

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**VISUALIZACIÓN TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE ARC
DURANTE EL APRENDIZAJE DEL CONDICIONAMIENTO DE
AVERSIÓN AL SABOR POR MEDIO DE HIBRIDACIÓN *IN SITU***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A :
CRISTINA ZAMORANO NG TEAJAN**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ

DR. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna, **ZAMORANO NG TEAJAN CRISTINA** con número de cuenta **302573435** con la tesis titulada **"Visualización temporal de la expresión de Arc durante el aprendizaje del condicionamiento de aversión al sabor por medio de hibridación in situ"**, realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI**.

Presidente: DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ
Vocal: DR. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA
Secretario: M. EN C. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE
Suplente: DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA
Suplente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de noviembre de 2011.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar los estudios de maestría dentro de dicho programa.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Fue dirigido por el Dr. Federico Bermúdez Rattoni, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto: 60478, y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) proyecto: IN216709.

Agradezco también el apoyo económico que recibí del CONACYT que me brindó la beca nacional (234313) durante mis estudios de maestría en el Posgrado en Ciencias Biológicas.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Martha L. Escobar Rodríguez y el Dr. Víctor Ramírez Amaya, por sus invaluable consejos, comentarios, y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo, pero principalmente agradezco su paciencia y el ejemplo que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, el Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la valiosa asesoría que me brindó durante la elaboración de esta tesis, y especialmente por la confianza que depositó en mí para realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Azul, Consuelo, Daniel, Eduardo, Ernesto, Julio, Kioko, Lucía, Mónica y Paola. Gracias por brindarme su amistad, por las experiencias compartidas, consejos y su muy grata compañía dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Víctor Ramírez Amaya y a su equipo técnico, por toda su ayuda, por permitirme trabajar en su laboratorio, así como su apoyo con instrumentos y equipo. Asimismo agradezco sus consejos y contribuciones al desarrollo de este trabajo.

Agradezco a las Técnicas Académicas Israela Balderas y Perla Moreno Castilla por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Técnico Académico M en C. Carlos Lozano Flores por haberme brindado su apoyo técnico durante la realización de las hibridaciones in situ de mi proyecto de tesis de maestría.

Al personal de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en particular a la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano y al Biól. Gabriel Orozco Hoyuela.

Agradezco a los miembros del jurado integrado por los Drs. Martha Lilia Escobar Rodríguez, Víctor Ramírez Amaya, Paola García de la Torre, Fernando Peña Ortega, y Julio Eduardo Roque Morán Andrade por la revisión y comentarios realizados a esta tesis.

DEDICATORIA

A toda mi familia, padres, hermanos, tíos, primos y amigos. Porque todos ustedes forman parte importante de mi vida y de mis sueños a lograr, porque creen en mí, porque todas las experiencias a su lado me han enseñado algo nuevo, y hoy tengo el gusto de poder compartir mis logros con ustedes. Les agradezco infinitamente su apoyo y les dedico con mucho cariño este trabajo.

A mi madre Cristina, a quien le debo todo lo que soy. Gracias por tu entrega, tu infinito cariño, paciencia, comprensión, apoyo, y por estar incondicionalmente a nuestro lado.

A mi padre Rafael, por tu gran cariño, por la paciencia y el apoyo incondicional que me has brindado siempre. Gracias por confiar en mí y siempre tener las palabras correctas que me motivan a seguir.

A mis hermanos, Rafael, David, Sofía y Rebeca, quienes iluminan mi vida. Gracias porque me han apoyado siempre, porque hemos compartido tanto y por lo mucho que me han enseñado. Los quiero con el alma.

A Ricardo, mi cómplice, por ser quien es. Gracias por el apoyo, por el cariño, por la confianza, por lo compartido, por lo vivido. Te adoro.

A Cristina, Montserrat, Diana y Claudia, mis compañeras de grandes experiencias. Gracias por su linda y valiosa amistad a lo largo de estos años. Las quiero mucho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I.- INTRODUCCIÓN	13
II.- ANTECEDENTES	15
1.1.- Plasticidad en el sistema nervioso y memoria	15
1.2.- Cambios plásticos y la formación de la memoria	18
1.3.- Genes de expresión inmediata (GEI)	19
1.4.- El gen de transcripción inmediata <i>Arc/Arg 3.1</i>	20
1.5.- Identificación de poblaciones neuronales por medio de catFISH	20
1.6.- Aprendizaje asociativo	22
III.- MEMORIA GUSTATIVA	25
3.1.- Condicionamiento de aversión al sabor	26
3.2.- Vías de procesamiento de la información gustativa	27
3.3.- La corteza insular y su participación en el CAS	28
3.4.- La amígdala basolateral y su participación en el CAS	29
3.5.- Activación de poblaciones neuronales en la adquisición del CAS	31
IV.- ANTECEDENTES DIRECTOS EN RELACIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	34
4.2.- Enfermedad de Alzheimer	34
4.3.- Ratón triple transgénico 3x-Tg modelo de la enfermedad de Alzheimer	35
4.4.- CAS en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer	37
V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS, OBJETIVOS	40
5.1.- Planteamiento del problema	40
5.2.- Hipótesis	40
5.3.- Objetivos	40

