 HIPOTESIS.....	30
4.2 OBJETIVOS GENERALES.....	30
4.2.1 Objetivos Particulares.....	30
4.3 METODO GENERAL.....	30
4.3.1Sujetos.....	31

4.4 Estrategia experimental.....	31
4.5 Procedimiento.....	33
4.5.1 CAS.....	33
4.5.2 Inmunohistoquímica.....	33
4.5.2.1 GAP-43 y Syn.....	33
4.5.3 Análisis Estadístico.....	35
<b>CAPITULO 5 EXPERIMENTO 1 .....</b>	<b>35</b>
<b>Evaluación de GAP-43 y SYN 24 hrs después de la adquisición.</b>	
5.1 MÉTODO.....	35
5.1.1 Grupos y tratamientos.....	35
5.1.2 Análisis de imágenes.....	36
5.2 RESULTADO.....	36
5.3 CONCLUSIÓN EXPERIMENTO 1 ADQUISICIÓN.....	45
<b>CAPITULO 6 EXPERIMENTO 2 .....</b>	<b>46</b>
<b>Evaluación de GAP-43 y SYN 24 hrs después de la primera evocación.</b>	
6.1 MÉTODO.....	46
6.1.1 Grupos y tratamientos.....	46
6.1.2 Análisis de imágenes.....	46
6.2 RESULTADO.....	47
6.3 DISCUSIÓN EXPERIMENTO 2 EVOCACIÓN.....	52
<b>CAPITULO 7 EXPERIMENTO 3.....</b>	<b>53</b>
<b>Evaluación de GAP-43 y SYN en la extinción</b>	
7.1 MÉTODO.....	53
7.1.1 Grupos y Tratamientos.....	53
7.1.2 Análisis de imágenes.....	53

7.2 RESULTADO.....	54
7.3 DISCUSIÓN EXPERIMENTO 3 EXTINCIÓN.....	62
CAPITULO 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
CAPITULO 9 CONCLUSIÓN GENERAL.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71

## ABSTRACT

The association between events in time and space is an important mechanism for all animals, including humans, that allows them to learn about the world and possibly change their behavior in the future to adapt to different environments. Taste aversive conditioning (CAS) is a single trial learning paradigm in which animals learn to avoid a novel taste associated with gastric malaise. Many variables can be analyzed with this model and the circuits involved are well described. The amygdala and the insular cortex (IC) are some of the relevant structures involved in memory formation in the CAS. In the present study we focus on the plastic changes that occur during the formation of taste-aversive and appetitive memories. Previous studies have shown that memory consolidation, in hippocampus-dependent paradigms, induces plastic changes such as an increase in the concentration of proteins considered markers of neuronal plasticity, such as axonal growth-associated protein (GAP-43) and synaptophysin (SYN). In the present work, three experiments were carried out where we evaluated changes in the expression of GAP-43 and SYN, through immunodetection induced by the formation of aversive and appetitive taste memory in male rats, measuring the stages of learning, at the time of acquisition, the evocation and extinction. We found in Acquisition Experiment I that taste-aversive memory formation induces an increase in GAP-43 in the IC granular layer. Furthermore, we also found an increase in SYN expression in both layers of the IC, as well as in the basolateral amygdala (BLA) and central amygdala (CeA). In Experiment 2 at the recall stage we found an increase in GAP-43 expression in

appetitive memory in the BLA. In Experiment 3, when evaluating evocation, it was found that there is an increase in the expression of GAP-43 in the central nucleus of the amygdala (CeA), in addition to an increase in the expression of SYN in the BLA and in the CeA, in the extinction of the group that was given an overtraining. These results suggest that aversive memory representation induces a new circuit (inferred by an increase in GAP 43). On the other hand, appetitive taste learning (by saccharin) increased SYN expression in both the IC layers, as well as in the BLA and CeA without any change in GAP 43. Together, these results indicate that memory formation aversive memory induces structural and synaptic changes, while appetitive memory induces synaptic changes; suggesting that aversive and appetitive memories require a different set of cortical and AMG plastic changes. In addition, in the overtrained group (Double CAS), more robust changes were observed with respect to extinction than the group with a single CAS, inferring that the extinction of an aversive memory in overtraining may induce more plastic changes.



## RESUMEN

La asociación entre eventos en el tiempo y el espacio es un mecanismo importante para todos los animales, incluidos los humanos, que les permite aprender sobre el mundo y potencialmente cambiar su comportamiento en el futuro para adaptarse a diferentes ambientes. El condicionamiento aversivo al sabor (CAS) es un paradigma de aprendizaje de ensayo único en el que los animales aprenden a evitar un sabor novedoso asociado con el malestar gástrico. Se pueden analizar muchas variables con este modelo y los circuitos involucrados están bien descritos. La amígdala y la corteza insular (CI) son algunas de las estructuras relevantes involucradas en la formación de la memoria en el CAS. En el presente estudio nos enfocamos en los cambios plásticos que ocurren durante la formación de las memorias gustativa aversiva y apetitiva. Estudios anteriores han demostrado que la consolidación de la memoria, en paradigmas dependientes del hipocampo, induce cambios plásticos como el aumento en la concentración de proteínas consideradas como marcadores de plasticidad neuronal, como la proteína asociada al crecimiento axonal (GAP-43) y la sinaptofisina (SYN). En el presente trabajo se realizaron tres experimentos donde evaluamos cambios en la expresión de GAP-43 y SYN, mediante inmunodetección inducida por la formación de memoria gustativa aversiva y apetitiva en ratas macho, midiendo las etapas del aprendizaje, al momento de la adquisición, la evocación y la extinción. Encontramos en el Experimento I de adquisición que la formación de memoria gustativa aversiva induce un aumento de

GAP-43 en la capa granular del CI. Además, también encontramos un aumento en la expresión de SYN en ambas capas de la CI, así como en la amígdala basolateral (BLA) y la amígdala central (CeA). En el Experimento 2 en la etapa de evocación encontramos un aumento en la expresión de GAP-43 en la memoria apetitiva en la BLA. En el Experimento 3 al evaluar la evocación se encontró que hay un aumento de la expresión de GAP-43 en el núcleo central de la amígdala (CeA), además un aumento en la expresión de SYN en la BLA y en la CeA, en la extinción del grupo al que se le dio un sobre entrenamiento. Estos resultados sugieren que la representación de la memoria aversiva induce un nuevo circuito (inferido por un aumento en GAP 43). Por otro lado, el aprendizaje del gusto apetitivo (por sacarina) aumentó la expresión de SYN en ambas capas la CI, así como en la BLA y la CeA sin ningún cambio en GAP 43. Juntos, estos resultados indican que la formación de la memoria aversiva induce cambios estructurales y sinápticos, mientras que la memoria apetitiva induce cambios sinápticos; sugiriendo que los recuerdos aversivos y apetitivos requieren un conjunto diferente de cambios plásticos corticales y en la AMG. Además, en el grupo de sobre-entrenamiento (Doble CAS), se observaron cambios más robustos con respecto a la extinción del grupo con un solo CAS infiriendo que la extinción de una memoria aversiva en un sobre-entrenamiento puede inducir más cambios plásticos.

## ABREVIATURAS

- CAS** Condicionamiento aversivo al sabor
- EC** Estímulo condicionado
- EI** Estímulo incondicionado
- CI** Corteza insular
- BLA** Amígdala Basolateral
- CeA** Amígdala Central
- SYN** Sinaptofisina
- DOBLE** Grupo con doble entrenamiento de CAS
- i.p.** Intraperitoneal
- AMG** Amígdala
- AP** Área postrema
- Dis** Subnúcleo dorsolateral
- Els** Subnúcleo exterior lateral
- NBM** Núcleo basal magnocelular
- NTS** Núcleo del tracto solitario
- PBN** Núcleo parabraquial
- VPL** Núcleo lateral posterior ventral del tálamo
- VPM** Núcleo ventral posteromedial del tálamo.
- GAP-43** Proteína de crecimiento axonal
- SYN** Sinaptofisina

## INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades fundamentales del sistema nervioso central es la capacidad de cambiar, ajustarse o adaptarse durante el desarrollo y la vida adulta. Este proceso de plasticidad resulta esencial para el aprendizaje y la memoria. El aprendizaje es el cambio en el comportamiento relativamente permanente, o un comportamiento potencial, que ocurre como resultado de la práctica o experiencia (Carleton et al., 2010). Se le considera comportamiento potencial ya que el aprendizaje muy a menudo ocurre sin mostrar inmediatamente el comportamiento aprendido. Sin embargo, cuando las condiciones son idóneas, se presenta el cambio en la conducta. Dentro de los diferentes modelos de aprendizaje, el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) tiene varias características que han demostrado su utilidad, como un modelo de aprendizaje muy útil para entender las bases bioquímicas y moleculares de los circuitos neuronales involucrados en la formación de la memoria (Núñez-Jaramillo et al., 2010; Bermudez - Rattoni, 2004). Este condicionamiento consiste en asociar un sabor novedoso, estímulo condicionado (EC), con una sustancia que produzca malestar, estímulo incondicionado (EI). Usualmente se utiliza como EC sacarina y como EI una solución de cloruro de Litio (LiCl), el cual es inyectado intraperitonealmente (Nachman&Ashe, 1975). La consecuencia de esta asociación se presenta en la segunda exposición con el EC, si el consumo de EC disminuye se concluye que el

animal aprendió a relacionar el sabor con el malestar gástrico inducido por el LiCl (Bermúdez - Rattoni, 2004).

## **CAPITULO 1**

### **CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES**

#### **1.1 Características generales**

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) es un claro ejemplo de la respuesta adaptativa hacia un estímulo dañino y tiene como resultado una aversión a dicho estímulo. La asociación entre eventos en el tiempo y espacio es un mecanismo importante en todos los animales, incluyendo al humano, para poder experimentar y potencialmente cambiar el comportamiento en futuras circunstancias. El CAS ha demostrado ser un modelo muy útil para el entendimiento de las bases moleculares del aprendizaje (Bermúdez-Rattoni et al., 2004).

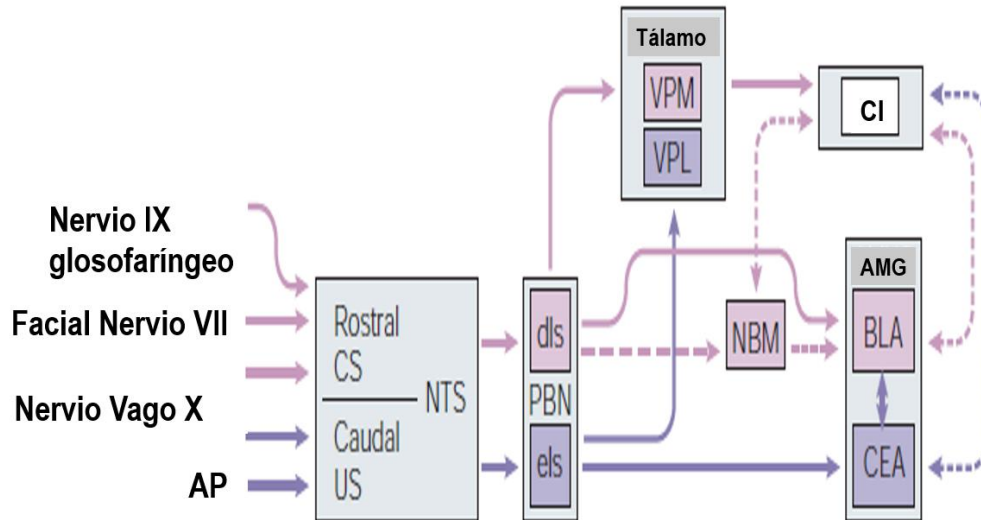
El primero en describir este condicionamiento fue John García en 1955, demostrando que se podía tener una aversión a la sacarina, cuando este sabor era seguido a una exposición a rayos gamma. Describiendo así a la sacarina como el estímulo condicionado (EC) y los rayos gamma como el estímulo incondicionado (EI). Esto permitió conocer por medio de un modelo sencillo el procesamiento de estímulos en un aprendizaje fundamental para la supervivencia de las especies y eventualmente estudiar la formación de la memoria gustativa (García et al., 1985).

Dentro de este condicionamiento se pueden medir dos trazos de la memoria gustativa. Por un lado, la respuesta hedónica hacia un sabor determinado que puede ser fácilmente analizada, observando y midiendo los movimientos faciales en respuesta a un sabor novedoso y cuantificando su consumo y, por otro lado, la

aversión a un sabor. Se ha propuesto que tanto la preferencia a un sabor como la aversión, son dos extremos continuos de la memoria gustativa. Por lo tanto, la comida puede ser catalogada como segura familiar o aversiva familiar. Tanto la memoria aversiva como la segura o apetitiva dependen de un correlato neuronal. Estas memorias no se procesan paralelamente, si no que tienen correlaciones similares, pero en un punto existe una diferenciación en el proceso (para una revisión ver Bermúdez-Rattoni, 2004).

## **1.2 Neuroanatomía involucrada en el Condicionamiento Aversivo a los Sabores**

Existe una diversidad de trabajos que han demostrado las vías de señalización del gusto (Bermúdez-Rattoni, 2004; Yamamoto et al., 1994; Yamamoto et al., 1998; Ramírez-Lugo et al., 2003). La codificación inicia desde los receptores de la lengua y la boca que proyectan a la parte posterior del núcleo del tracto solitario (NTS) por medio del nervio facial (par craneal VII), y el nervio glossofaríngeo (par craneal IX), y a partir de la laringe y faringe la información viaja a través del nervio vago (par craneal X). Las neuronas del NTS proyectan hacia el núcleo parabraquial (NP) y desde esta estructura se proyectan dos vías, una hacia el hipotálamo lateral y amígdala (AMG), y otra hacia la parte parvocelular del núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM). De ahí se manda la información hacia la corteza insular (CI), también se ha descrito que existen proyecciones bilaterales de la AMG hacia la CI (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de las vías principales del procesamiento del sabor.** AMG, amígdala; AP, área postrema; BLA, núcleo basolateral de la amígdala; CEA, núcleo central de la amígdala; CS, estímulo condicionado; dls, subnúcleo dorsolateral; els, subnúcleo exterior lateral; CI, Corteza insular; NBM, núcleo basal magnocelular; NTS, núcleo del tracto solitario; PBN, núcleo parabraquial; VPL, núcleo lateral posterior ventral del tálamo; VPM, núcleo ventral posteromedial del tálamo. Las líneas solidas representan axones que llevan información gustativa o visceral. Las líneas punteadas representan proyecciones que se saben que están involucradas en el CAS (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

### 1.3 Integración de la información

La información referida del sabor y las vías viscerales convergen en diversas estructuras cerebrales, donde el sabor y el malestar estomacal pueden asociarse, para formar una memoria gustativa. Muchos de los circuitos descritos se han concebido como circuitos estáticos, sin tomar en cuenta mecanismos de

retroalimentación. Las estructuras involucradas en el CAS que han sido ampliamente estudiadas son: el NTS, NP, AMG y CI. Se han reportado estudios de lesiones en el NTS antes de la presentación del sabor y se da una interrupción en la formación del CAS. Esto no ocurre cuando se lesiona este núcleo después de la presentación de sabor, infiriendo así que el NTS es importante para la percepción del sabor, pero no así para la formación de la memoria gustativa (Bernstein et al, 2007).

## **1.4 Estructuras involucradas en la memoria gustativa**

### **1.4.1 Amígdala**

Localizada en el lóbulo temporal, la amígdala es una región heterogénea que puede ser dividida en varios núcleos. La AMG tiene un complejo arreglo de conectividad de aferencias y eferencias. En el CAS, la amígdala juega un papel importante en el sistema gustativo central y en el sistema visceral central (Reilly et al., 2005). La información que constituye el sabor está relacionada con varias estructuras cerebrales, como ya se explicó previamente, pero las proyecciones de la CeA, la corteza gustativa (CI), y las fibras que conectan estas estructuras, son ampliamente consideradas como fundamentales para la adquisición, consolidación y evocación del CAS (Gutiérrez et al., 1999; Miranda et al., 2003; Bernstein et al., 2007).

También existe evidencia que la conectividad estrecha del BLA y la CI, es vital para la adquisición de la memoria gustativa, ya que por estudios de lesiones de esta vía se observa un efecto en la adquisición del condicionamiento (Guzmán-Ramos et al., 2012; Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991). Además de que se ha



demostrado que la CeA está involucrada en el CAS también se ha observado por medio de estudios de C-fos (marcador de actividad celular) que el CeA juega un papel fundamental en el procesamiento de sabores novedosos (Bernstein et al., 2007). Partiendo de esta evidencia, en el presente estudio evaluamos a GAP-43 Y SYN como posibles cambios plásticos en el BLA y en la CeA en la formación de la memoria aversiva y la memoria apetitiva.

#### **1.4.2 Corteza insular**

La corteza insular o ínsula (CI) se encuentra ubicada en el lóbulo lateral del cerebro, dentro del surco lateral (cisura de Silvio), que separa las cortezas, temporal y parietal inferior. La CI se divide en tres capas: granular, disgranular y agranular. También se ha observado que en el nivel más superior de la ínsula recibe proyecciones de: información visceral y somato sensorial (dolor y temperatura). Por otra parte, se ha demostrado por medio de estudios de lesiones permanentes o temporales que la CI juega un papel importante en la consolidación y retención de la memoria en el CAS (Bernstein et al., 2005; Rodríguez-García et al., 2016).

## CAPITULO 2

### PLASTICIDAD NEURONAL

La plasticidad es un término muy utilizado en neurociencias. En el caso del sistema nervioso central, se define como la capacidad de ajustarse o adaptarse durante el desarrollo y la vida adulta (Purves et al., 2001). Esta propiedad general y fundamental del sistema nervioso, está asociada a diversos eventos, como el aprendizaje, la memoria, la estimulación eléctrica, el ejercicio, etc. (Kolb y Whishaw, 1998). La forma más conocida de plasticidad neuronal es la plasticidad sináptica, que se refiere a los cambios a corto, mediano y largo plazo, que se expresan en la reducción o en el incremento de la eficiencia sináptica (Bendotti et al., 1994). Existen dos formas principales de la plasticidad sináptica: homosináptica y heterosináptica. La plasticidad homosináptica está relacionada con la sinapsis misma, la cual permite que la cantidad de neurotransmisor se modifique como resultado de una actividad previa en la terminal. La plasticidad heterosináptica se refiere a sinapsis que fueron tetanizadas indirectamente a través de otra entrada (Palikhova, 2000).

En buena medida, la plasticidad del sistema nervioso concierne, pues, a la posibilidad de modificación del tipo, forma, número y función de las sinapsis y, por ende, de los circuitos neuronales. Procesos tan dispares como el aprendizaje y la memoria, la respuesta a situaciones fisiológicas diversas (el embarazo o la sed) y la recuperación después de sufrir lesiones tienen, por base común, la plasticidad sináptica. Pero la función del tejido nervioso sólo puede comprenderse si tomamos en consideración las otras células características de este tejido, las gliales. Desde

hace tiempo se sabe que el número de células gliales duplica el de neuronas y que la glía constituye aproximadamente la mitad de la masa del tejido nervioso (Hernandez-Muela et al., 2004).