VI.- METODOLOGÍA	41
6.1.- Sujetos	41
6.2.- Procedimiento conductual	41
6.3.- Sacrificio y procesamiento del tejido	43
6.4.- Hibridación in situ fluorescente (FISH)	43
6.5.- Análisis confocal	44
6.6.- Análisis de imágenes	44
6.7.- Genotipificación	45
6.8.- Análisis estadístico	45
VII.- RESULTADOS	46
7.1.- Consumo de agua durante la línea basal	46
7.2.- Análisis de imágenes	46
7.3.- Identificación de neuronas que expresan <i>Arc</i> después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la CI de animales de tipo silvestre	49
7.4.- Identificación de neuronas que expresan <i>Arc</i> después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la CI de animales 3x-Tg AD	51
7.5.- Identificación de neuronas que expresan <i>Arc</i> después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la ABL de animales de tipo silvestre	53
7.6.- Identificación de neuronas que expresan <i>Arc</i> después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la ABL de animales 3x-Tg AD	55
VIII.- DISCUSIÓN	58
8.1.- Convergencia de estímulos en la corteza insular y amígdala basolateral después de la adquisición del CAS en animales de tipo silvestre	58
8.2.- Convergencia de estímulos en la corteza insular y amígdala basolateral después de la adquisición del CAS en animales 3x-Tg AD	62
IX.- CONCLUSIONES	67
X.- BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dibujo realizado por Descartes para explicar como la información sensorial llega al sistema nervioso. (Spatz, 1995).

Figura 2.1. Ilustraciones de dos circuitos corticales hipotéticos, según Hebb. (Hebb, 1949)

Figura 2.4. Expresión de Arc en núcleo y citoplasma. (Guzowski et al; 1999).

Figura 3. Tipos de conducta que se observan como consecuencia de haber ingerido un sabor nuevo. (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

Figura 3.1. Esquema representativo del paradigma conductual del CAS. (Modificado de Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

Figura 3.2. Dibujo esquemático de las vías de procesamiento de la información gustativa. (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

Figura 3.3. Ubicación de la corteza gustativa en el cerebro de rata. (Accolla et al; 2007).

Figura. 3.4. Corte coronal del cerebro de la rata donde se muestra los distintos núcleos de la amígdala. (Modificado de Swanson L. W., 1992).

Figura 3.5. Expresión de Arc en células de la ABL y de la CI de rata. (Barot et al; 2008).

Figura 4.2.1 Ratón triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer. (Oddo et al; 2003).

Figura 4.2.2. Acumulación de beta-amiloide en hipocampo y amígdala de tejido de ratón 3x-Tg. (Billings et al; 2005).

Figura 4.3. Prueba de memoria en ratones transgénicos (PS1 + APP) y ratones de tipo silvestre después del CAS. (Pistell et al; 2008).

Figura 4.4. Prueba de memoria después del CAS en ratones 3x-Tg AD y ratones de tipo silvestre. (Moreno et al; 2010).

Figura 6.2.1. Esquema del protocolo conductual del CAS

Figura 6.2.2. En a) se muestra el protocolo conductual que se utilizó para el grupo del EC, los días 1 a 5 se presentó agua por 5 minutos y se registró el consumo, el sexto día, se muestra en b) y se presentó únicamente la sacarina por 5 minutos.

Figura 7.1. Consumo de línea base de agua y sacarina de ratones de tipo silvestre y 3x-Tg AD.

Figura 7.2.1 Expresión de Arc en neuronas después de la presentación de los estímulos del CAS.

Figura 7.2.2. Esquema representativo de las sección analizada de la corteza insular. (modificado de Paxinos & Watson, 1998).

Figura 7.2.3 Esquema representativo de la sección analizada de la amígdala basolateral. (modificado de Paxinos & Watson, 1998).

Figura 7.3.1. Activación de neuronas que expresan Arc en citoplasma o núcleo en la corteza insular de ratones silvestres de 9-11 meses de edad.

Figura 7.3.2. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo y citoplasma en la corteza insular de ratones silvestres de 9-11 meses de edad.

Figura 7.4.1. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo o citoplasma en la corteza insular de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad.

Figura 7.4.2. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo y citoplasma en la corteza insular de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad.

Figura 7.5.1. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo o citoplasma en la ABL de ratones silvestres de 9-11 meses de edad.