Estudios realizados en distintos invertebrados como es el caso de la aplysia o la mosca de la fruta (Quinn et al., 1974), condujeron a varias generalizaciones a cerca de los mecanismos neurales que subyacen a la plasticidad en el sistema nervioso adulto que presumiblemente se extienden a los mamíferos y a otros vertebrados. Primero, la plasticidad conductual puede surgir con claridad de los cambios plásticos en la eficacia de la transmisión sináptica. Segundo, estas variaciones de la función sináptica pueden ser efectos a corto plazo que dependen de la modificación post-traduccional de proteínas sinápticas existentes o cambios prolongados que requieren modificaciones en la expresión genética, la síntesis de proteínas nuevas y tal vez incluso el crecimiento de sinapsis nuevas (o la eliminación de las existentes). Los mecanismos de plasticidad sináptica en los mamíferos se desarrollan en escalas temporales que varían desde milisegundos hasta días, semanas o más. Las formas de plasticidad a corto plazo, que duran minutos o menos, se estudiaron en máximo detalle en las sinapsis musculares periféricas, las mismas en las que se probó su validez para el conocimiento de los mecanismos básicos de la transmisión sináptica (Purves et al., 2001).

La facilitación sináptica, que es un aumento transitorio en la fuerza sináptica, se desarrolla cuando dos potenciales de acción o más invaden la terminación pre-sináptica en íntima sucesión (Sagi et al., 2012). La facilitación conduce a que se libere más neurotransmisor con cada potencial de acción sucesivo, lo que hace que

aumente progresivamente el potencial de placa terminal post-sináptico. Es más probable que la facilitación sináptica sea resultado de la elevación prolongada de los niveles pre-sinápticos de calcio luego de la actividad sináptica. Si bien el ingreso de  $Ca^{+}$  en la terminación pre-sináptica se desarrolla en un milisegundo o dos, después de la invasión de un potencial de acción, los mecanismos que retornan el  $Ca^{+}$  hasta los niveles de reposo son mucho más lentos. Por lo tanto, cuando los potenciales de acción aparecen juntos tienden a aumentar el calcio dentro de la terminal y en consecuencia un potencial de acción pre-sináptico ulterior libera más neurotransmisor (Bliss et al., 1993).

La transmisión sináptica puede también verse disminuida luego de la actividad sináptica repetida. Esta depresión sináptica, se desarrolla cuando se presentan muchos potenciales de acción pre-sinápticos en rápida sucesión, y depende de la cantidad de neurotransmisor que se liberó. La depresión surge por la depleción progresiva de vesículas sinápticas disponibles para la fusión en estas circunstancias. Durante la depresión sináptica, la fuerza de la sinapsis declina hasta que las vesículas sinápticas pueden recuperarse mediante los mecanismos involucrados en el reciclado de las vesículas sinápticas (Purves et al., 2001).

La facilitación, la depresión y la potenciación postetánica pueden modificar brevemente la transmisión sináptica. Aunque es probable que estos mecanismos sean responsables de muchos cambios breves en el circuito encefálico, no pueden proporcionar la base para las memorias u otras manifestaciones de plasticidad conductual que persisten durante semanas, meses o años. Como podría esperarse, muchas sinapsis en el sistema nervioso central de los mamíferos muestran formas

duraderas de plasticidad sináptica que son sustratos plausibles para cambios más permanentes en el comportamiento. Debido a su duración, se cree que estas formas duraderas de plasticidad sináptica son los correlatos celulares del aprendizaje y la memoria (Thome et al., 2014; Frey et al., 1998).

## **2.1 Mecanismos asociados a la plasticidad**

Como ya se mencionó una característica que define al cerebro, es su notable capacidad de sufrir remodelación funcional y morfológica a través de diferentes mecanismos de plasticidad. A continuación, se describirán los más estudiados

### **2.1.1 Sinaptogénesis**

La expresión máxima de la plasticidad neural de un organismo se observa durante el desarrollo en el período de sinaptogénesis. En este periodo, las sinapsis pasan por ciclos de formación y regresión. El proceso de renovación sináptica abarca cuatro etapas: desconexión de las sinapsis; iniciación y crecimiento de nuevas terminales axonales; formación de nuevos contactos sinápticos, y maduración de las nuevas sinapsis, es decir, aparición de vesículas sinápticas y densidades pre y postsinápticas. En cada uno de estos pasos, la glía interviene activamente (Grasselli et al., 2013). Las terminales presinápticas que participan en la renovación de sinapsis surgen de axones preexistentes, en un proceso de formación de brotes axonales. La formación de brotes axonales es independiente de la posible formación subsecuente de nuevas sinapsis. De hecho, en el SNC, los brotes frecuentemente degeneran y nunca llegan a establecer sinapsis. El término brote axonal designa simplemente un tipo de respuesta de crecimiento, que puede

o no ser el primer paso en la formación de una nueva sinapsis. En todo caso, el proceso de renovación de sinapsis y su importancia evolutiva están en el origen y son el eje de la plasticidad neural. Un sistema nervioso con mayor capacidad de renovación de sinapsis y, por lo tanto, con mayor plasticidad de sus circuitos neurales confiere una ventaja adaptativa al organismo (Waites et al., 2005).

En el adulto, la búsqueda en el aumento del número de sinapsis inducida por el aprendizaje ha resultado una tarea difícil y ha dado lugar a resultados contradictorios. Algunos argumentos indirectos vienen de estudios que muestran una modulación en el número de la sinapsis por hormonas o estrés, de manera que se correlaciona con la capacidad de aprendizaje. Se ha demostrado que roedores expuestos a ambientes enriquecidos, muestran un crecimiento dendrítico, un incremento en espinas y cambios en el número de sinapsis en diferentes regiones cerebrales (Markham y Greenough, 2004). Un claro ejemplo es el aumento de receptores NMDA dependiente de la densidad de las espinas, observado en la región CA1 del hipocampo 24 horas después de entrenar a ratas en un aprendizaje asociativo, dependiente del hipocampo (Leuner et al., 2003). También se demostró un incremento en la densidad de las espinas en la AMG después de un condicionamiento al miedo (Radley et al., 2006).

En el presente trabajo nos enfocamos en el proceso de sinaptogénesis en el CAS. Varios investigadores han relacionado la sinaptogénesis con el aprendizaje, en donde han observado que la inducción de plasticidad y el aprendizaje pueden generar un remodelamiento en los circuitos neuronales ya sea a través de sinaptogénesis de novo o una serie de rangos morfológicos que puede conducir a

un aumento en la fuerza sináptica y la aparición de nuevas unidades funcionales. Esto puede incluir, ramificaciones de espinas y botones multisinápticos, junto con la conversión funcional de una sinapsis silente a una sinapsis activa (Marrone, 2007). Está claro, que la caracterización completa de estos cambios después del aprendizaje en diferentes estructuras y en relación con diferentes formas de memoria requiere mayor investigación (Breul- Jungerman et al., 2007). Después de realizar un análisis sobre los cambios estructurales después de un aprendizaje dependiente del hipocampo, Marrone (2007) concluye que los cambios más comúnmente observados son: un alto incremento en la densidad de los botones multisinápticos, particularmente en CA1; incremento en la densidad de espinas, un incremento en el tamaño y en la densidad de sinapsis perforadas mayoritariamente en CA3 y en el giro dentado. El análisis también revela una mayor inclinación para mostrar incrementos de la densidad de espinas relacionadas con el aprendizaje en las áreas corticales que en áreas hipocampales (Grasselli et al., 2013).

### **2.1.2 Neurogénesis**

Altman en 1965 fue el primero en sugerir que la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) continúa generándose a lo largo de la vida adulta. En el cerebro de los mamíferos, la neurogénesis en el adulto se ha identificado claramente en el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio, aunque también se ha observado en otras regiones del cerebro en respuesta a daño cerebral. La neurogénesis en el adulto es un proceso lento que involucra la proliferación de células progenitoras comprometidas a un fenotipo neuronal, maduración morfológica y fisiológica con el desarrollo de características neuronales funcionales

e integración sináptica dentro de las redes neuronales ya existentes. En el giro dentado, las células progenitoras neurales localizadas en la zona subgranular, dan lugar a la amplificación de progenitores transitorios que se diferencian en nuevas neuronas inmaduras y migran a nivel local dentro de la capa celular granular, donde maduran dentro de las células granulares dentadas (Toda et al., 2018).

Miles de neuronas nacen diariamente sin embargo, una larga proporción no completan su maduración y mueren por apoptosis en las primeras semanas (Kempermann et al., 2003). Son varios factores los que pueden regular la neurogénesis e influenciar el destino de las nuevas células, promoviendo ya sea su supervivencia o su muerte. Esto incluye casi todos los neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento, así como también factores epigenéticos y factores ambientales extrínsecos como el estrés, el aislamiento social, el abuso de drogas, el consumo de alcohol, el envejecimiento como un regulador negativo y el aprendizaje como un regulador positivo (Abrous et al., 2005).

La neurogénesis juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria, ya que se ha demostrado que una reducción de la neurogénesis en el adulto afecta el condicionamiento de miedo al contexto y algunos aprendizajes espaciales (Madsen et al., 2003; Saxe et al., 2006).

### **2.1.3 Expresión de proteínas**

Dentro de la plasticidad sináptica juegan un papel muy importante una gran variedad de familias de proteínas, donde algunas de ellas guían el crecimiento axonal, como es el caso de la GAP-43. Otra familia de sinapsinas, sinaptoporinas y



sinpatogirinas, son fundamentales en la liberación del neurotransmisor y existen algunas más que ayudan a modular este proceso como es el caso de las neurotrofinas que son una familia de proteínas que están involucradas en la plasticidad sináptica en el cerebro adulto.

Se ha propuesto que la síntesis de nuevas proteínas inducida por el aprendizaje desempeña un papel fundamental en el proceso de consolidación. Por ejemplo, Callaghan y colaboradores en el 2013, observaron que las neurotrofinas juegan un papel muy importante en el reconocimiento de la memoria a corto y largo plazo. Por otro lado, no solo las neurotrofinas están involucradas en procesos de memoria, por ejemplo Lerch y colaboradores (2011) evaluaron una posible relación entre los cambios macroestructurales, observados por imágenes de resonancia magnética con alta resolución y los cambios microestructurales. Ratones que fueron entrenados durante cinco sesiones en el laberinto acuático de Morris, después de evaluarle la memoria espacial, muestran crecimiento en el volumen del cuerpo estriado y del hipocampo. La inmunohistoquímica reveló que la tinción para GAP-43, un indicador de los cambios en la morfología pre-sináptica y post-sináptica correlacionaba con los cambios de volumen. Por el contrario, los marcadores de las neuronas y el número o el tamaño de astrocitos no correlacionaron. Por lo tanto, la remodelación sináptica es un candidato que, podría explicar los cambios de volumen dependientes de la experiencia. Aunque parece poco probable que estos cambios por sí solos sean suficientes para explicar los aumentos de volumen en el estriado e hipocampo (Johansen-Berg et al., 2012).

La sinaptogirina I y sinaptofisina I son proteínas abundantes en vesículas sinápticas que en conjunto representan  $\approx 10\%$  del total de proteínas de vesículas. Están compuestas por 4 regiones transmembranales y tienen una cola citoplasmática tirosin-fosforilable. Las funciones de sinaptogirina I y sinaptofisina no están del todo claras. En las células PC12 transfectadas, sinaptofisina I y sinaptogirina I son inhibidores potentes de la exocitosis (Sugita et al., 1999). Sorpresivamente un knockout de la sinaptofisina I, resulta en un fenotipo no detectable, es decir, no genera efectos en el desarrollo, o a nivel conductual. Es posible que esta falta de un efecto del knockout de sinaptofisina I, pudiera deberse a la redundancia causada por la presencia de sinaptoporina o sinaptogirinas (McMahon et al., 1996). Janz y colaboradores en 1999 observaron por medio de registros electrofisiológicas de la región CA1 del hipocampo que la plasticidad sináptica de corta y larga duración se redujo en un ratón con doble knockout de sinaptofisina I y sinaptogirina I.

#### **2.1.3.1 GAP-43**

La proteína asociada a crecimiento GAP-43, es una proteína ácida de membrana de 43 kilodaltones (kD). Está involucrada en fenómenos de plasticidad como la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). Durante la LTP, los mecanismos de fosforilación juegan un papel importante; la proteína cinasa C se activa por estimulación de alta frecuencia y en la LTP hay un incremento prolongado de la fosforilación de GAP-43. La fosforilación de GAP-43 es responsable de la interacción con los fosfolípidos ácidos, en particular, PI (4,5) P2, calmodulina y filamentos de actina, que al interactuar con PI y P2 ayuda a mediar el

crecimiento neurítico, aunque también podría regular la exocitosis y endocitosis (Hinz et al., 2001). Además, se ha demostrado que GAP-43 está involucrada con proteínas del reciclaje vesicular y la fosforilación de GAP-43 se ha relacionado con la liberación de noradrenalina en sinaptosomas (Robinson et al., 1993). En cerebros de ratas en desarrollo, la GAP-43 es el principal componente del cono axónico en crecimiento. En el adulto, es abundante en las membranas sinápticas de los axones de las terminales maduras y juega un papel clave guiando el crecimiento de axones, modulando la formación de nuevas conexiones y la liberación del neurotransmisor (Benowitz y Routtenberg, 1997). El desarrollo neuronal y la formación de las redes sinápticas está asociada a la expresión específica de un grupo de proteínas. Varias moléculas contribuyen a la generación de estos mecanismos. La GAP-43, es de particular interés ya que es una proteína presináptica altamente expresada en los conos de crecimiento y también utilizada como un marcador para sinapsis formadas recientemente. Existe evidencia que indica que tanto el RNAm de GAP-43 y la proteína incrementan durante el período de la formación de la red sináptica. Después de que la red sináptica está establecida, se suprime la expresión de GAP-43 en una gran cantidad de regiones del cerebro, con excepción del hipocampo que tiene un alto grado de plasticidad sostenida (Hulo et al., 2002).

Se ha estudiado ampliamente esta proteína, por su participación en procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria (Routtenberg et al., 2000). Holahan y colaboradores en el 2007, encontraron que ratones transgénicos que sobreexpresaban moderadamente GAP-43, mejoran en memoria en una prueba de laberinto acuático. Sin embargo, en ratones que sobreexpresaban la proteína,

puede producir una “neuroplasticidad sobrecargada”, la cual conduce a eventos degenerativos que culminan en una disfunción en la memoria (Holahan et al., 2007). Estos resultados sugieren que GAP-43 es determinante en la pre-sinapsis para el crecimiento neurítico y la formación de nuevas redes neurales. También, se ha demostrado en una tarea de memoria espacial que las ratas muestran mayor expresión de GAP-43 en la corteza cingulada anterior cuando realizan la tarea por 30 días comparado con el grupo de retención de 1 día (Maviel et al., 2004). En otro experimento, ratones entrenados en diferentes versiones de la prueba del laberinto de agua mostraron una correlación positiva entre cambios volumétricos en el hipocampo, evaluados por resonancia magnética y tinción GAP-43 después del entrenamiento (Lersh et al., 2011).

### **2.1.3.2 Sinaptofisina**

La sinaptofisina (SYN) es una proteína integral de membrana de 38 kD y es un componente de las membranas vesiculares pre-sinápticas de las neuronas del cerebro, médula espinal y retina (Wiedenmann y Franke, 1985). La sinaptofisina junto con la sinaptogirina son proteínas vesiculares sinápticas abundantes y corresponden alrededor del 10% del total de las proteínas sinápticas. La sinaptofisina está compuesta por cuatro regiones transmembranales y una cola citoplasmática de tirosina fosforilable. La fosforilación la lleva a cabo c-src, una tirosin-cinasa, in vitro mientras que in vivo la lleva a cabo una src-like tirosin-cinasa en las vesículas sinápticas (Barnekow et al., 1990). Se ha observado que Syn junto con sinaptogirina son inhibidores potentes y reguladores de la exocitosis (Sugita et al., 1999), Se han propuesto varias funciones para la Syn, una de ellas es que puede

ser parte de un componente del poro de fusión, el cual se define como una estructura que une dos membranas opuestas. También, podría estar relacionada con la regulación de la liberación del neurotransmisor de acetilcolina (microinyecciones de anticuerpos de SYN, dentro de las neuronas motoras bloquean la neurotransmisión neuromuscular) (Valtorta et al., 2004).

Con respecto a los procesos cognitivos, se le ha relacionado con el aprendizaje y la memoria (Mokin et al., 2007). Smith y colaboradores en el 2000, demostraron que la disminución de SYN en los circuitos del hipocampo está relacionada con deficiencias en el aprendizaje por el deterioro dado por la edad. Se utilizó un microscopio láser confocal de barrido para cuantificar los cambios en la tinción de inmunofluorescencia para la glicoproteína de la vesícula presináptica, sinaptofisina (SYN), en los principales circuitos del hipocampo. Se encontró que en los sujetos ancianos con déficits de aprendizaje espacial muestran reducciones significativas en la inmunoreactividad para SYN en el área CA3 lacunosum - moleculare (LM) del hipocampo en relación con cualquiera de las ratas controles o jóvenes emparejados por edad. Estos hallazgos fueron los primeros en demostrar que existe un patrón de circuito específico en la organización del hipocampo y la importancia de SYN en procesos de aprendizaje. En el 2008 Nihianantharajah y Murphy, encontraron un incremento en los niveles de expresión de SYN en el núcleo basolateral de la amígdala, en animales que habían sido entrenados en condicionamiento al miedo. En cambio, el grupo que no había aprendido (grupo control), no presentó dicho aumento. También se sabe que ratas senescentes con alteraciones del aprendizaje espacial, mostraron una reducción de la inmunorreactividad a SYN en CA3 en comparación con los animales control (Smith

et al., 2000). Además, los ratones knockout de SYN muestran alteraciones en el aprendizaje y la memoria que reduce el reconocimiento de objetos novedosos y el aprendizaje espacial (Schmitt et al., 2009).

### **CAPITULO 3**

#### **PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA**

El CAS es un aprendizaje importante para la sobrevivencia de las especies ya que permite desarrollar una respuesta adaptativa hacia un estímulo dañino produciendo una aversión a dicho estímulo, evitándolo en el futuro. Además, el CAS es un modelo muy utilizado para estudiar las bases moleculares del aprendizaje y se ha identificado el circuito neuronal que participa en este aprendizaje. Dentro de las áreas involucradas en el CAS, la corteza insular o gustativa (CI) y la amígdala (AMG) participan activamente en la memoria gustativa.

Por otro lado, diferentes líneas de investigación han demostrado cambios de expresión en SYN y GAP-43 (biomarcadores de cambios plásticos; Valtorta et al., 2004) en diferentes tipos de aprendizaje (Nithianantharajah et al., 2008; Routtenberg et al., 2000). En el presente estudio evaluamos los posibles cambios plásticos, utilizando GAP-43 y SYN, generados en el condicionamiento aversivo al sabor (CAS), asociados la memoria aversiva y la memoria apetitiva, en la CI, capas granular y agranular, y en la AMG, central y basolateral.

## **CAPITULO 4**

### **HIPOTESIS Y METODOLOGÍA**

#### **4.1 HIPÓTESIS**

Las memorias aversiva y apetitiva inducirán mayores niveles de expresión de GAP-43 y SYN en la CI y AMG después de los procesos de adquisición, evocación y extinción en el CAS.

#### **4.2 OBJETIVOS GENERALES**

Evaluar la expresión de las proteínas GAP-43 y SYN que ocurren durante formación de memoria gustativa apetitiva y aversiva del condicionamiento aversivo a los sabores en la CI y la AMG.

##### **4.2.1 Objetivos particulares**

Evaluar la expresión de GAP-43 y SYN en AMG y CI:

- 24 hrs después de la adquisición.
- 24 hrs después de la primera evocación.
- Después de la extinción (cuando los grupos tengan el mismo consumo de sacarina).

## **4.3 METODO GENERAL**

### **4.3.1 Sujetos**

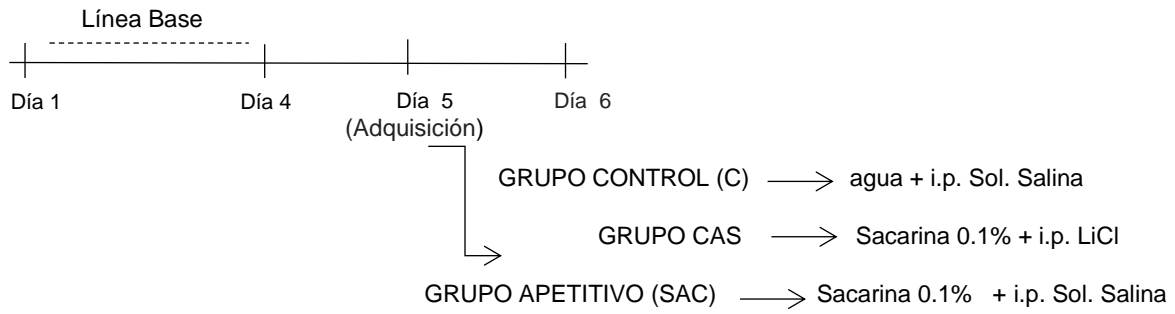
Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 a 300 gramos, mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad invertido (12:12hrs) con comida y agua ad libitum, excepto durante el CAS. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” de la Secretaría de Salud de México que sigue los lineamientos del NIH para el uso y cuidado de animales y aprobado (070/301,214) por el Comité de Atención Animal del Instituto de Neurobiología.

## **4.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

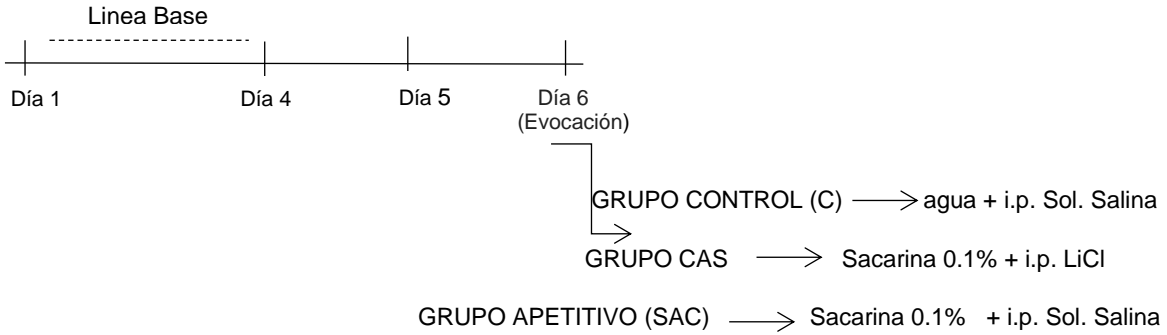
La estrategia experimental para evaluar cambios plásticos por medio de GAP-43 y sinpatofisina se dividió en tres experimentos. En el primer experimento se evaluaron posibles cambios plásticos en la memoria aversiva y gustativa después de la adquisición del condicionamiento, en el segundo experimento se evaluaron cambios plásticos después de la primera evocación y en el tercer se evaluaron cambios plásticos después de la extinción del condicionamiento. En la Figura 2 se muestra el esquema y los grupos de cada experimento indicando cuando se evaluaron GAP-43 y SYN.



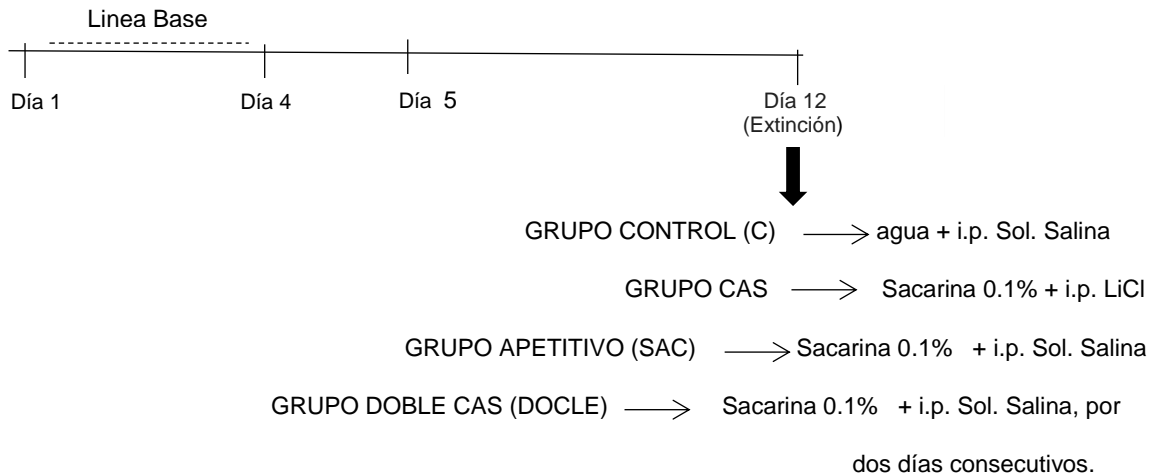
## EXPERIMENTO 1 ADQUISICIÓN



## EXPERIMENTO 2 EVOCACIÓN



## EXPERIMENTO 3 EXTINCIÓN



**Figura 2.** Diagrama describiendo los tres experimentos diseñados para evaluar los cambios plásticos por medio de GAP-43 y sinaptofisina. El diseño fue el mismo, así

como los tratamientos para los diferentes grupos. Lo que cambia es el momento del sacrificio: Experimento 1 después de la adquisición; Experimento 2 después de la evocación; Experimento 3 después de la extinción.

## **4.5 PROCEDIMIENTO**

### **4.5.1 CAS**

Antes de realizar el CAS, las ratas fueron privadas de agua 24 hrs antes del experimento, y entrenadas a tomar agua en una sesión de 20 minutos (mañana) durante 4 días, con el fin de obtener una línea base de consumo. El consumo fue registrado diariamente por medio de probetas graduadas de 50 ml. En el quinto día (adquisición), el agua fue sustituida por una solución de sacarina al 0.1% (estímulo condicionado, EC), 30 min después los animales fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con una solución de cloruro de litio (LiCl; 7.5ml/kg i.p., 0.2M) (estímulo incondicionado, EI). En el día 6 las ratas fueron divididas aleatoriamente en tres grupos para cada experimento como se explicará a detalle más adelante.

### **4.5.2 Inmunohistoquímica**

#### **4.5.2.1 Expresión de GAP-43 y SYP.**

Al final de cada experimento los animales fueron inyectados i.p. con una sobredosis de pentobarbital sódico, para ser perfundidos por medio de punción intracardiaca. Primeramente, se perfunde con PBS 0.1M pH 7.4, después con una solución de paraformaldehído al 4%, los cerebros fueron extraídos, y se pusieron en

una solución de sacarosa al 30%, hasta que la densidad del tejido sea igual que la sacarosa y precipite. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 35  $\mu$ m de grosor, colectándose tres series alternadas de la amígdala y corteza insular. Para medir los niveles de expresión de GAP-43 y SYN, se realizó una inmunofluorescencia, las secciones fueron bloqueadas con un agente de bloqueo del sistema de coumarina (TSA), después se incubaron en el anticuerpo primario policlonal anti-conejo anti-GAP-43 (1:600) (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) o con un anticuerpo primario policlonal anti conejo anti-Sinaptofisina (1:2000)(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). Después de la incubación por 24 hrs con el anticuerpo primario, se procedió a realizar lavados con PBS 0.1M pH 7.4, y se incubaron las secciones en un anticuerpo secundario biotinilado hecho en cabra, anti-conejo IgG a una dilución 1:400 (VECTOR Labs). Después se realizaron varios lavados y posteriormente los cortes se retaron con un kit de amplificación (TSA, Plus Cyanine 3 System, PerkinElmer, Inc.) por 30 min. Se realizaron lavados y finalmente se incubaron por 5 min con anti-Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Se realizó un análisis comparativo, entre la expresión proteica de GAP-43 y SYN en las distintas estructuras de interés, comparando la densidad óptica observable en fluorescencia y por medio de histoquímica y no se encontraron diferencias significativas, por lo tanto se procedió para los experimentos 2 y 3 una inmunohistoquímica, siguiendo el mismo procedimiento de secciones aleatorias del experimento uno y utilizando los mismos anticuerpos primarios del experimentos uno, lo único que cambió en el revelado de las secciones, El producto de reacción se visualizó incubando el tejido durante 5 minutos en 30 mg de diaminobencidina en 100 ml de solución salina

tamponada con Tris HCl 0,05 M, pH 7,4 que contiene 30 p1 de H, O<sub>2</sub> (30%) además se añade 5 ml de níquel.

#### **4.5.3 Análisis estadístico**

En cada experimento los datos del CAS mostraron una distribución normal y homogeneidad de varianza. Por lo tanto, se analizaron mediante una ANOVA de dos vías de medidas repetidas; se realizaron comparaciones post hoc con la prueba de Fisher. Los datos de la densidad óptica (DO) se analizaron mediante ANOVAS de una vía, para cada área del cerebro. Las comparaciones post hoc se realizaron con la prueba de Fisher. Un nivel de probabilidad de <0,05 se aceptó como significancia estadística.

### **CAPITULO 5**

#### **EXPERIMENTO 1 Evaluación de GAP-43 y SYN 24 hrs después de la adquisición.**

##### **5.1 MÉTODO**

###### **5.1.1 Grupos y tratamientos**

Se utilizaron un total de 24 ratas macho a las que se les dio un entrenamiento de cuatro días de consumo de agua por 20 min diarios en probetas graduadas de 50 mililitros. En el quinto día se dividieron aleatoriamente en tres grupos: 1) Grupo control: recibió agua 2) Grupo CAS: recibió sacarina con una inyección i.p. de LiCl 30 min después del consumo; 3) Grupo apetitivo: recibió sacarina con una inyección i.p. de NaCl 30 min después del consumo (N=8 por grupo). 24 hrs después de la adquisición se sacrificaron los sujetos.

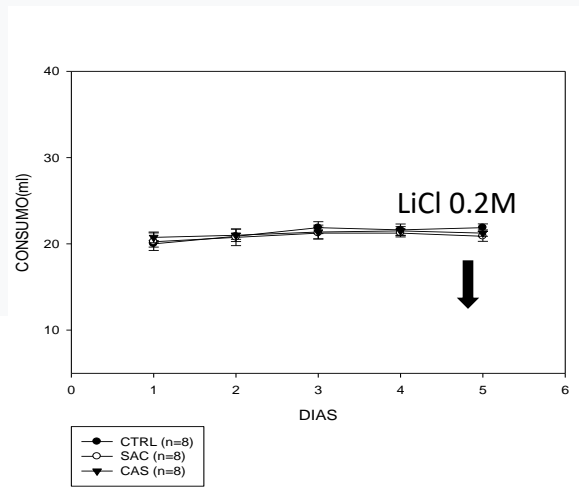
### 5.1.2 Análisis de imágenes

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 700 con el objetivo 63X. Después de localizar el área de interés, seleccionamos la opción de mosaicos y se delineó el segmento de cerebro con la Configuración de región de mosaico, utilizando cuadros de  $8 \times 8$  ( $800\mu\text{m} \times 800\mu\text{m}$ ). Determinamos la intensidad media de fluorescencia para los canales individuales en el área de interés delimitando con la herramienta de selección a mano alzada creando una máscara para el análisis basado en el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (2013). La máscara, para cada área de interés, se utilizó para todas las secciones y todos los sujetos. El análisis de la densidad óptica (DO) se realizó utilizando el software Zeiss Axion Vision 4.8v siguiendo el procedimiento (Wallrafen et al., 2019). El DO fue comparado con el grupo control y expresado en píxeles /  $\text{mm}^2$ . Se analizaron 8 secciones alternas para cada proteína. El análisis se hizo bilateral para cada sección obteniendo la media. Después, obtuvimos la media de las 8 secciones por sujeto experimental. Para cada proteína analizamos las capas granulares y agranulares de la CI, el BLA y el CeA. El DO fue realizado por un observador ciego.

## 5.2 RESULTADOS EXPERIMENTO 1

### *Consumo de sacarina*

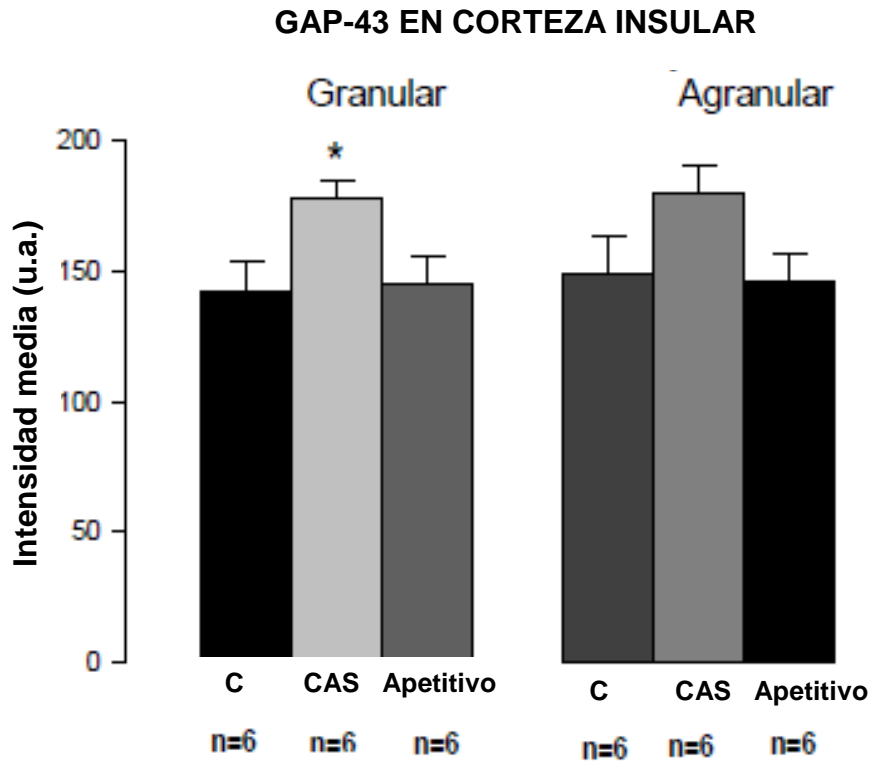
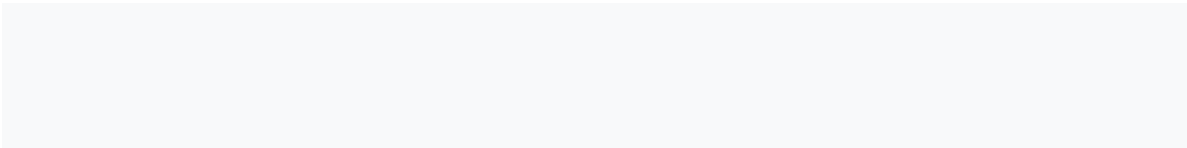
El ANOVA de dos vías de medidas repetidas no reveló diferencias significativas en el consumo de agua durante la línea base (día 1-4) o en el consumo de sacarina durante la adquisición del CAS, día 5 [grupo (2,119)  $F = 0,27$ ;  $P = 0,765$ ; sesión (4,119)  $F = 2,37$ ;  $P = 0,07$ ; grupo por sesión (8,119)  $F = 0,73$ ;  $P = 0,98$ ] (Figura 2).



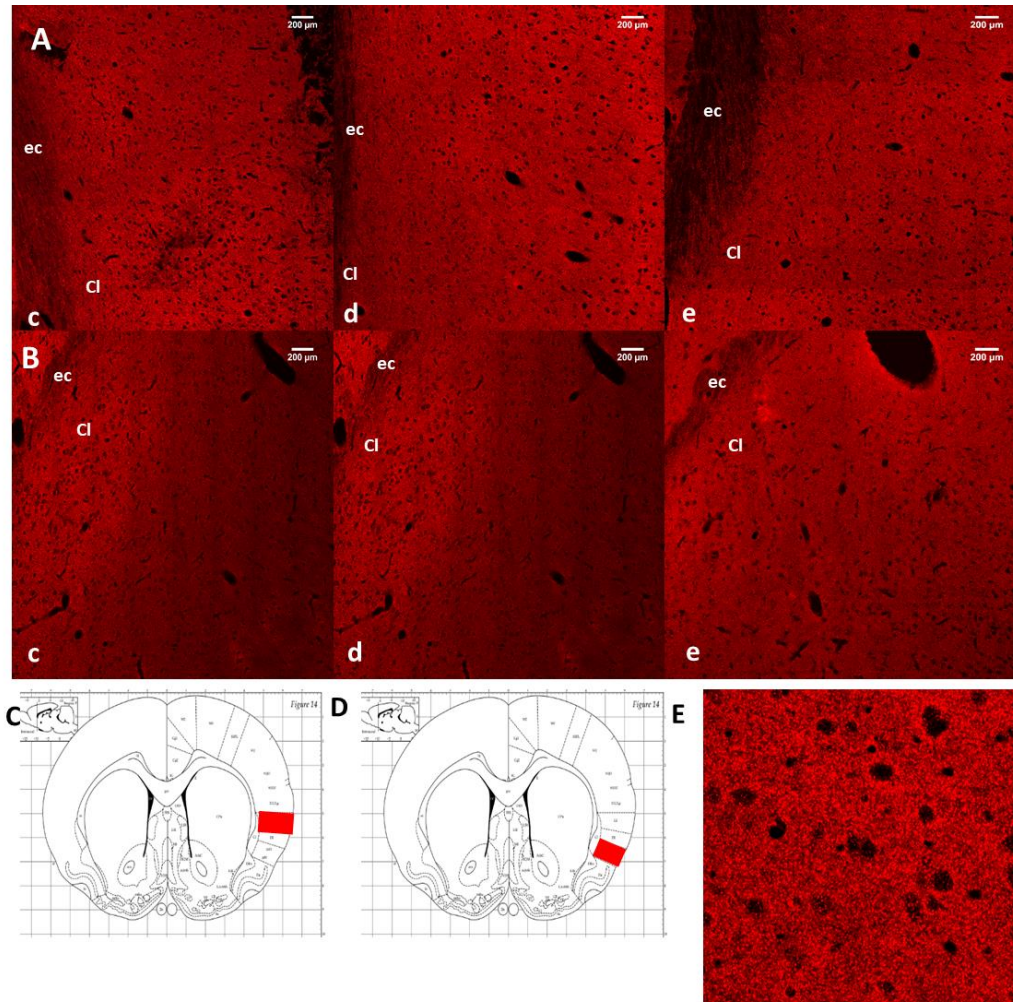
**Figura 3.** Consumo (ml) en los diferentes grupos durante el condicionamiento. Grupo 1: Control (CTRL), Grupo 2: Apetitivo (SAC), Grupo 3: CAS. No hubo diferencias significativas.