Figura 7.5.2. Activación de neuronas de la ABL de ratones silvestres de 9-11 meses de edad que expresan Arc en núcleo y citoplasma.

Figura 7.6.1. Activación de neuronas en la ABL de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad que expresan Arc en núcleo o citoplasma.

Figura 7.6.2. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo y citoplasma en la ABL de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad.

Figura 8.2.1. A) Neofobia en animales de tipo silvestre y 3x-Tg de 2-5 y 9 meses de edad. (Moreno-Castilla et al; 2010).

RESUMEN

Una de las capacidades que tienen los organismos es la de poder adquirir información del ambiente, les permite sobrevivir y adaptarse a los cambios del medio que los rodea. A ésta capacidad se le denomina aprendizaje, y se cree que la coincidencia de estímulos en células específicas es lo que determina en dónde se llevarán las modificaciones que permitirán el almacenamiento de la memoria. La memoria gustativa permite a los animales distinguir si han probado un sabor previamente, y cuando el consumo del sabor tiene consecuencias nocivas se evita beber del mismo. Durante el condicionamiento de aversión al sabor (CAS), se asocia un estímulo gustativo (estímulo condicionado, EC), presentado como un sabor novedoso, con un estímulo visceral (estímulo incondicionado, EI), provocado por un inductor de malestar gástrico. Se ha determinado que la corteza insular (CI) y la amígdala basolateral (ABL) son estructuras necesarias para el aprendizaje de aversión al sabor y su almacenamiento a lo largo del tiempo. Se ha visto que modelos murinos que desarrollan la patología de la enfermedad de Alzheimer (EA), son incapaces de adquirir el CAS. La EA se caracteriza por pérdida de memoria y déficits cognitivos, y su patología se caracteriza por la acumulación del péptido beta amiloide y la proteína tau hiperfosforilada. Los ratones 3x-Tg (PS1M146V, APP Swe, tau P301L) que desarrollan la patología de la EA, no son capaces de adquirir el CAS a los 9 meses. La técnica de catFISH permite visualizar poblaciones neuronales activadas por dos eventos distintos, a través de la detección del gen *Arc/Arg 1.3*. Es muy útil para estudiar la actividad neuronal provocada por dos estímulos separados por un periodo corto de tiempo, y brinda una resolución celular. En este trabajo usamos la técnica de catFISH para identificar las células de la CI y ABL que fueron activadas por el EC, EI o ambos después del CAS en ratones de tipo silvestre y 3x-Tg de 9-10 meses. Los resultados obtenidos indican que hay un incremento en el número de neuronas de la CI y la ABL de animales de tipo silvestre, donde coincide la información del EC y del EI, después del CAS. El aumento en el número de neuronas activadas a causa de la convergencia de estímulos no se observa en la CI o ABL de los ratones 3x-Tg. La presentación de los EC o EI solos, también causa un aumento en el número de neuronas que expresan *Arc* en la CI y ABL de ratones silvestres, no así en los ratones 3x-Tg.

ABSTRACT

The capability that lets organisms acquire information from the environment is known as learning, which allows them to adapt and survive to the surrounding conditions. It's believed that stimuli convergence in specific cells during learning will determine where plastic changes will occur in order to store memory over time. Taste recognition memory allows animals to discriminate flavors depending on their familiarity, which means they remember if they were tasted or not before. When a novel flavor has negative consequences the animal will avoid consuming it. During conditioned taste aversion (CTA), a novel taste is associated (conditioned stimulus, CS) with gastric malaise (unconditioned stimulus, US). It has been established that the insular cortex (IC) and the basolateral amygdala (BLA) are two structures involved in learning and memory storage of CTA. It has also been shown that murine models that develop Alzheimer's disease (AD) pathology are incapable of acquiring a CTA paradigm. AD is characterized by memory loss and cognitive deficits, whereas its pathology is distinguished by beta-amyloid peptide and hyperphosphorylated tau protein accumulation. The triple transgenic mice (3x-Tg) (PS1M146V, APP Swe, tau P301L), which develop AD pathology, are incapable of acquiring CTA paradigm at approximately nine months old. CatFISH technique is used to identify neurons expressing *Arc* mRNA and allows visualizing activated neuronal populations by different behavioral events. It's also very useful when studying neuronal activity after two stimuli presentation, and it offers a cellular resolution. In this work, we used catFISH technique in order to identify IC and BLA cells activated by CS, US or both, after CTA in 9-10 month old wild type and 3x-Tg mice. The obtained results reveal an increase in neuron number in the IC and the BLA of wild type animals where the stimuli information converges after CTA acquisition. There is no increase observed in CI and BLA cells of 3x-Tg animals after CTA acquisition caused by stimuli convergence. The stimuli presentation in a separated manner also caused an increase in the number of neurons activated in the IC and BLA of wild type animals, whereas in 3x-Tg animals no increased was observed.

I.- INTRODUCCIÓN

Una pregunta central en la investigación de procesos cognitivos, como la memoria y el aprendizaje, ha sido el cómo y el dónde en el sistema nervioso ocurren los mecanismos que permiten el procesamiento y almacenamiento de la información que adquiere un organismo. A lo largo de la historia se han realizado preguntas y postulados teóricos para aproximarse al estudio de este tema. En la figura 1 se muestra un dibujo realizado por Descartes, para ejemplificar las ideas sobre esta cuestión en su época.



Figura 1. Dibujo realizado por Descartes para explicar como la información sensorial llega al sistema nervioso. Menciona que los nervios son tubos con válvulas, por las que pasan los espíritus y son abiertas por estimulación. Una vez abiertas dejan pasar a los espíritus por los nervios y estos actúan en el cuerpo. De esta manera explica que se retire la mano del fuego cuando está demasiado cerca. (Publicado en René Descartes. L'homme. Paris, 1664), (Tomado de Spatz, 1995).

Una de las maneras que permiten entender cómo la información puede ser almacenada en el cerebro es el estudio de los procesos que ocurren dentro de las células, y los consecuentes cambios plásticos que ocurren. Tal como se postuló por primera vez en 1949, en “*The Organization of Behaviour*” por Hebb, se ha establecido que la memoria se mantiene por aquellos cambios plásticos en células que conforman una red neuronal. Un interés vigente es el de poder visualizar las células que forman parte de dicha red.

Nosotros en esta tesis nos avocamos a estudiar la activación de células después del aprendizaje de aversión al sabor, con el fin de identificar neuronas en las que coincide la información adquirida y que posiblemente conformen una red neuronal en la memoria gustativa en ratones de tipo silvestre y 3x-Tg.

A continuación se explicarán conceptos básicos sobre memoria y aprendizaje para entender los antecedentes al trabajo realizado en esta tesis aquí presentada.

A la capacidad que tienen los organismos para adquirir información del medio que los rodea se le denomina aprendizaje. La información adquirida puede ser utilizada posteriormente y es capaz de durar a lo largo del tiempo. El aprendizaje produce cambios en la conducta de los animales, que les permite adaptarse y sobrevivir a las condiciones del ambiente. Al proceso de almacenar y recuperar la información adquirida a lo largo del tiempo se le denomina memoria (Kandel *et al*; 2000).

La información adquirida durante el aprendizaje es capaz de generar modificaciones en el cerebro, que permiten se almacene la información a lo largo del tiempo (Martínez & Kesner, 1998). Por lo tanto, para entender cómo ocurren los cambios conductuales, es adecuado estudiar las modificaciones que permiten que ocurra la formación de la memoria.

El aprendizaje, como una propiedad dinámica del sistema nervioso, depende de las características plásticas de los circuitos cerebrales. Los circuitos neuronales son capaces de reorganizar funcionalmente las representaciones del mundo en respuesta a cambios en la información entrante relevante (Bermúdez-Rattoni, 2007). Esta reorganización puede provocar cambios plásticos en las conexiones neuronales o en la morfología neuronal, y tienen como resultado cambios funcionales duraderos. Estas modificaciones en las sinapsis provocan los cambios en el comportamiento, y se presumen son el correlato celular de la memoria (Tronson y Taylor, 2007).

II.- ANTECEDENTES

2.1.- Plasticidad en el sistema nervioso y memoria

Se cree que la representación física de la memoria son ensambles de neuronas (Roediger *et al*; 2007). Esta idea fue postulada por Donald Hebb en 1949, quien propuso el concepto de ensamble como estructuras dinámicas en el cerebro. Los ensambles son activados de manera coordinada por algún tipo de estímulo, y se acoplan por medio de actividad reverberante de disparos. Dichos circuitos dan lugar a representaciones mentales, y pueden ser almacenadas gracias a modificaciones que fortalecen las conexiones entre las sinapsis. Asimismo, Hebb sugirió que un ensamble puede interactuar con otros, formando lo que denominó como “secuencias de fase”. De esta manera, cuando dos neuronas se asocian funcionalmente por medio de su actividad sincrónica, una de las dos puede facilitar la actividad de la otra neurona, dando lugar a procesos de asociación. Estos procesos permiten almacenar información de cierto comportamiento adquirido por medio de repeticiones de la actividad sincrónica en un ensamble. Para ello, Hebb formuló el siguiente postulado:

“Cuando el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a una célula B, y repetidamente o persistentemente participa en su disparo, algún proceso de crecimiento o cambio metabólico ocurre en una o ambas células de tal manera que la eficiencia de A, como una de las células que provoca que dispare B, aumenta”

Donald Hebb, 1949.