#### *Expresión de GAP-43 en corteza insular*

En la Figura 5 se observa una imagen representativa de la expresión de GAP-43 en la CI. Se comparó la densidad óptica en los 3 grupos (Control, CAS y Apetitivo) en la capa granular. El ANOVA reveló una diferencia significativa ( $F(2, 17) = 4,177$ ;  $P = 0,036$ ); Los análisis post hoc revelaron que el grupo con CAS tenía una mayor densidad de señal de GAP-43 en comparación con el grupo de control ( $p = 0.02$ ) y el grupo apetitivo ( $p = 0.03$ ) No se encontraron diferencias significativas entre grupos en la capa agranular ( $P = 0,75$ ; Figura 4).



**Figura 4.** Expresión de la densidad óptica de GAP-43 en las capas granular y agranular del CI en los tres grupos (Control, CAS y Apetitivo; N = 6 por grupo). \* Diferente de los grupos control y apetitivo, P <0,005.



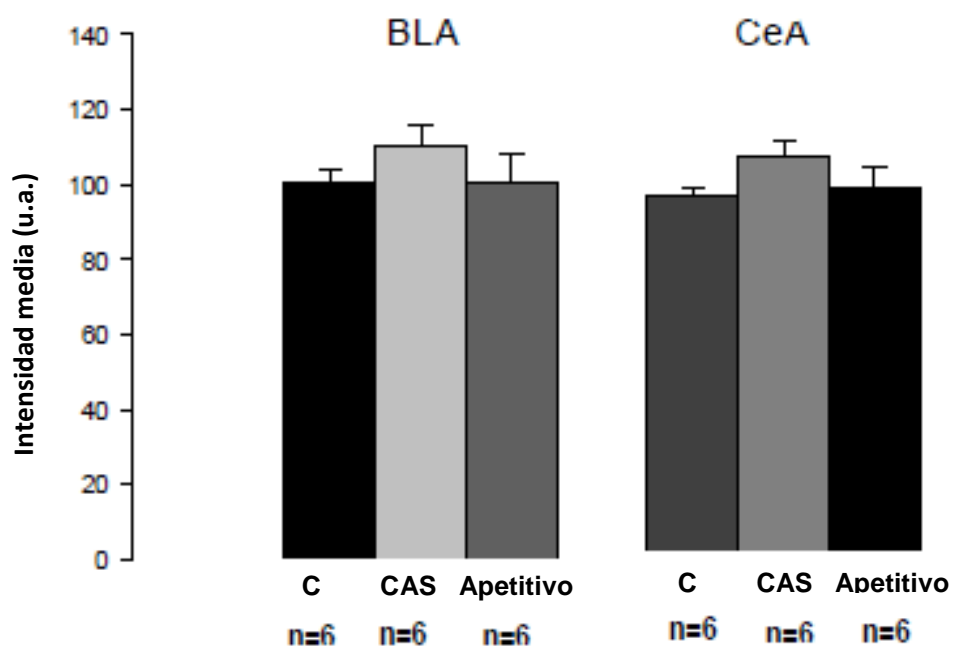
**Figura 5.** Inmunofluorescencia de la expresión de GAP-43 en la capa granular (A) y agranular(B) de la corteza gustativa. (c) Control, (d) CAS, (e) Apetitivo. En rojo observamos la expresión de GAP-43. Barra de calibración 100μm. (C) Representación histológica de la capa granular, (D) Representación histológica de la capa agranular. (E) ampliación con el objetivo 63X.

#### *Expresión de GAP-43 en amígdala*

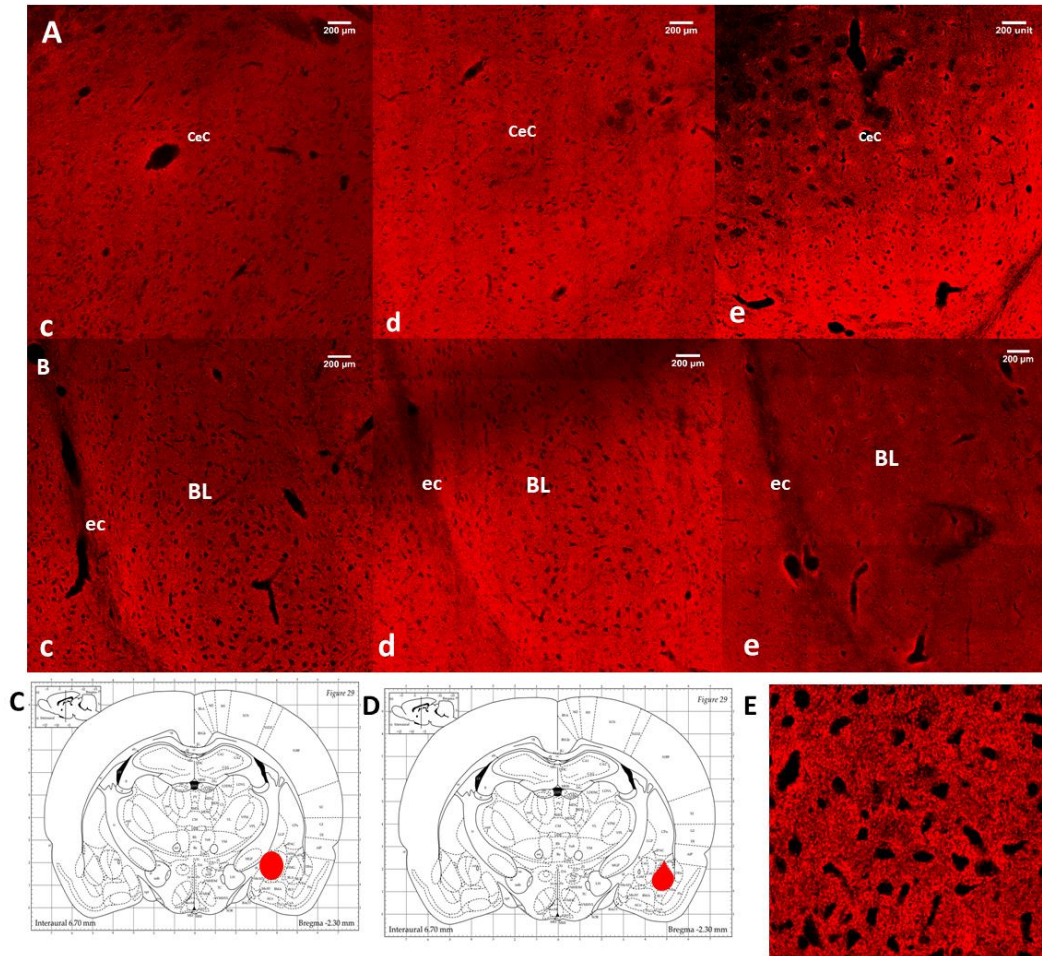
Una imagen representativa de la expresión de GAP-43 se observa en la Figura 7, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de densidad óptica de GAP-43 entre grupos BLA ( $F(2,17) = 1.078$ ;  $P = 0.365$ ) y el CeA ( $F(2,17) = 1,802$ ;  $P = 0,199$ ) (Figura 6).



## GAP-43 EN LA AMIGDALA



**Figura 6.** Expresión de la densidad óptica de GAP-43 en la amígdala basolateral (BLA) y central (CeA) en los tres grupos (Control, CAS y Apetitivo; N= 6 por grupo).

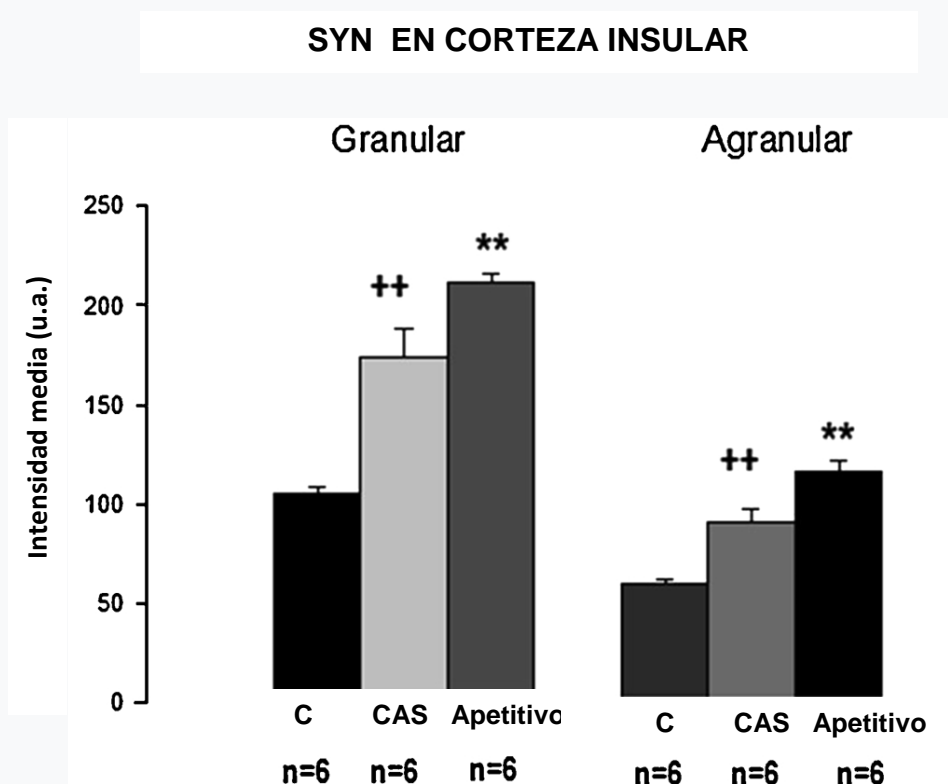


**Figura 7.** Inmunofluorescencia de la expresión de GAP-43 en la amígdala central (A) y basolateral (B) (c) Control, (d) CAS, (e) Apetitivo. En rojo observamos la expresión de GAP-43. Barra de calibración 100  $\mu$ m. (C) Representación histológica de la amígdala central, (D) Representación histológica de la amígdala basolateral. (E) amplificación con el objetivo 63X.

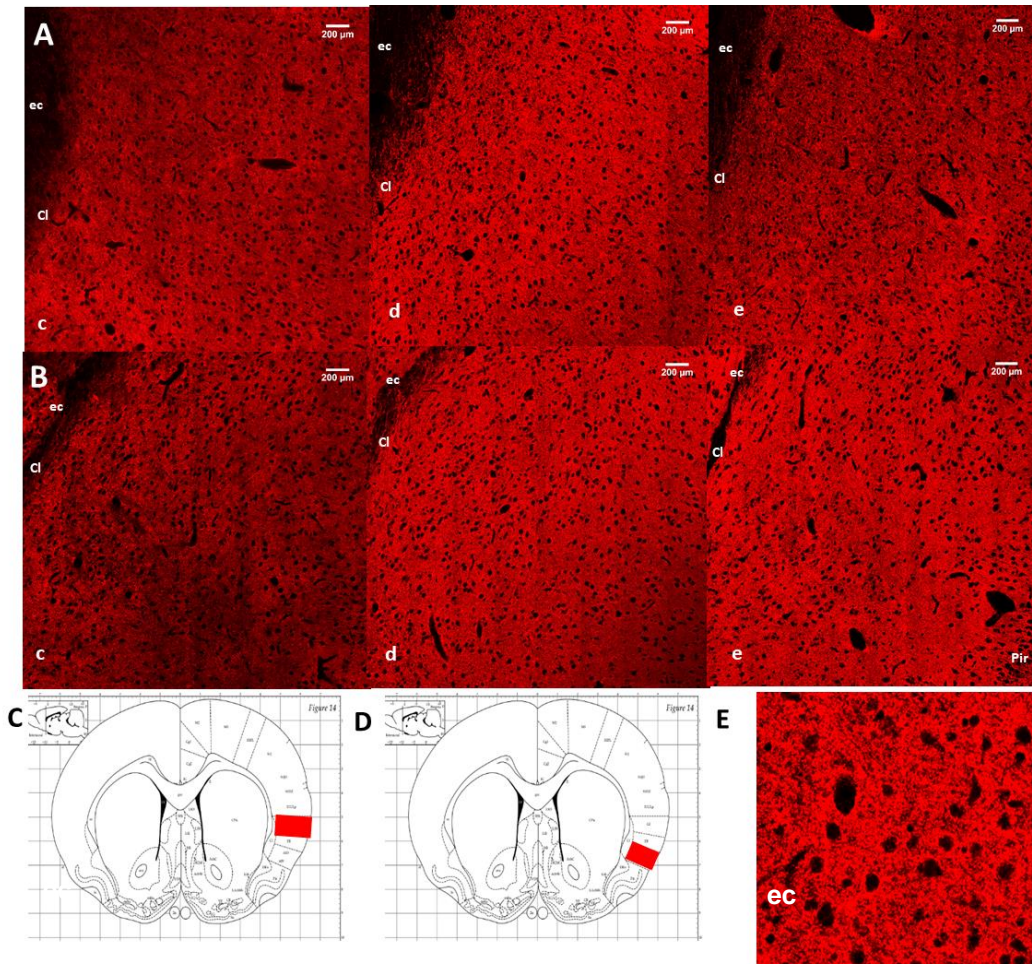
#### *Expresión de SYN en Corteza Insular.*

Una imagen representativa de la expresión de SYN se observa en la Figura 9. Se encontró una significancia en la densidad óptica de SYN en la capa granular de la CI ( $F(5, 17) = 39,313$ ;  $p < 0,001$ ). El análisis post hoc reveló un aumento en la expresión de SYN en el grupo con CAS ( $p < 0,01$ ) y en el grupo apetitivo ( $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo control. También se encontró, un aumento significativo en la expresión de SYN en el grupo apetitivo en comparación con el grupo con CAS ( $p < 0,01$ ). Encontramos resultados similares en la capa agranular. Observamos

diferencias significativas entre grupos  $F(2, 17) = 34,749$ ;  $p < 0,001$ ). La densidad óptica en los grupos Apetitivo ( $p < 0,01$ ) y CAS ( $p < 0,01$ ) aumentaron significativamente en comparación con el grupo de control. Además, encontramos una mayor expresión en el grupo apetitivo en comparación con el grupo CTA ( $p < 0,01$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Densidad óptica de la expresión de sinaptofisina en la capa granular y agranular de la CG en los tres grupos (Control, CTA y Apetitivo; N = 6 por grupo). ++Diferente del grupo de control  $P < 0,01$ ; \*\* Diferente de los grupos CTA y control  $P < 0,01$ .

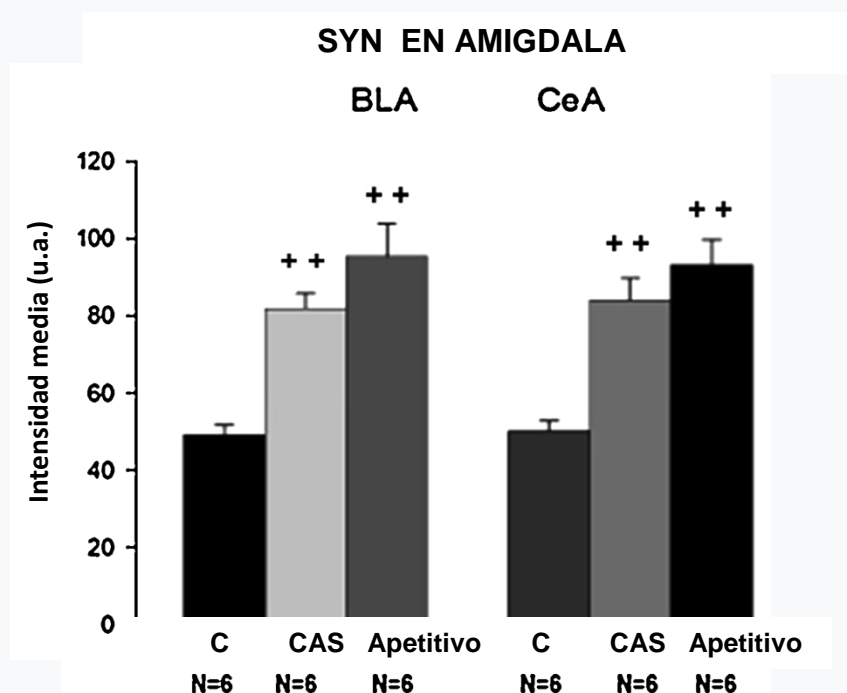


**Figura 9.** Inmunofluorescencia de la expresión de Sinaptofisina en la capa granular (A) y agranular (B) de la corteza gustativa. (c) Control, (d) CAS, (e) Apetitivo. En rojo observamos la expresión de GAP-43. Barra de calibración 100  $\mu\text{m}$ . (C) Representación histológica de la capa granular, (D) Representación histológica de la capa agranular. (E) amplificación con el objetivo 63X