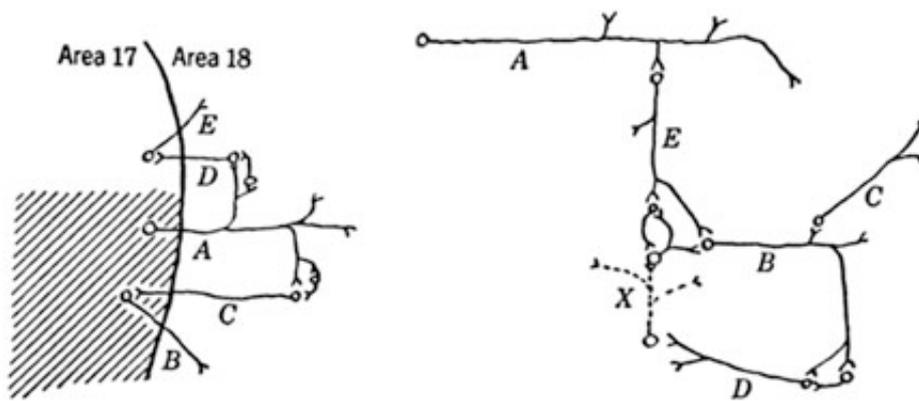


Figura 2.1. Ilustraciones de dos circuitos corticales hipotéticos, según Hebb, para explicar cómo el aprendizaje puede provocar crecimiento de ensambles neuronales. El esquema de la izquierda representa un circuito neuronal donde las neuronas A y B están en el área 17, que está siendo masivamente excitada por una vía aferente, C es una neurona del área 18 que conecta de nuevo al área 17, mientras la neurona E se encuentra en la 18 y no participa en la región de actividad. El esquema de la derecha muestra las células A, B y C siendo activadas por vías convergentes. La activación provoca un patrón específico de actividad en esta área, mientras B, D y X son células que contribuyen a la formación de conexiones que integran su actividad. (Modificado de Hebb, 1949).

Un ejemplo que demuestra experimentalmente el postulado de Hebb, es el fenómeno descrito por primera vez por Bliss y Lomo en 1973, conocido como potenciación a largo plazo (PLP). Reportaron un aumento en la transmisión sináptica de neuronas del hipocampo, después de la estimulación tetánica de una vía aferente. El fenómeno de plasticidad neuronal, PLP, consiste en el incremento sostenido de la eficacia postsináptica después de actividad presináptica repetitiva, que es inducida por medio de estimulación de alta frecuencia. Reportaron que la potenciación es capaz de durar desde horas hasta días y fue observado en la vía perforante. Esta vía conecta las neuronas de la corteza entorrinal con las neuronas del giro dentado del hipocampo (Bliss y Lomo, 1973). La PLP ha sido propuesta como un modelo de plasticidad sináptica, que podría explicar procesos similares a los que ocurren durante la formación de la memoria. Este modelo de plasticidad demuestra que los ensambles pueden representar información a lo largo del tiempo, por medio de patrones de actividad repetitiva. Asimismo, la PLP concuerda con el postulado asociativo de Hebb, que propone que cuando las señales débiles y fuertes de una neurona son estimuladas al mismo tiempo, la débil se fortalece. Posteriormente se describió la modificación sináptica asociativa, en la que por medio de la estimulación de

dos vías se producía PLP. La potenciación inducida no requería de activación sincronizada pero sí de un orden temporal, ya que la PLP de la señal débil podía ser inducida si la señal fuerte se activaba después de 20 milisegundos y no al revés (Levy y Steward, 1983).

Se han descrito ampliamente los mecanismos celulares que permiten la formación de la PLP. La PLP requiere de la activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (N-metil D-aspartato), que se encuentran bloqueados por el ión Mg^{2+} . Cuando se induce la potenciación, la neurona presináptica dispara a una alta frecuencia, y se despolariza la membrana de la postsinapsis. La despolarización permite que se desbloquee el canal del receptor NMDA. La apertura del canal permite la entrada del ión Ca^{2+} a la célula. La entrada del ión Ca^{2+} activa cascadas de señalización que permiten la formación de PLP, entre ellas, la activación de al menos tres cinasas: CAMKII, PKC y Fyn. Posteriormente, estas cinasas pueden fosforilar otros blancos, como por ejemplo, CAMKII que afecta a los receptores glutamatérgicos tipo AMPA (ácido alfa-amino-3hidroxi-5metil-4-isoxazolpropiónico) de dos maneras. La primera forma es fosforilándolos mientras estén en la membrana de la espina, provocando un aumento en la conductancia a sodio. La segunda manera es promoviendo el movimiento de los receptores que se encuentren en reservorios intracelulares hacia la membrana, lo que permite que haya más receptores disponibles para estimular la espina (Siegel *et al.*, 1999). Algunas cinasas pueden modificar otras enzimas como la sintasa de óxido nítrico. El óxido nítrico puede funcionar como mensajero retrógrado y modificar la liberación de neurotransmisor desde la presinapsis. Estos procesos celulares pueden dar lugar a modificaciones plásticas tempranas.

Los cambios plásticos tardíos involucran otras cascadas, como por ejemplo, la provocada por la activación de la proteína PKA que a su vez recluta a la proteína MAPK. Ambas, PKA y MAPK, se translocan al núcleo donde pueden activar factores de transcripción. Entre los factores que pueden activar se encuentra CREB, que se une a la secuencia CRE de genes blanco y promueve su expresión. Dichos genes pueden provocar cambios plásticos en las sinapsis (Kandel, 2000).

2.2.- Cambios plásticos y la formación de la memoria

La memoria es una función cognitiva fundamental. Se ha establecido que la plasticidad neuronal y las modificaciones dependientes de actividad que provocan cambios en el comportamiento, son en conjunto elementos necesarios para que se forme la memoria. Los postulados de Hebb forman, en el actual estudio de la neurociencia, un elemento clave para el estudio del aprendizaje y de la memoria. La idea fundamental sobre las dinámicas y formación de ensambles neuronales de su propuesta se basa en la existencia de “sinapsis hebbianas”. Estas sinapsis funcionan como sustrato de los ensambles. Se ha descrito que sinapsis excitatorias, fortalecidas por actividad coincidente pre y postsináptica, pueden provocar conexiones neuronales co-activadas por los mismos estímulos. Por lo tanto, los ensambles neuronales sirven como representaciones mentales, de tal manera que si se repite un estímulo relacionado al primero, se provoca la activación del ensamble (Lansner, 2009).

Para que se almacene la información en los circuitos neuronales, y la memoria dure en el tiempo, es necesario que ocurran modificaciones en las sinapsis. Los cambios sinápticos son inducidos por patrones de actividad específicos, se necesita de cierto tiempo para que se estabilicen o consoliden, lo que involucra también la expresión de genes (Steward & Worley, 2002).

La duración de la información adquirida depende de la duración de los cambios plásticos que ocurren en las neuronas. Los cambios plásticos persistentes permiten mantener la memoria en el largo plazo y se cree que ocurren en ensambles neuronales específicos. (Ramírez-Amaya, 2007). Para el aprendizaje asociativo, se considera que la convergencia de los estímulos --condicionado e incondicionado-- en células particulares es la que provoca los cambios plásticos. Así, el aprendizaje es la inducción de estos cambios, y la memoria depende de los mismos, como ya se había mencionado. (Fanselow & Poulos, 2005).

En conjunto, a los mecanismos que se llevan a cabo a nivel celular que permiten que el trazo de una memoria se establezca, se les ha denominado como consolidación sináptica. Este proceso necesita de respuestas celulares específicas, entre las cuales se encuentran la activación de segundos mensajeros, transcripción de nuevo ARN y síntesis de proteínas

(Dudai, 2004).

Dentro de las cascadas de señalización que participan en la consolidación de la memoria a largo plazo, se encuentran las que son reguladas por el factor CRE, elemento de respuesta a AMP cíclico. Estas cascadas han sido estudiadas en modelos de plasticidad y modelos de comportamiento en animales. Una de las cascadas más características es la del AMP cíclico, la cual involucra la activación de la cinasa 2 dependiente de AMP cíclico que fosforila y activa diversas formas de la proteína CREB. CREB modula la expresión de genes regulados por la secuencia CRE. Dentro de los genes regulados por CREB se incluyen un gran número de genes de expresión inmediata, entre ellos, factores de transcripción que a su vez regulan la expresión de genes de respuesta tardía (Martin *et al*; 2000, Dudai, 2004).

2.3.- Genes de expresión inmediata (GEI)

Dentro de los estudios realizados para comprender los procesos celulares que provocan las modificaciones plásticas necesarias para el almacenamiento de la memoria, se encuentra el análisis de los genes de expresión inmediata (o temprana). La expresión de este grupo de genes es un paso importante dentro de las cascadas de eventos celulares que permite el mantenimiento de la memoria (Miyashita *et al*; 2008).

Un gen de expresión inmediata se define como aquél que es activado de manera rápida y transitoria a nivel transcripcional después de algún tipo de estimulación sináptica, que puede ser de neurotransmisión o por la señal de un factor de transcripción (Tzingounis & Nicoll, 2006).