#### *Expresión de SYN en Amígdala.*

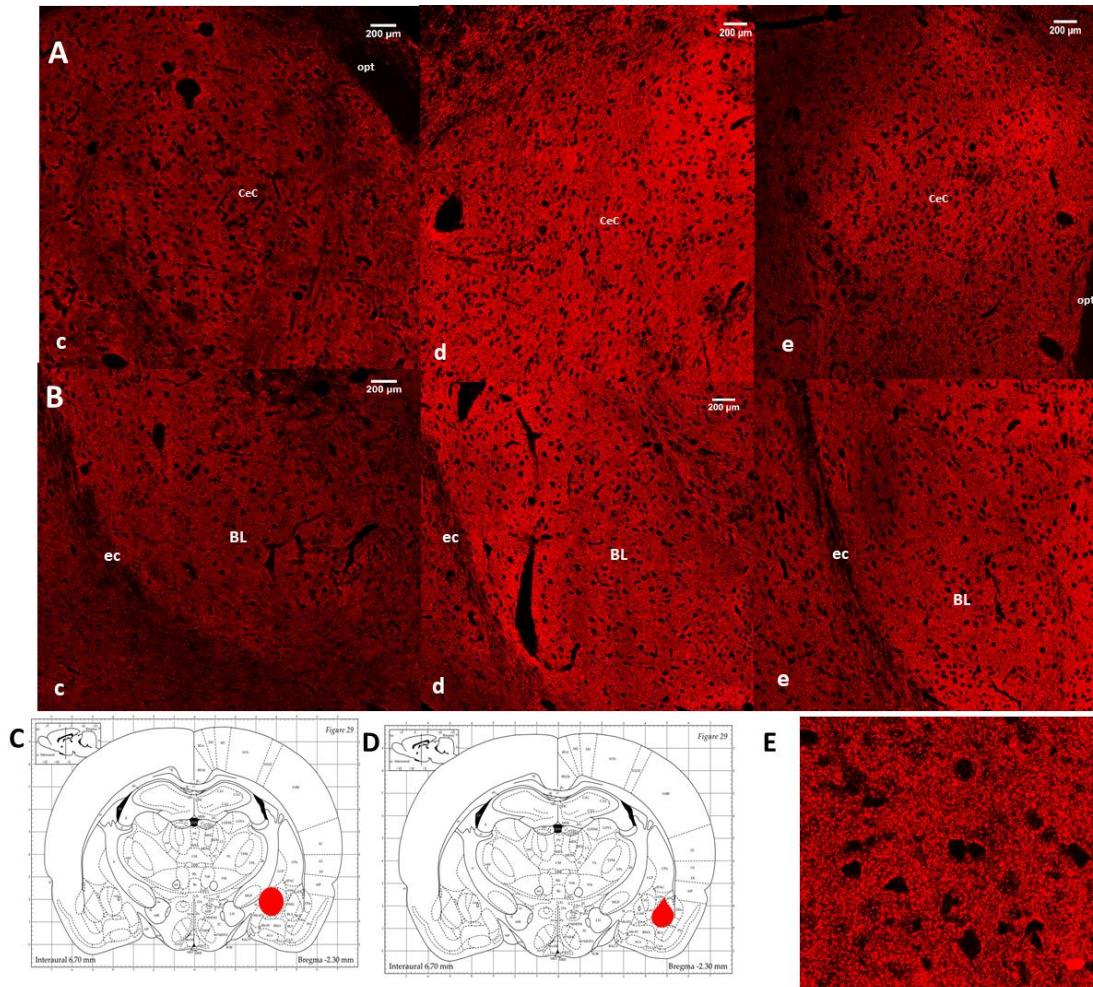
Una imagen representativa de la expresión de SYN se observa en la Figura 11. El ANOVA de la densidad óptica en BLA reveló diferencias significativas entre grupos ( $F(2, 16) = 15,474$ ;  $P < 0,001$ ). Las pruebas posthoc revelaron que tanto los grupos de CAS ( $P = 0,002$ ) y apetitivo ( $P < 0,001$ ) tuvieron una mayor densidad óptica de SYN que el grupo de control (Fig. 9). El ANOVA para la CeA reveló un efecto significativo ( $F(2, 16) = 16,185$ ;  $p < 0,001$ ). Las comparaciones *post hoc*

demostraron que tanto CAS ( $p = <0,001$ ) como Los grupos apetitivos ( $P = <0,001$ ) tenían una densidad óptica de SYN más alta que el grupo de control (Figura 10). No hay diferencias significativas entre el grupo CAS y el apetitivo en la BLA ( $P=0.230$ ) y en la CeA ( $P= 0.12$ ).



**Figura 10.** Densidad óptica de la expresión de sinaptofisina en la BLA y en CeA en la Amígdala en los 3 grupos (Control, CTA y Apetitivo; N = 6 por grupo). ++Diferente del grupo de control  $P <0.01$ .





**Figura 11.** Inmunofluorescencia de la expresión de Sinaptofisina en la amígdala central (A) y basolateral (B) (c) Control, (d) CAS, (e) Apetitivo. En rojo observamos la expresión de GAP-43, en verde observamos a Hoestch (marcador nuclear). Barra de calibración 100 $\mu$ m. (C) Representación histológica de la amígdala central, (D) Representación histológica de la amígdala basolateral. (E) ampliación en el objetivo 63X.

### 5.3 CONCLUSIÓN EXPERIMENTO 1 ADQUISICIÓN

En el presente experimento, se evaluaron los cambios plásticos derivados de la adquisición del CAS, donde se pudo observar un aumento en la expresión de GAP-43 en el grupo con CAS en la CI en la capa granular, además se observó un aumento en la expresión de SYN en la CI, en ambas capas y en la AMG. En el grupo de sacarina, encontramos un aumento en la SYN en ambas capas de CI y en las

áreas de la AMG analizadas. Estos resultados sugieren que al adquirir una memoria aversiva se generan cambios estructurales (GAP-43) y cambios de potenciación sináptica. Sin embargo, una memoria apetitiva solo genera cambios en la potenciación sináptica por la adquisición.

## **CAPITULO 6**

### **EXPERIMENTO 2 Evaluación de GAP-43 y SYN 24 hrs después de la primera sesión de evocación.**

#### **6.1 MÉTODO**

##### **6.1.1 Grupos y tratamientos**

Los sujetos se mantuvieron en las mismas condiciones como se describió en el Experimento 1. Se utilizaron un total de 24 ratas macho a las que se les dio un entrenamiento de 4 días de consumo de agua por 20 min diarios en probetas graduadas de 50 mililitros. En el quinto día se dividieron aleatoriamente en tres grupos: 1) Grupo control: recibió agua 2) Grupo CAS: recibió sacarina con una inyección i.p. de LiCl 30 min después del consumo; 3) Grupo apetitivo: recibió sacarina con una inyección i.p. de NaCl 30 min después del consumo (N=8 por grupo). Al sexto día se les dio nuevamente sacarina, excepto el grupo control que recibió agua, y 24 hrs después de la evocación se realizó el sacrificio.

##### **6.1.2 Análisis de imágenes**

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de luz marca OLYMPUS BX60. Después de localizar el área de interés, se procedió a dar captura a la foto. Determinamos la intensidad media para el área de interés delimitando con la herramienta de selección a mano alzada creando una máscara para el análisis

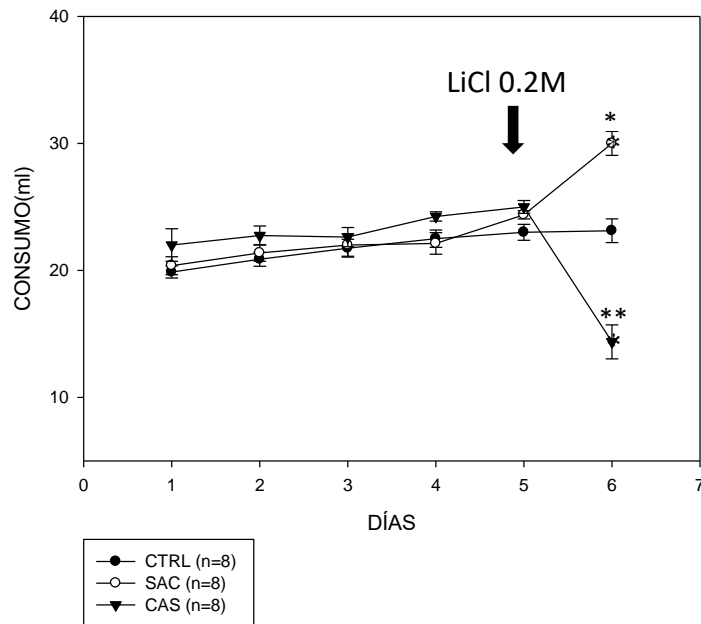
basado en el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (2013). La máscara, para cada área de interés, se utilizó para todas las secciones y todos los sujetos. El análisis de la densidad óptica (DO) se realizó utilizando el software Image J siguiendo el procedimiento (Wallrafen et al., 2011). El DO se comparó con el grupo control y se expresó en píxeles / mm<sup>2</sup>. Se analizaron 8 secciones alternas para cada proteína. El análisis se hizo bilateral para cada sección obteniendo la media. Posteriormente, obtuvimos la media de las 8 secciones por sujeto experimental. Para cada proteína analizamos las capas granular y agranular de la CI, la BLA y la CeA. El DO fue realizado por un observador ciego.

## 6.2 RESULTADOS EXPERIMENTO 2

### *Consumo de sacarina*

El ANOVA de dos vías de medicas repetidas no reveló diferencias significativas en el consumo de agua durante la línea base (día 1-4) o en el consumo de sacarina durante la adquisición del CAS. Se encontraron diferencias significativas el día de la evocación como se observa en la figura 11 [grupo (2,143)  $F = 3.921$ ;  $P = 0,044$ ; sesión (5,143)  $F = 8.223$ ;  $P < 0,001$ ; grupo por sesión (10,143)  $F = 23.316$ ;  $P < 0.001$ ]. El grupo sacarina consumió significativamente más ( $P < 0.001$ ) que el grupo control el día de la evocación. El grupo CAS consumió significativamente menos el día de la evocación que el grupo control ( $P < 0.001$ ) y el Apetitivo ( $P < 0.001$ ).





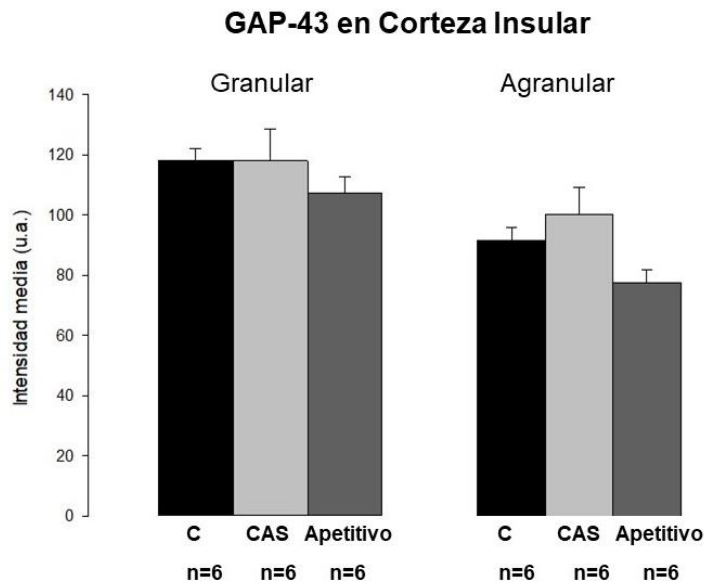
**Figura 12.** Consumo (ml) en los diferentes grupos durante el condicionamiento. Grupo 1: Control (CTRL), Grupo 2: Apetitivo (SAC), Grupo 3: CAS.

\* Diferente del grupo control  $p < 0.05$ .

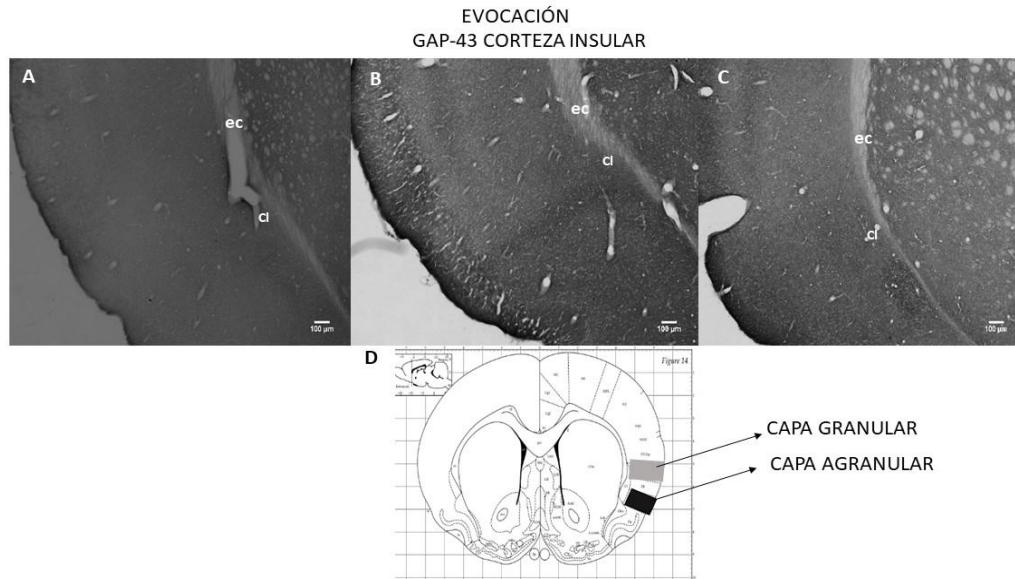
\*\* Diferente del grupo control y del grupo apertivo.

#### *Expresión de GAP-43 en Corteza Insular*

En la figura 13 se observa una imagen representativa de la expresión de GAP-43 en la CI. Se comparó la densidad óptica en los 3 grupos (control, CAS y apertivo) en la capa granular. El ANOVA reveló que no existe diferencia significativa ( $F(2, 17) = 0.562$ ;  $P = 0,582$ ); al igual que en la capa agranular no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $P = 0,582$ ; Figura 12).



**Figura 13.** Expresión de la densidad óptica de GAP-43 en las capas granular y agranular del CI en los tres grupos (Control, CAS y Apetitivo; N = 6 por grupo).

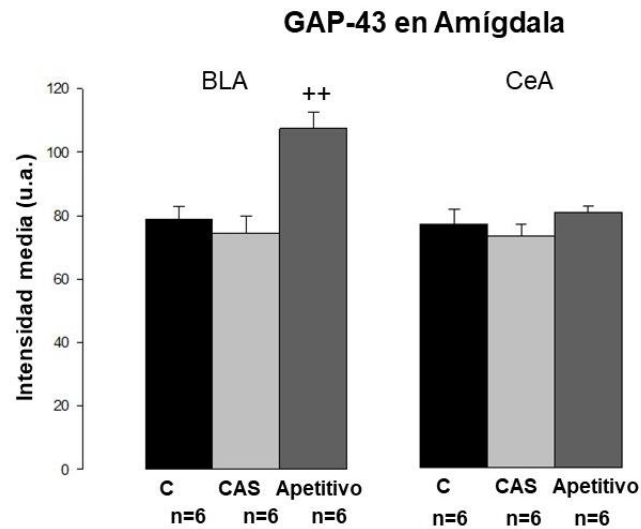


**Figura 14.** Inmunohistoquímica de la expresión de GAP-43 en la corteza insular (A) Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Representación histológica. Barra de calibración 100  $\mu$ m.

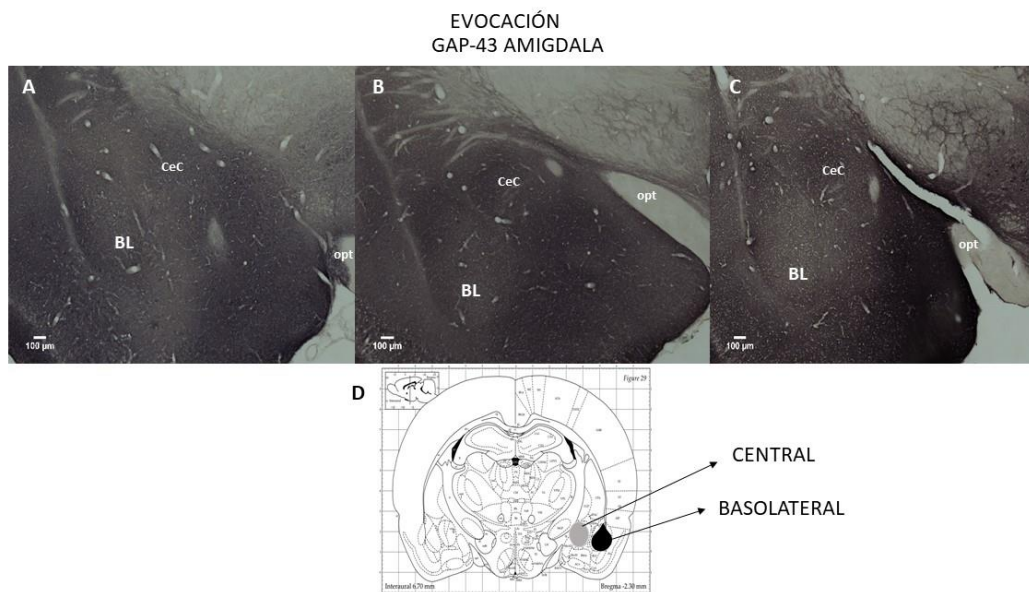
#### *Expresión de GAP-43 en la amígdala*

Una imagen representativa de la expresión de GAP-43 se observa en la Figura 16. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de densidad

óptica de GAP-43 entre grupos en BLA ( $F(2,17) = 13.337$ ;  $P < 0.001$ ) observándose un aumento en la expresión de GAP-43 en el grupo apetitivo en comparación con el grupo control y el grupo con CAS. En la CeA no se encontraron diferencias significativas ( $F(2,17) = 1,011$ ;  $P = 0,387$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Densidad óptica de la expresión de GAP-43 en la BLA y en CeA en los tres grupos (Control, CAS y Apetitivo; N = 6 por grupo). ++Diferente del grupo de control y del grupo con CAS  $P < 0.001$ .

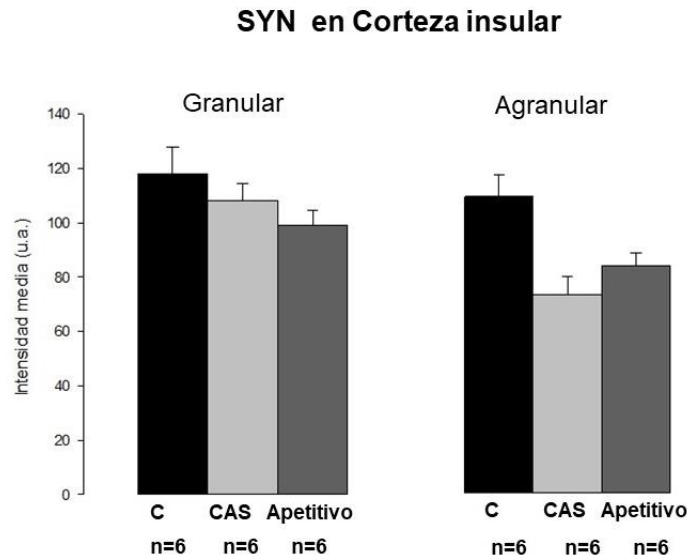


**Figure 16.** Inmunohistoquímica de la expresión de GAP-43 en la Amígdala (A)

Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Representación histológica. Barra de calibración 100µm (n=6).

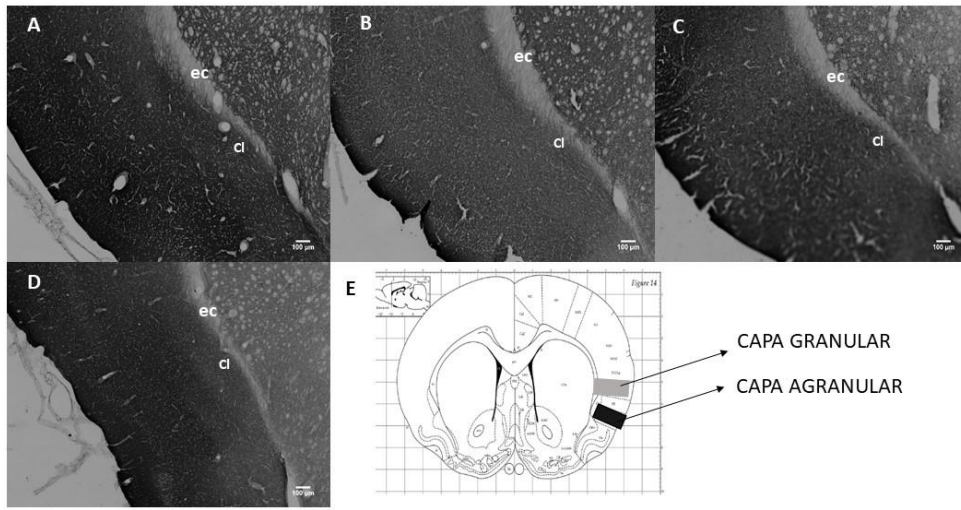
### *Expresión de SYN en Corteza Insular*

En la figura 17 se observa una imagen representativa de la expresión de SYN en la CI. Se comparó la densidad óptica en los 3 grupos (control, CAS y apetitivo) en la capa granular. El ANOVA reveló que no existe diferencia significativa ( $F(2, 17) = 1.696$ ;  $P = 0,217$ ); al igual que en la capa agranular no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $P = 0,217$ ; Figura 16).



**Figura 17.** Densidad óptica de la expresión de SYN en la capa granular y agranular en la corteza insular en los tres grupos (Control, CAS y Apetitivo; N = 6 por grupo).

EVOCACIÓN  
SINAPTOFISINA CORTEZA INSULAR



**Figura 18.** Inmunohistoquímica de la expresión de sinaptofisina en la corteza insular (A) Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Doble CAS (E) Representación histológica. Barra de calibración 100  $\mu$ m. (n=6).

### 6.3 CONCLUSIONES EXPERIMENTO 2 EVOCACIÓN

En el presente experimento se analizaron los cambios plásticos derivados de la evocación del CAS en donde se observó sólo un aumento en la expresión de GAP-43 en el grupo de sacarina en la BLA, sugiriendo que la formación de la memoria aversiva en la evocación induce un aumento de GAP-43 en la BLA, estructura que se ha demostrado que es importante en la consolidación y evocación del condicionamiento (Miranda et al., 2002).

## CAPITULO 7

### EXPERIMENTO 3 Evaluación de GAP-43 y SYN en la extinción.

#### 7.1 MÉTODO

##### 7.1.1 Grupos Y tratamientos

Los sujetos se mantuvieron en las mismas condiciones como se describió en el experimento 1 y 2. Se utilizaron un total de 32 ratas macho a las que se les dio un entrenamiento de 4 días de consumo de agua por 20 min diarios en probetas graduadas de 50 mililitros. En el quinto día se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: 1) Grupo control: recibió agua 2) Grupo CAS: recibió sacarina con una inyección i.p. de LiCl 30 min después del consumo; 3) Grupo apetitivo: recibió sacarina con una inyección i.p. de NaCl 30 min después del consumo; 4) Grupo doble CAS: Igual al grupo 2 pero en lugar de solo recibir sacarina el día de la evocación, recibió sacarina más una inyección intraperitoneal de LiCl (N=8 por grupo). La idea de incorporar un grupo con sobre-entrenamiento, fue para observar cambios plásticos al momento de la extinción de un aprendizaje robusto, ya que existe evidencia demostrando que existe un procesamiento neuronal diferencial en el sobre-entrenamiento (Buresová et al., 1979; Rodríguez-Ortiz et al., 2007). A este grupo en el sexto día se les dio nuevamente sacarina. Una vez que se extinguió la respuesta aversiva en todos los grupos, se procedió al sacrificio al día 12 de entrenamiento.

##### 7.1.2 Análisis de imágenes

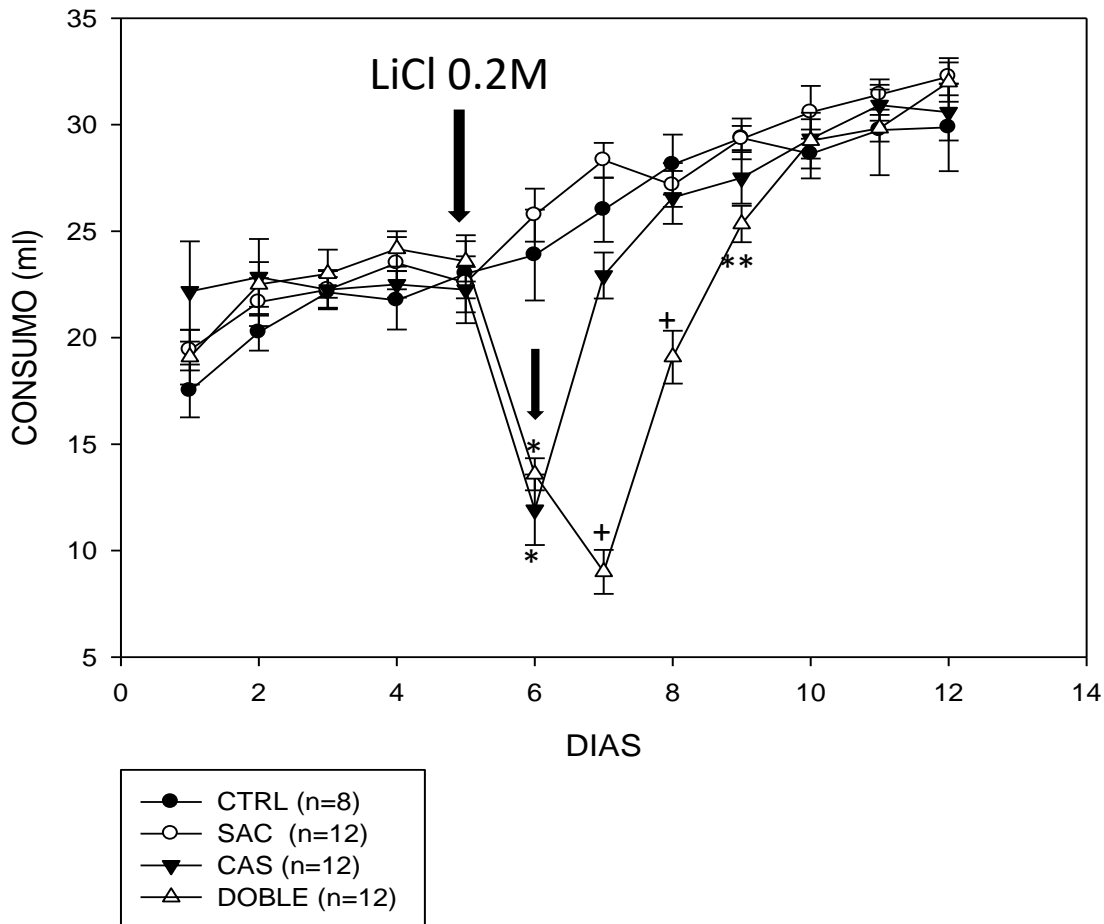
Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de luz marca OLYMPUS BX60. Después de localizar el área de interés, se procedió a dar captura a la foto. Determinamos la intensidad media para el área de interés delimitando con la herramienta de selección a mano alzada creando una máscara para el análisis

basado en el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (2013). La máscara, para cada área de interés, se utilizó para todas las secciones y todos los sujetos. El análisis de la densidad óptica (DO) se realizó utilizando el software Image J siguiendo el procedimiento (Wallrafen et al., 2011). El DO se comparó con el grupo control y se expresó en píxeles / mm<sup>2</sup>. Se analizaron 8 secciones alternas para cada proteína. El análisis se hizo bilateral para cada sección obteniendo la media. Posteriormente, obtuvimos la media de las 8 secciones por sujeto experimental. Para cada proteína analizamos las capas granular y agranular de la CI, la BLA y la CeA. El DO fue realizado por un observador ciego.

## 7.2 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 3

### *Consumo de sacarina*

Los resultados demuestran que el experimento conductual se realizó de manera adecuada, ya que los animales muestran un consumo estable durante la línea base. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas no reveló diferencias significativas en el consumo de agua durante la línea base (día 1-4) o en el consumo de sacarina durante la adquisición del CAS (día 5). En los días 6, 7, 8 y 9 observamos diferencias significativas, [grupo (3,287)  $F = 24.110$ ;  $P = <0.001$ ; sesión (8,287)  $F = 28.281$ ;  $P = <0.001$ ; grupo por sesión (24,287)  $F = 12.803$ ;  $P = <0.001$ ). Las comparaciones posthoc demostraron que una clara aversión al sabor al evocar en el día 6 y 7 para los grupos CAS y DOBLE CAS. En el grupo con el doble entrenamiento se observa una aversión aun mayor al evocar el día 7, 8 y 9 como se muestra en la figura 18. Del día 10 al 12 el consumo de todos los grupos fue similar.



**Figura 19.** Consumo de sacarina (ml) en los diferentes grupos durante el condicionamiento. Grupo 1: Control (CTRL), Grupo 2: Apetitivo (SAC), Grupo 3 (CAS), y Grupo 4 (DOBLE CAS).

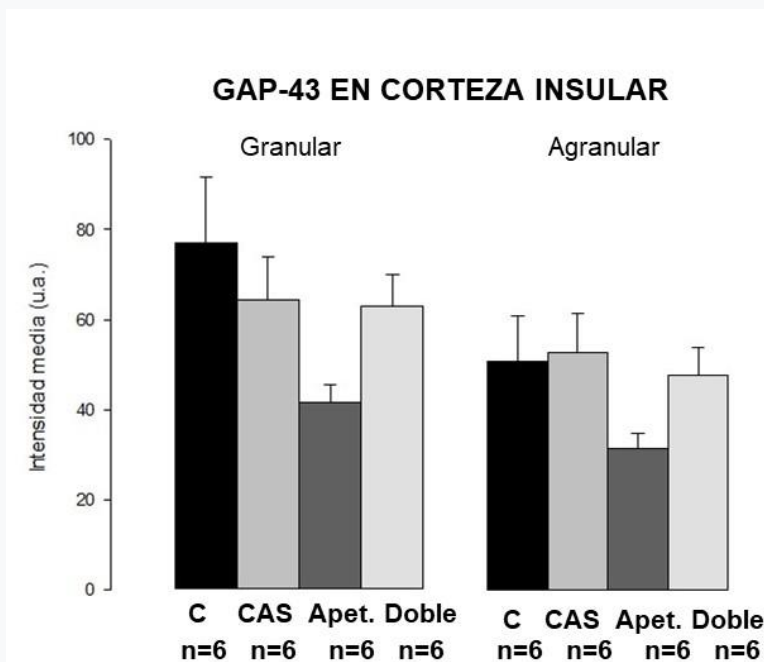
\*Diferente de Apetitivo y CTRL  $p < 0.001$ ,  
 +Diferente de Apetitivo, CTRL y CAS  $p < 0.001$ ,  
 \*\*Diferente de Apetitivo  $p < 0.001$ .

#### *Expresión de GAP-43 en Corteza Insular*

En la Figura 21 se muestra una imagen representativa de la expresión de GAP-43 en la CI. Se comparó la densidad óptica en los 4 grupos (control, CAS, apетitivo y Doble) en la capa granular. El ANOVA de medidas repetidas reveló que

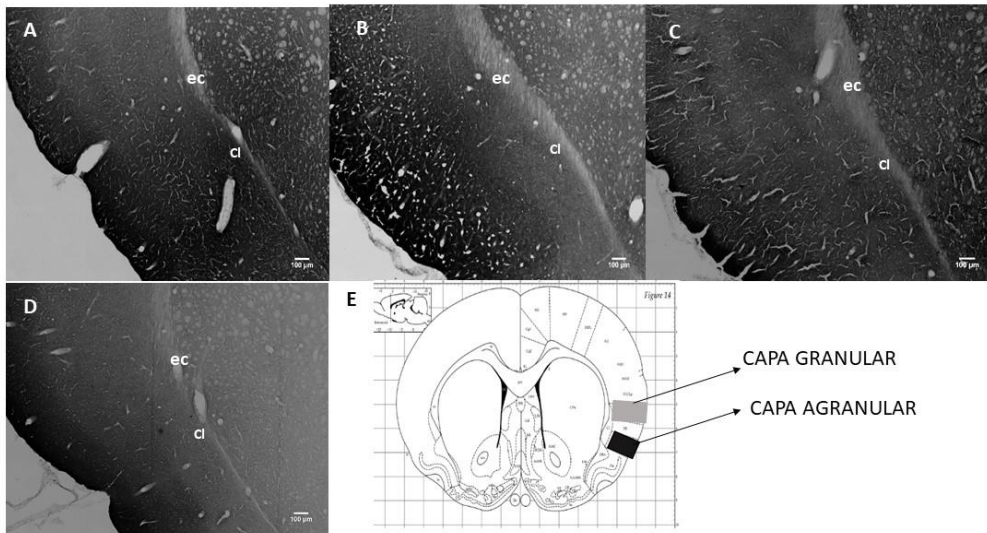


no existen diferencias significativas entre grupos en la capa granular ( $F(3,23) = 2.329$ ;  $P = 0,105$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos en la capa agranular ( $F(3,23) = 1.646$ ;  $P = 0,211$ ; Figura 19).



**Figura 20.** Densidad óptica de la expresión de GAP-43 en la capa granular y agranular en la Corteza Insular en los cuatro grupos (Control, CTA, Apetitivo y Doble CAS; N = 6 por grupo).

EXTINCIÓN  
GAP-43 CORTEZA INSULAR

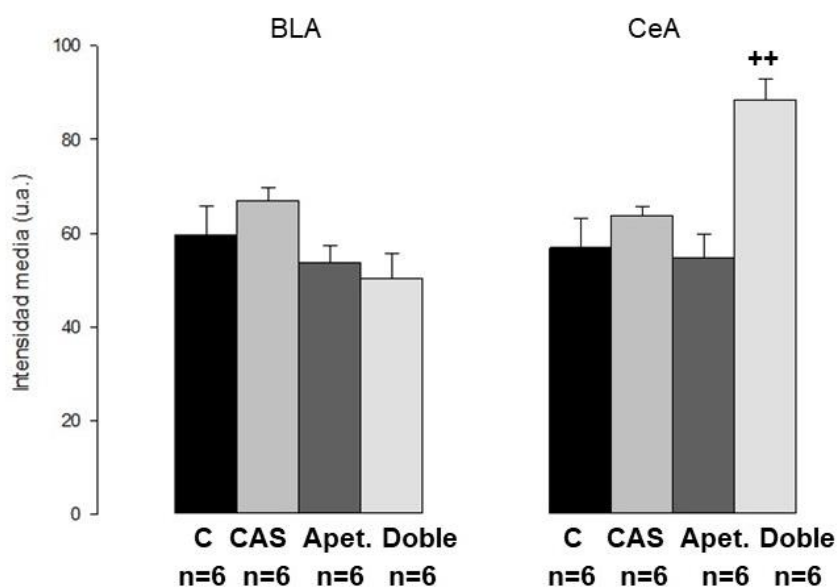


**Figura 21.** Inmunohistoquímica de la expresión de GAP-43 en la Corteza Insular (A) Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Doble CAS, (E) Representación histológica. Barra de calibración 100µm (n=6).

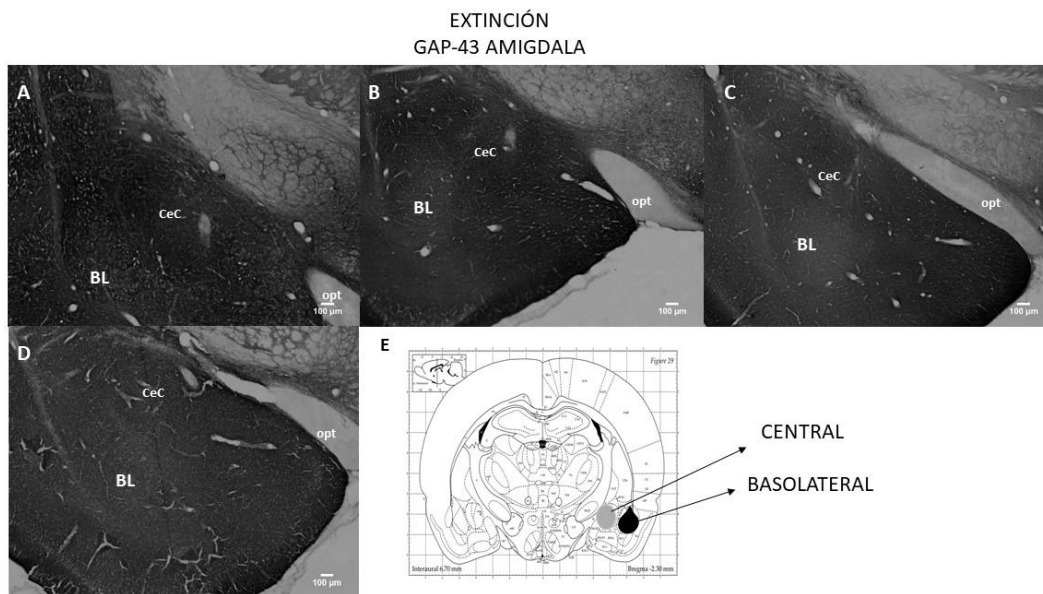
*Expresión de GAP-43 en Amígdala*

En la figura 23 se muestra una imagen representativa de la expresión de GAP-43 en la AMG. Se comparó la densidad óptica en los 4 grupos (control, CAS, apetitivo y Doble) en la BLA. El ANOVA reveló que no existe diferencia significativa ( $F(3,23) = 2.407$ ;  $P = 0,097$ ). En la CeA se encontraron diferencias significativas en el grupo con doble entrenamiento con respecto al control ( $F(3,23) = 11.031$ ;  $P < 0.001$ ; Figura 22), al igual que se encontraron diferencias significativas con el grupo con CAS ( $F(3,23) = 11.031$ ;  $P < 0.001$ ) y el grupo apetitivo ( $F(3,23) = 11.031$ ;  $P = 0.001$ ; Figura 22).

## GAP-43 EN AMIGDALA



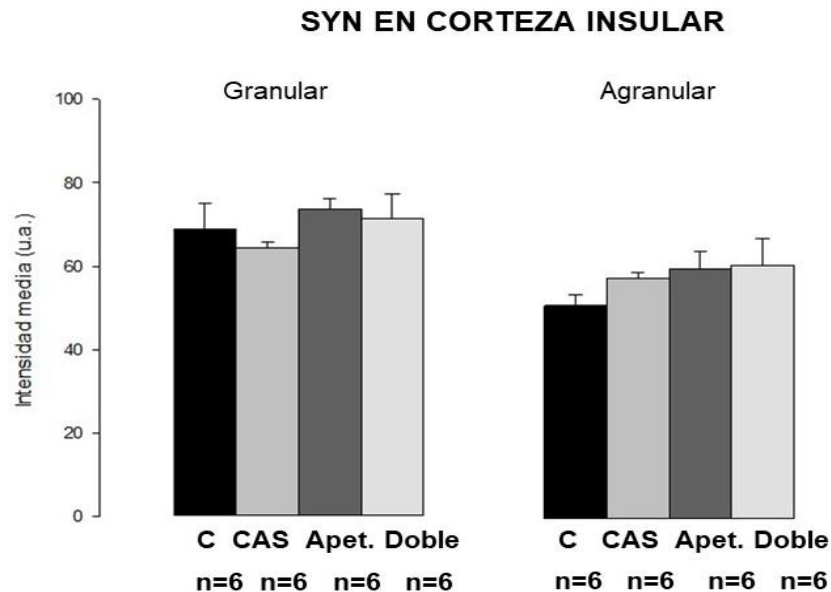
**Figura 22.** Densidad óptica de la expresión de GAP-43 en la BLA y CeA en los cuatro grupos (Control, CTA, Apetitivo y Doble CAS; N = 6 por grupo). ++Diferencia significativa con respecto al control, al grupo con CAS y al grupo apetitivo ( $P < 0.001$ )



**Figura 23.** Inmunohistoquímica de la expresión de GAP-43 en la Amígdala (A) Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Doble CAS, (E) Representación histológica. Barra de calibración 100  $\mu$ m (n=6).