Los genes de transcripción temprana codifican para un rango diverso de proteínas, y se pueden dividir en dos grupos: los genes que codifican para factores de transcripción y los genes efectores. Los primeros tienen un papel regulatorio sobre otros genes, mientras que los segundos pueden codificar para proteínas estructurales, proteínas de traducción de señales, factores de crecimiento y enzimas. Los genes efectores tienen un amplio rango de funciones, como son el crecimiento celular, la señalización intracelular, la modificación sináptica, los cambios estructurales, el metabolismo, y la homeostasis sináptica (Miyashita *et al*; 2008).

2.3.1.- El gen de transcripción inmediata *Arc/Arg 3.1*

Particularmente, el gen efector que codifica para la proteína *Arc/Arg3.1* (proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad), ha sido ampliamente estudiado. Fue identificado en la corteza y en el hipocampo. Su inducción ocurre después de la actividad celular y depende de la activación de receptores glutamatérgicos NMDA. Su expresión también puede ser inducida por algunos factores tróficos (Ramírez-Amaya, 2007). La expresión del ARN mensajero de *Arc* está regulada por patrones de estimulación que inducen potenciación a largo plazo (PLP) y por actividad neuronal fisiológica (Guzowski, 2000).

En estudios realizados por Guzowski y colaboradores, se observó que la administración en el hipocampo de oligonucleótidos antisentido del ARN mensajero de *Arc* afecta el mantenimiento de la fase tardía de la PLP y la consolidación de la memoria en la tarea del laberinto acuático de Morris (Guzowski *et al*; 2000). En otro estudio, se observó que en ratones knock-out del gen *Arc*, la memoria de corto plazo no se afecta mientras que la memoria de largo sí en varias tareas de aprendizaje. Evaluaron la memoria en el laberinto acuático de Morris, el condicionamiento al miedo, el condicionamiento de aversión al sabor y la tarea de reconocimiento de objetos (Plath *et al*; 2006). Estos datos, en conjunto, demuestran que el gen efector de transcripción temprana *Arc* tiene un papel importante durante la formación de la memoria y en la plasticidad sináptica.

Gracias al análisis sobre la participación del gen *Arc* en procesos antes mencionados, se desarrolló una técnica de imagenología. Esta metodología permite realizar mapeo de poblaciones neuronales activadas después de dos tipos distintos de estimulaciones. Dicha técnica se denomina catFISH y se describe a continuación.

2.4.- Identificación de poblaciones neuronales por medio de catFISH

Dado que la expresión del gen *Arc* es dependiente de actividad neuronal, y gracias a sus dinámicas de expresión y translocación citoplasmática, su detección puede ser utilizada para identificar células individuales activadas después de un comportamiento particular. Estas propiedades de *Arc* han permitido el desarrollo de una técnica conocida como

análisis de compartimentalización de la actividad temporal por medio de hibridación *in situ* fluorescente (catFISH). Cuando una neurona es activada electrofisiológicamente, expresa el gen *Arc* en el núcleo en un periodo de 2 a 5 minutos después, y se observa el ARN mensajero como dos puntos que corresponden a la transcripción de los dos alelos del gen. Cuando ha transcurrido un tiempo de 20 a 30 minutos, se puede observar el transcrito del gen *Arc* en el citoplasma rodeando al núcleo debido al proceso de translocación, (Guzowski *et al*; 1999) como se muestra en la figura 2.4. La técnica de catFISH brinda una resolución temporal (de al menos 20 minutos), por lo que se ha utilizado para identificar grupos de neuronas que responden a dos eventos que en el tiempo están separados de 20 a 30 minutos, y permite analizar diversas áreas del cerebro que fueron activadas.

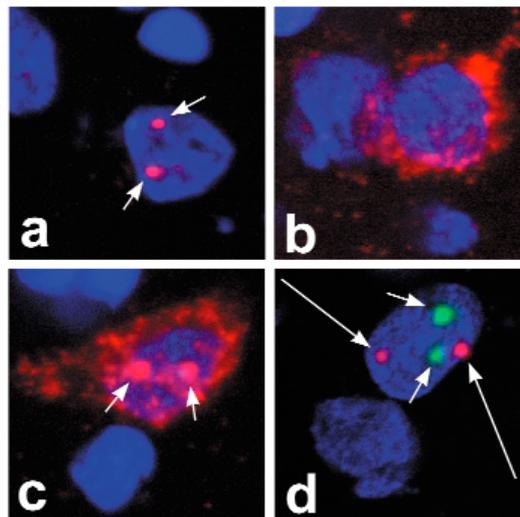


Figura 2.4. Expresión de *Arc* en núcleo y citoplasma. En esta figura se puede observar en color azul los núcleos de las neuronas marcados con DAPI, en rojo el ARN mensajero del gen *Arc* y en verde el ARN mensajero de otro gen de transcripción temprana, *Homer1a*. En a) se muestra una célula activada de manera reciente por un evento que ocurrió 5 minutos antes ya que expresa *Arc* en el núcleo y se observan los dos sitios de transcripción dentro de él. En b) se aprecia una célula que expresa el gen *Arc* en el citoplasma y fue activada por un evento que ocurrió 30 minutos antes. En c) se observa una célula que fue activada por dos eventos, uno que ocurrió 5 minutos antes y otro 30 minutos antes y muestra presencia de *Arc* tanto en núcleo como en citoplasma, y es el mismo caso de la figura d) que expresa tanto *Arc* a los 5 minutos en núcleo como *Homer1a* que se expresa en núcleo a los 30 minutos después de actividad (tomado de Guzowski *et al*; 1999).