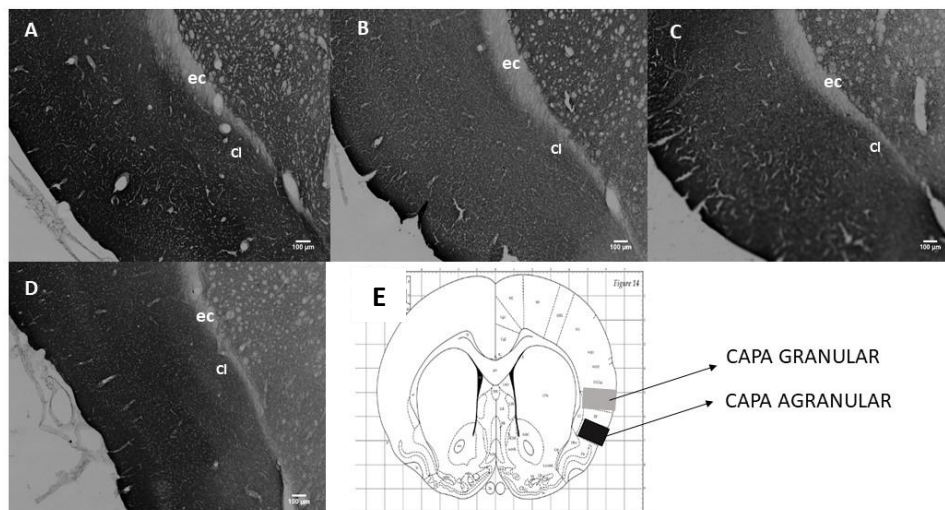
### Expresión de SYN en Corteza Insular

En la figura 25 se observa una imagen representativa de la expresión de SYN en la CI. Se comparó la densidad óptica en los 4 grupos (control, CAS, apetitivo y Doble CAS) en la capa granular. El ANOVA reveló que no existen diferencias significativas ( $F(3,23) = 0.796$ ;  $P = 0,510$ ); al igual que en la capa agranular no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $F(3,23) = 1.083$ ;  $P = 0,379$ ; Figura 24).



**Figura 24.** Densidad óptica de la expresión de SYN en la capa granular y agranular en la Corteza Insular en los cuatro grupos (Control, CTA, Apetitivo y Doble CAS; N = 6 por grupo).

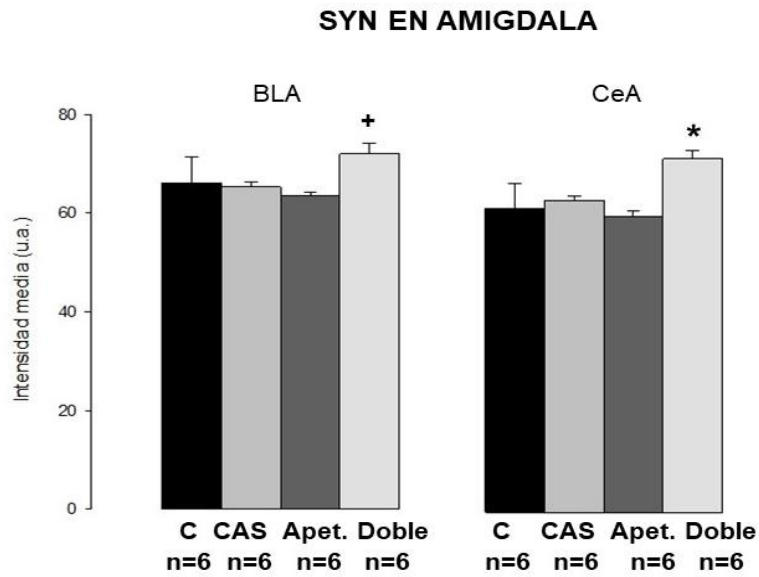
EXTINCIÓN  
SINAPTOFISINA CORTEZA INSULAR



**Figura 25.** Inmunohistoquímica de la expresión de sinaptofisina en la corteza insular (A) Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Doble CAS, (E) Representación histológica. Barra de calibración 100 μm. (n=6).

*Expresión de SYN en la amígdala*

Una imagen representativa de la expresión de SYN se observa en la Figura 27. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de densidad óptica de SYN entre grupos en BLA con respecto al control  $F(3,23) = 1.637$ ;  $P=0.212$ ), pero si se encontró una diferencia significativa en el grupo de doble entrenamiento con respecto al grupo apetitivo ( $F(3,23) = 1.637$ ;  $P=0.049$ ). En la CeA, se observó un aumento en la expresión de SYN en el grupo de doble entrenamiento en comparación con el grupo control ( $F(3,23) = 3.673$ ;  $P=0.016$ ), el grupo con CAS ( $F(3,23) = 3.673$ ;  $P=0.039$ ) y el grupo apetitivo ( $F(3,23) = 3.673$ ;  $P=0.006$ ) (Figura 26).

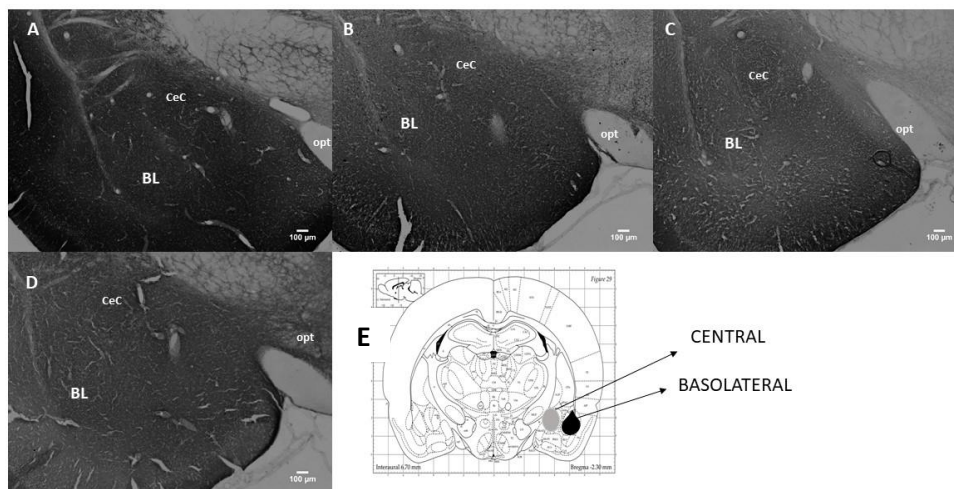


**Figura 26.** Densidad óptica de la expresión de SYN en la BLA y CeA de la Amígdala en los cuatro grupos (Control, CTA, Apetitivo y Doble CAS; N = 6 por grupo).

+Diferencia significativa con respecto al grupo apetitivo ( $P < 0.05$ ).

\*Diferencia significativa con respecto al control, CAS y al grupo apetitivo ( $P < 0.05$ ).

EXTINCIÓN  
SINAPTOFISINA AMIGDALA



**Figura 27.** Inmunohistoquímica de la expresión de Sinaptofisina en la Amígdala (A) Control, (B) CAS, (C) Apetitivo, (D) Doble CAS, (E) Representación histológica. Barra de calibración 100  $\mu\text{m}$  (n=6).

### 7.3 CONCLUSIÓN EXPERIMENTO 3 EXTINCIÓN

En este experimento evaluamos los cambios plásticos en la extinción del CAS, observándose un aumento en la expresión de GAP-43 en el grupo con sobre-entrenamiento, en la BLA y un aumento en SYN en la BLA y CeA, sugiriendo que un sobre-entrenamiento genera un brote neural en la BLA y una potenciación sináptica en la BLA y CeA estructuras que se ha demostrado juegan un papel en la extinción del aprendizaje aversivo. En estudios electrofisiológicos se observaron cambios en el tiempo de disparo de las neuronas de la CI, NTS, VPM y AMG en sujetos experimentales con un doble entrenamiento en comparación con el grupo con un solo condicionamiento (Buresová et al., 1979), demostrando que la CI y la AMG son estructuras claves en la evocación y mantenimiento de la memoria gustativa.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los resultados de la expresión de GAP-43 y SYN en los tres experimentos realizados en el presente trabajo.

**Tabla 1: Resumen de los resultados de los 3 experimentos donde evaluamos cambios en GAP-43 y SYN en la adquisición, evocación y extinción del CAS.**

EXPERIMENTOS	GAP-43				Sinaptofisina			
	CI		AMG		CI		AMG	
	Gr	Agr	BLA	CeA	Gr	Agr	BLA	CeA
<b>1: Adquisición</b>								
C	---	---	---	---	---	---	---	---
CAS	↑	---	---	---	↑	↑	↑	↑
APETITIVO	---	---	---	---	↑↑	↑↑	↑	↑
<b>2: Evocación</b>								
C	---	---	---	---	---	---	NA	NA
CAS	---	---	---	---	---	↓	NA	NA
APETITIVO	---	---	↑↑	---	---	↓	NA	NA
<b>3: Extinción</b>								
C	---	---	---	---	---	---	---	---
CAS	---	---	---	---	---	---	---	---
APETITIVO	↓	---	---	---	---	---	---	---
DOBLE	---	---	↑↑	---	---	---	↑	↑↑

--- Sin cambio

↑ Aumento con respecto al control

↑↑ Aumento con respecto al control y al grupo del CAS

↓ Menor que el control

NA No se analizó



## CAPITULO 8

### DISCUSIÓN GENERAL

Este estudio demuestra que la formación, evocación y extinción de la memoria gustativa apetitiva y aversiva del sabor, induce cambios estructurales y sinápticos diferenciales. La formación de memoria aversiva (CAS) provoca un aumento significativo en SYN en las capas granular y agranular de la CI, la CeA y la BLA. Además, la formación de memoria aversiva induce un aumento de GAP-43 en la capa granular de la CI, lo que sugiere que la representación de la memoria aversiva implica la formación de un nuevo circuito cortical (inferido por un aumento en GAP-43). Por el contrario, la formación de la memoria apetitiva aumenta la expresión SYN en la CI (ambas capas), la CeA y la BLA, pero no se observaron cambios en GAP-43 en ninguna de estas estructuras. Juntos estos resultados sugieren que la formación de la memoria gustativa requiere diferentes cambios plásticos en función de las consecuencias aprendidas tras una experiencia gustativa novedosa, aversiva o apetitiva (por ejemplo, cambios en la representación del gusto condicionado e incondicionado). Estos hallazgos concuerdan con varias pruebas previas que apoyan un papel crucial de la CI y la amígdala en la formación de la memoria gustativa, y con el hecho de que el aprendizaje está fuertemente asociado con la formación de sinapsis, así como la expresión de proteínas (Redondo et al., 2011; Fu et al., 2017; Wallrafen et al., 2019; Kemp et al., 2013; Lisman et al., 2018). En conjunto estos resultados demuestran que se requiere de la CI en la adquisición y almacenamiento de diferentes aprendizajes motivados aversivos. Por otro lado, encontramos un aumento en la expresión de GAP-43 en la evocación de la memoria apetitiva en la BLA, resultados que concuerdan con lo descrito en la literatura donde

demuestran que la CI recibe y envía proyecciones directas a la BLA (Arthurs et al., 2013; Lavi et al., 2018; Mcdonald, 1998). La aportación de este trabajo es la demostración de que existe un procesamiento diferencial entre ambas memorias (gustativas y aversivas). Los cambios estructurales que encontramos en la evocación solo fueron observados en la memoria apetitiva y no en la aversiva ya que no encontramos diferencias significativas en la expresión de GAP-43 y SYN (Experimento 2). Esto sugiere, que para la evocación de una memoria aversiva posiblemente se requiera otras vías de procesamiento neuronal.

En este estudio se demostró que la amígdala BLA tiene un papel importante en la evocación por el aumento de expresión en GAP-43, sugiriendo una reestructuración de la memoria gustativa, comprobando también que los cambios son dinámicos en el tiempo. Además, está bien establecido que tanto la amígdala como la CI son indispensables para la formación y retención de la memoria del sabor. Así, estas conexiones recíprocas de la CI con la amígdala podrían estar implicadas en la codificación relacionada con la recompensa durante la formación de la memoria apetitiva del gusto (Jezzini et al., 2012; Stone et al., 2011). En este sentido, los cambios de excitabilidad a largo plazo en la CI y en la BLA, participan en la codificación de palatabilidad y/o aversión al sabor (Acolla et al., 2011; Gal-Ben-Ari et al., 2011; Yasoshima et al., 1995), lo que podría estar relacionado con estructuras sinápticas cambiantes. Existe evidencia que demuestra que la estimulación tetánica en la BLA después del entrenamiento promueve la potenciación a largo plazo (LTP) en la CI y mejora la retención de la memoria del CAS, sugiriendo que los mecanismos de plasticidad sináptica en estas dos estructuras son parte de las adaptaciones de todo el circuito para el aprendizaje (Escobar et al., 2000). Además,

las inyecciones en la CI del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un importante modulador de la plasticidad sináptica, se correlacionaron con la inducción de LTP en la proyección BLA-CI (Escobar et al., 2003), mejorando la consolidación del CAS (Castillo et al., 2006).

Los presentes hallazgos demuestran una densidad significativamente mayor de GAP-43 en la CI, lo que sugiere modificaciones de los circuitos estructurales en esta área subcortical inferida con el aumento de GAP-43, después de la formación de la memoria gustativa aversiva pero no así en la memoria apetitiva. Esto indica que durante la asociación de un aprendizaje como el condicionamiento clásico, esta proteína podría jugar un papel importante. Por ejemplo, se ha sugerido que GAP-43 está asociada con procesos de memoria y reorganización de redes neuronales (Holahan et al., 2007; Holahan et al., 2017) y existe evidencia que indica que una reducción en GAP-43 en el cerebro adulto reduce la remodelación sináptica después del aprendizaje produciendo una red menos elaborada de la información almacenada (Rekart et al., 2005). El aumento en la expresión de GAP-43, se observó solo en ratas entrenadas para el condicionamiento aversivo al sabor, pero no en ratas que bebieron agua, lo que indica que el consumo por sí solo es un proceso de saciedad y no está relacionado con la expresión de GAP-43. Además, el consumo novedoso de la sacarina sin consecuencias aversivas no indujo un aumento en la expresión de GAP-43 en la adquisición, pero si en la evocación donde observamos un aumento en la expresión de GAP-43 en la BLA. Esto indica que el procesamiento de detección dulce y la codificación no están relacionados con cambios estructurales en la CI, pero que si tienen un efecto en la BLA en la evocación de memorias apetitivas. La evidencia

anterior demostró que el consumo de una solución novedosa de sacarina indujo incrementos significativos en el consumo diario de líquidos en comparación con el agua, lo que indica que el sabor dulce de la sacarina induce una respuesta apetitiva estable a las 24 h. La justificación de nuestro protocolo se basó en el hallazgo principal de que una sola sesión de beber un saborizante nuevo provoca una memoria gustativa a largo plazo (Nuñez-Jaramillo et al., 2010). Por este motivo se realizó un tercer experimento para demostrar si existían cambios perdurables en el tiempo al momento de la extinción del aprendizaje, ya que la memoria a largo plazo se manifiesta como una preferencia de sabor (es decir, memoria apetitiva) y esto se puede medir por los incrementos significativos en consumo del día a día. Por lo tanto, usamos los valores de consumo de solución de sacarina en comparación con el agua como una indicación de memoria del sabor, donde no se encontró un cambio significativo en la extinción de la memoria aversiva o apetitiva. En el grupo sobre-entrenado (que recibió el CAS en dos días consecutivos), encontramos un incremento de GAP-43 en la BLA y un aumento de SYN en la BLA y CeA. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Rodríguez-Ortiz en el 2007, donde demostraron que un sobre-entrenamiento (en este caso un segundo condicionamiento) genera un fortalecimiento en la memoria. Nuestros resultados demuestran que un sobre-entrenamiento induce un cambio estructural y funcional en las memorias gustativas, confirmando que la consolidación de la memoria es un evento dinámico (Rodríguez-Ortiz et al., 2007; Nithianantharajah et al., 2008; Klusa et al., 2013; Zhu et al., 2019).

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que estudia la expresión de GAP-43 en la CI y AMG, inducida por la adquisición, consolidación y extinción

de CAS. La evidencia de otros paradigmas muestra que GAP-43 juega un papel clave en la guía del crecimiento de los axones y en la modulación de la formación de nuevas conexiones (Latchney et al., 2014; Holahan et al., 2007; Bendotti et al., 1997; Benowitz et al., 1997; Cantallops et al., 1999).

También encontramos que los procesos involucrados durante y después del sabor novedoso de sacarina, pero no la exposición al agua, pueden inducir un aumento en la expresión de SYN en la capa granular del CI. A pesar de que hubo un aumento después de la sacarina durante el CAS, esta expresión fue mayor cuando la sacarina no fue aversiva, lo que sugiere que la formación de la memoria apetitiva induce fuertes cambios sinápticos, al igual que se observó un aumento en la expresión en el experimento de extinción en el grupo de doble CAS sugiriendo un aumento en el potencial sináptico en sujetos con sobre-entrenamiento. SYN es una proteína presináptica que participa en la liberación de neurotransmisores, y que aumenta durante la adquisición del aprendizaje (Nithianantharajah et al., 2008; Smith et al., 2000; Portero-Tresserra et al., 2018; Sagi et al., 2012) pero no existe evidencia sobre su participación en la extinción de un aprendizaje. El aumento de SYN podría reflejar un aumento en las vesículas sinápticas o en la densidad de vesículas por sinapsis. Cualquiera de estos cambios en SYN podría facilitar la conectividad sináptica entre poblaciones neuronales particulares (Nithianantharajah et al., 2008, Bergmann et al., 1997). SYN también se ha utilizado como marcador para evaluar la distribución y maduración de las sinapsis asociadas con la función cognitiva (Gordon et al., 2014; Zhu et al., 2019). Nuestros hallazgos sugieren que SYN en las capas granular y agranular de la CI está involucrada en la formación de memoria aversiva al sabor, porque encontramos un aumento de SYN 24 h después de la adquisición

de CAS. Además, en la BLA y CeA observamos un aumento en la densidad óptica de SYN después de la formación de la memoria aversiva y apetitiva. También encontramos un aumento en la expresión de SYN en el grupo con doble CAS en la extinción, lo que sugiere que ambas modalidades de aprendizaje inducen cambios sinápticos en las regiones cerebrales involucradas en la memoria gustativa, y en la extinción de la memoria aversiva.

Dentro de los trabajos realizados en este proyecto, por cuestiones de presupuesto solo en el primer experimento se realizó inmunofluorescencia y en los siguientes dos se hicieron inmunohistoquímicas, siendo esto una limitante para la realización de estudios de estereología, para los últimos dos experimentos. En un futuro sería importante la realización de estudios de estereología, además de que en este proyecto se evaluaron las proteínas GAP-43 y SYN, solo 24 hrs después de la adquisición, evocación y extinción. Por lo tanto, es preciso la realización de futuros experimentos para evaluar a GAP-43 y SYN, en las demás estructuras involucradas en la vía de señalización gustativa y observar si los cambios plásticos son perdurables en el tiempo.

## **CAPITULO 9**

### **CONCLUSIÓN GENERAL**

Los presentes resultados proporcionan evidencia de cambios plásticos diferenciales en los mecanismos neuronales subyacentes a la formación de la memoria aversiva o apetitiva. Donde GAP-43 parece estar asociado con la formación de un nuevo circuito en el condicionamiento aversivo al sabor, mientras que los cambios en SYN parecen estar asociados con la formación de memoria tanto aversiva como apetitiva. En general, los resultados actuales indican que las regiones de la CI y la amígdala son componentes distintos del circuito que subyacen a diferentes estructuras y procesos sinápticos durante la formación de memoria aversiva y apetitiva del sabor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to networks and physiology. *Physiol Rev* 85: 523-69.
2. Accolla R, A. Carleton, Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 4010–4015.
3. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965 Jun;124(3):319-35. doi: 10.1002/cne.901240303. PMID: 5861717.
4. Arthurs J, S. Reilly, Role of the gustatory thalamus in taste learning, *Behav. Brain Res.* 250 (2013) 9–17. [48] K. Lavi, G.A. Jacobson, K. Rosenblum, A. Luthi, Encoding of conditioned taste aversion in Cortico-Amygdala circuits, *Cell Rep.* 24 (2018) 278–283.
5. Barnekow A, Jahn R, Scharl M (1990). Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene.* 5(7):1019-24.
6. Bendotti C., S. Baldessari, M. Pende, T. Southgate, F. Guglielmetti, R. Samanin, Relationship between GAP-43 expression in the dentate gyrus and synaptic reorganization of hippocampal mossy fibres in rats treated with kainic acid, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 93–101.
7. Benowitz L & Routtenberg A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 8: 339-52.



8. Bergmann M, A. Post, I. Rittel, I. Bechmann, R. Nitsch, Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat, *Exp. Brain Res.* 117 (1997) 80–86.
9. Berman D.E., S. Hazvi, V. Neduva, Y. Dudai, The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace, *J. Neurosci.* 20 (2000) 7017–7023.
10. Bermudez-Rattoni F. (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 209-17.
11. Bermudez-Rattoni F., J.L. Mcgaugh, Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion, *Brain Res.* 549 (1991) 165–170.
12. Bermudez-Rattoni F., Molecular mechanisms of taste-recognition memory, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 209–217.
13. Bernstein I.L., M.T. Koh, Molecular signaling during taste aversion learning, *Chem. Senses* 32 (2007) 99–103.
14. Bliss TVP, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–9.
15. Buresová O, Aleksanyan ZA, Bures J. Electrophysiological analysis of retrieval of conditioned taste aversion in rats. Unit activity changes in critical brain regions. *Physiol Bohemoslov.* 1979;28(6):525-36. PMID: 160574.
16. Buresová O, ZA Aleksanyan, Bures J. Electrophysiological analysis of retrieval of conditioned taste aversion in rats. Unit activity changes in critical brain regions. *Physiol Bohemoslov.* 1979;28(6):525-36.

17. Callaghan CK, & Kelly ÁM Neurotrophins play differential roles in short and long-term recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. (2013)
18. Cantallops I., A. Routtenberg, Activity-dependent regulation of axonal growth: posttranscriptional control of the GAP-43 gene by the NMDA receptor in developing hippocampus, *J. Neurobiol.* 41 (1999) 208–220.
19. Carleton A, Accolla R, Simon SA. Coding in the mammalian gustatory system. *Trends Neurosci.* 2010 Jul;33(7):326-34.
20. Castillo D.V., Y. Figueroa-Guzman, M.L. Escobar, Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention, *Brain Res.* 1067 (2006) 250–255.
21. Cui Z, K.A. Lindl, B. Mei, S. Zhang, J.Z. Tsien, Requirement of NMDA receptor reactivation for consolidation and storage of nondeclarative taste memory revealed by inducible NR1 knockout, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 755–763.
22. Denny J.B., Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43, *Curr. Neuropharmacol.* 4 (2006) 293–304.
23. Desmedt A., S. Hazvi, Y. Dudai, Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of the associative process engaged: taste versus context association, *J. Neurosci.* 23 (2003) 6102–6110.
24. Dudai Y, M. Eisenberg, Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis, *Neuron* 44 (2004) 93–100.

25. Escobar ML, F. Bermudez-Rattoni, Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention, *Brain Res.* 852 (2000) 208–212.
26. Escobar ML, V. Chao, F. Bermudez-Rattoni, In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence, *Brain Res.* 779 (1998) 314–319.
27. Escobar ML, Y. Figueroa-Guzman, A. Gomez-Palacio-Schjetnan, In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor, *Brain Res.* 991 (2003) 274–279.
28. Ferreira G., M.I. Miranda, V. De La Cruz, C.J. Rodriguez-Ortiz, F. Bermudez-Rattoni, Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 2596–2604.
29. Frey U., R.G. Morris, Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP, *Neuropharmacology* 37 (1998) 545–552.
30. Fu A.K., N.Y. Ip, Regulation of postsynaptic signaling in structural synaptic plasticity, *Curr. Opin. Neurobiol.* 45 (2017) 148–155.
31. Gal-Ben-Ari S, K. Rosenblum, Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex, *Front. Behav. Neurosci.* 5 (2011) 87.
32. Gallo M, G. Roldan, J. Bures, Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats, *Behav. Brain Res.* 52 (1992) 91–97.

33. Garcia J, P.S. Lasiter, F. Bermudez-Rattoni, D.A. Deems, A general theory of aversion learning, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 443 (1985) 8–21.
34. Gordon SL, M.A. Cousin, The Sybtraps: control of synaptobrevin traffic by synaptophysin, alpha-synuclein and AP-180, *Traffic* 15 (2014) 245–254. [34]
35. Grasselli G, P. Strata, Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43, *Front. Neural Circuits* 7 (2013) 25.
36. Greenough WT (2004) Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biol* 1:351–63.
37. Gutierrez H., R. Gutierrez, L. Ramirez-Trejo, R. Silva-Gandarias, C.E. Ormsby, M. I. Miranda, F. Bermudez-Rattoni, Redundant basal forebrain modulation in taste aversion memory formation, *J. Neurosci.* 19 (1999) 7661–7669.
38. Hernández-Muela S, Mulas F, Mattos L. (2004) Plasticidad neuronal funcional. *REV NEUROL* 38 (Supl 1): S58-S68.
39. Hinz B, Becher A, Mitter D, Schulze K Heinemann U, Draguhn A, Ahnert-Hilter G. Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol* 80(2001): 615-9.
40. Holahan M, Honegger K, Tabatadze N, Routtenberg A. (2007) GAP-43 gene expression regulates information storage. *Learn Mem* 14: 407-15.
41. Holahan MR, A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity, *Front. Cell. Neurosci.* 11 (2017) 266.
42. Holahan MR, K.S. Honegger, N. Tabatadze, A. Routtenberg, Gap-43 gene expression regulates information storage, *Learn. Mem.* 14 (2007) 407–415.

43. Hulo S., Alberi, T. Laux, D. Muller, P. Caroni, A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity, *Eur. J. Neurosci.* 15 (2002) 1976–1982.
44. Janz R, Südhof T, Hammer R, Unni V, Siegelbaum S, Bolshakov V (1999) Essential Roles in Synaptic Plasticity for Synaptogyrin I and Synaptophysin I. *Neuron* 24, 687–700.
45. Jezzini A., L. Mazzucato, G. La Camera, A. Fontanini, Processing of hedonic and chemosensory features of taste in medial prefrontal and insular networks, *J. Neurosci.* 33 (2013) 18966–18978.
46. Jimenez B., R. Tapia, Biochemical modulation of NMDA receptors: role in conditioned taste aversion, *Neurochem. Res.* 29 (2004) 161–168.
47. Johansen-Berg C, Baptista CS, Thomas AG Human structural plasticity at record speed. *Neuron* 73(2012) (6):1058-60.
48. Jones MW, P.J. French, T.V. Bliss, K. Rosenblum, Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo, *J. Neurosci.* 19 (1999) RC36.
49. Kandel E.R., The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses, *Science* 294 (2001) 1030–1038.
50. Kemp A., W. Tischmeyer, D. Manahan-Vaughan, Learning-facilitated long-term depression requires activation of the immediate early gene, c-fos, and is transcription dependent, *Behav. Brain Res.* 254 (2013) 83–91.
51. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391–9.

52. Klusa V, R. Muceniece, S. Isajevs, D. Isajeva, U. Beitnere, I. Mandrika, J. Pupure, J. Rumaks, B. Jansone, I. Kalvinsh, H.V. Vinters, Mildronate enhances learning/ memory and changes hippocampal protein expression in trained rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 106 (2013) 68–76.
53. Koh MT, I.L. Bernstein, Mapping conditioned taste aversion associations using c- Fos reveals a dynamic role for insular cortex, *Behav. Neurosci.* 119 (2005) 388–398.
54. Kolb B & Whishaw I. (1998) Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol* 49: 43-64.
55. Lerch J.P., A.P. Yiu, A. Martinez-Canabal, T. Pekar, V.D. Bohbot, P.W. Frankland, R.M. Henkelman, S.A. Josselyn, J.G. Sled, Maze training in mice induces MRI-detectable brain shape changes specific to the type of learning, *Neuroimage* 54 (2011) 2086–2095.
56. Leuner B, Falduto J, Shors TJ Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23(2003):659–65
57. Li S, Reinprecht I, Fahnstock M, Racine R. (2002) Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex and entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* 115: 1221-29.
58. Lisman J, K. Cooper, M. Sehgal, A.J. Silva, Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability, *Nat. Neurosci.* 21 (2018) 309–314.

59. Madsen TM, Kristjansen PE, Bolwig TG, Wortwein G (2003) Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119:635–42.
60. Maviel T, T.P. Durkin, F. Menzaghi, B. Bontempi, Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory, *Science* 305 (2004) 96–99.
61. McDonald A.J., Cortical pathways to the mammalian amygdala, *Prog. Neurobiol.* 55 (1998) 257–332.
62. McGaugh J.L., Memory—a century of consolidation, *Science* 287 (2000) 248–251.
63. McMahon H, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC (1996) Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 4760–4764.
64. Merhav M, K. Rosenblum, Facilitation of taste memory acquisition by experiencing previous novel taste is protein-synthesis dependent, *Learn. Mem.* 15 (2008) 501–507.
65. Miranda MI, G. Ferreira, L. Ramirez-Lugo, F. Bermudez-Rattoni, Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 11417–11422.
66. Miranda MI, G. Ferreira, L. Ramirez-Lugo, F. Bermudez-Rattoni, Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding, *Neurobiol. Learn. Mem.* 80 (2003) 211–222.
67. Miranda MI, R.T. Lalumiere, T.V. Buen, F. Bermudez-Rattoni, J.L. McGaugh, Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 2605–2610.

68. Mokin M, Zheng Z, Keifer J. (2007) Conversion of silent synapses into the active pool by selective GluR1-3 and GluR4 AMPAR trafficking during in vitro classical conditioning. *J Neurophysiol* 98: 1278-86.
69. Molero-Chamizo A., I. Moron, Latent inhibition of conditioned taste aversion in rats with excitotoxic dorsal hippocampal lesions, *J. Neurosci. Res.* 93 (2015) 1740–1747.
70. Nachman M & Ashe J.H. (1973) Learned taste aversions in rats as a function of dosage, concentration, and route of administration of LiCl. *PhysiolBehav* 10:73-8.
71. Nithianantharajah J, & Murphy M. (2008) Auditory specific fear conditioning results in increased levels of synaptophysin in the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 90: 36-43.
72. Nunez-Jaramillo L, L. Ramirez-Lugo, W. Herrera-Morales, M.I. Miranda, Taste memory formation: latest advances and challenges, *Behav. Brain Res.* 207 (2010) 232–248.
73. Palikhova TA (2000) Synapses identifiable in the parietal ganglia of the snail *Helix lucorum*. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 5:775-90.
74. Pascale A., P.A. Gusev, M. Amadio, T. Dottorini, S. Govoni, D.L. Alkon, A. Quattrone, Increase of the RNA-binding protein HuD and posttranscriptional up-regulation of the GAP-43 gene during spatial memory, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 1217–1222.
75. Paxinos G., C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, NY Academic Press, New York, 2013.



76. Portero-Tresserra M, M. Marti-Nicolovius, M. Tarres-Gatius, A. Candalija, G. Guillazo-Blanch, A. Vale-Martinez, Intra-hippocampal D-cycloserine rescues decreased social memory, spatial learning reversal, and synaptophysin levels in aged rats, *Psychopharmacology (Berl.)* 235 (2018) 1463–1477.
77. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A.-S., MacNamara J, Williams S. (2001) *Plasticity of Mature Synapses and Circuits*. In *Neuroscience* (ed. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A.-S., MacNamara J, Williams S.): Sinauer Associates, Inc.
78. Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 71(3):708-12.
79. Radley JJ, Johnson LR, Janssen WG, Martino J, Lamprecht R, Hof PR (2006). Associative Pavlovian conditioning leads to an increase in spinophilin-immunoreactive dendritic spines in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 24:876–84.
80. Redondo RL, R.G. Morris, Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis, *Nat. Rev. Neurosci.* 12 (2011) 17–30.
81. Reilly S, M.A. Bornoalova, Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (2005) 1067–1088.
82. Rekart J.L., K. Meiri, A. Routtenberg. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice, *Hippocampus* 15 (2005) 1–7.
83. Rodriguez-Duran LF, M.L. Escobar, NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular

- cortex induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity, *Behav. Brain Res.* 266 (2014) 58–62.
84. Rodriguez-Ortiz C.J., I. Balderas, F. Saucedo-Alquicira, P. Cruz-Castaneda, F. Bermudez-Rattoni, Long-term aversive taste memory requires insular and amygdala protein degradation, *Neurobiol. Learn. Mem.* 95 (2011) 311–315.
85. Rodriguez-Ortiz CJ, F Bermúdez-Rattoni. Memory Reconsolidation or Updating Consolidation? In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 11.
86. Rosenblum K, D.E. Berman, S. Hazvi, R. Lamprecht, Y. Dudai, Nmda receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex, *J. Neurosci.* 17 (1997) 5129–5135. ro
87. Rosenblum K, N. Meiri, Y. Dudai, Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex, *Behav. Neural Biol.* 59 (1993) 49–56.
88. Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. (2000) Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7657-62.
89. Sagi Y, I. Tavor, S. Hofstetter, S. Tzur-Moryosef, T. Blumenfeld-Katzir, Y. Assaf, Learning in the fast lane: new insights into neuroplasticity, *Neuron* 73 (2012) 1195–1203.
90. Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci* 103:17501–6.

91. Schier LA, K. Hashimoto, M.B. Bales, G.D. Blonde, A.C. Spector, High-resolution lesion-mapping strategy links a hot spot in rat insular cortex with impaired expression of taste aversion learning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 1162–1167.
92. Schmitt U, N. Tanimoto, M. Seeliger, F. Schaeffel, R.E. Leube, Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin, *Neuroscience* 162 (2009) 234–243.
93. Smith TD, M.M. Adams, M. Gallagher, J.H. Morrison, P.R. Rapp, Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats, *J. Neurosci.* 20 (2000) 6587–6593.
94. Stone ME, A. Maffei, A. Fontanini, Amygdala stimulation evokes time-varying synaptic responses in the gustatory cortex of anesthetized rats, *Front. Integr. Neurosci.* 5 (2011) 3.
95. Sugita S, Janz R, Südhof TC (1999) Synaptogyrins regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18893–18901.
96. Swank MW, Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning, *Neuroreport* 11 (2000) 1625–1630.
97. Thome, T. Kelly, A. Yanez, C. Schultz, M. Engelhardt, S.B. Cambridge, M. Both, A. Draguhn, H. Beck, A.V. Egorov, Axon-carrying dendrites convey privileged synaptic input in hippocampal neurons, *Neuron* 83 (2014) 1418–1430.
98. Tian SY, J.F. Wang, Y.B. Bezchlibnyk, L.T. Young, Immunoreactivity of 43 kDa growth-associated protein is decreased in post mortem hippocampus of bipolar disorder and schizophrenia, *Neurosci. Lett.* 411 (2007) 123–127.

99. Toda T, Gage FH. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* 2018 Sep;373(3):693-709. doi: 10.1007/s00441-017-2735-4. Epub 2017 Nov 29. PMID: 29185071.
100. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: leading actor or wal-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26: 445-53.
101. Vera-Rivera G., M.I. Miranda, J.A. Rangel-Hernandez, D. Badillo-Juarez, D. Fregoso-Urrutia, S. Caynas-Rojas, Effects of caloric or non-caloric sweetener long-term consumption on taste preferences and new aversive learning, *Nutr. Neurosci.* 23 (2020) 128–138.
102. Waites CL, Craig AM, Garner CC Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* (2005) 28:251–74.
103. Wallrafen R, T. Dresbach, J.S. Viotti, Quantifying the heterogeneous distribution of a synaptic protein in the mouse brain using immunofluorescence, *J. Vis. Exp.* (2019).
104. Wiedenmann B & Franke W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41(1985): 1017-28.
105. Xu L, J. Long, Z. Su, B. Xu, M. Lin, Y. Chen, D. Long, Restored presynaptic synaptophysin and cholinergic inputs contribute to the protective effects of physical running on spatial memory in aged mice, *Neurobiol. Dis.* 132 (2019), 104586.

106. Yasoshima Y, T. Shimura, T. Yamamoto, Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats, *Neuroreport* 6 (1995) 2424–2428.
107. Yasoshima Y, T. Yamamoto, Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats, *Neuroscience* 84 (1998) 1–5.
108. Yiannakas A., K. Rosenblum, The insula and taste learning, *Front. Mol. Neurosci.* 10 (2017) 335.
109. Zhu X, P. Wang, H. Liu, J. Zhan, J. Wang, M. Li, L. Zeng, P. Xu, Changes and significance of SYP and GAP-43 expression in the Hippocampus of CIH rats, *Int. J. Med. Sci.* 16 (2019) 394–402.