La dinámica de expresión del gen *Arc* junto con la resolución celular de la técnica catFISH, permiten distinguir entre células activadas por un comportamiento reciente (las que tienen *Arc* mensajero en el núcleo), las que se activan por algún evento que ocurrió treinta minutos antes (cuando *Arc* mensajero es detectado en el citoplasma), o bien células que fueron activadas por ambos eventos (cuando el mensajero de *Arc* se encuentra en núcleo y citoplasma). Por lo tanto, es muy útil para identificar grupos de células activados por experiencias conductuales distintas (Ramírez-Amaya, 2007).

La técnica de catFISH permite visualizar las células que han sido activadas por dos estímulos distintos, separados por un periodo corto de tiempo. Por lo tanto, es posible observar e identificar en cuáles neuronas está coincidiendo la información de los estímulos después de su presentación. Esta ventaja de visualización tiene gran relevancia para el estudio del aprendizaje asociativo, ya que dichas células son las que podrían sufrir los cambios plásticos consecuentes necesarios para el almacenamiento de la memoria. Brinda una resolución celular, pudiendo identificar la localización nuclear o citoplásmica del ARN mensajero de *Arc*. Por lo tanto la metodología de catFISH, gracias a su resolución celular y temporal, es una potente técnica que permite visualizar poblaciones neuronales después de procesos de aprendizaje asociativo.

2.5.- Aprendizaje asociativo

Durante el aprendizaje de tipo asociativo, la memoria se forma y el comportamiento es modificado como resultado de la asociación que ocurre entre dos o más eventos. La forma más simple de este tipo de aprendizaje es el condicionamiento clásico, donde el apareamiento temporal de un evento (estímulo condicionado o EC), con un segundo evento (estímulo incondicionado o, EI), altera la respuesta al primero (Abrams *et al*; 1991).

El interés por entender los procesos asociativos durante el aprendizaje no es reciente. Y éste sigue siendo un problema a resolver en la neurociencia hoy en día. Se sabe que desde la época de los griegos clásicos se han desarrollado ideas filosóficas y corrientes de pensamiento como el asociacionismo para explicar cómo ocurren estos procesos. Aristóteles, 350 a. de C., postuló que el aprendizaje involucraba la asociación de ideas por medio de los sentidos, y que el hombre tenía la capacidad de recordar a voluntad

gracias a la capacidad de ordenar y asociar ideas, convirtiendo las más simples en otras más complejas (Bermúdez-Rattoni, 2001).

En el siglo XVIII, David Hartley planteó que los estímulos provocan una vibración en los nervios que es transmitida a la parte medular del cerebro donde decae. Si la vibración es constante, la médula cambia para ser propensa a vibrar de cierta forma cada vez que se vuelve a activar. Hartley también planteó que cuando dos ideas se superponen, podrían provocar un cambio en la médula tal que si se presenta una sola, sería suficiente para provocar una vibración como si se hubieran presentado juntas (Finger, 1994, Bermúdez-Rattoni, 2001).

Hacia finales del siglo XIX, Iván Pavlov desarrolló por primera vez un método empírico para estudiar los procesos asociativos. Se enfocó en actos reflejos y examinó la asociación de dos eventos (estímulos) en lugar de ideas. Mientras estudiaba los actos reflejos del sistema digestivo en perros, Pavlov observó que dicho animal salivaba cuando un asistente que lo había alimentado se acercaba a él. La salivación se provocaba por un estímulo neutro, el asistente (estímulo condicionado), pero se asociaba a un estímulo fuerte, la comida del perro (estímulo incondicionado). Pavlov observó que el estímulo condicionado por sí solo provocaba la respuesta de salivación, y la denominó respuesta condicionada (Kandel, 2009).

En el condicionamiento clásico se han establecido dos reglas básicas para que ocurra la asociación entre estímulos. La primera es la contigüidad temporal, que implica que el estímulo condicionado debe preceder al estímulo incondicionado por un intervalo determinado de tiempo. La segunda es la contingencia, la cual dicta que el estímulo condicionado predice que ocurrirá el incondicionado. Lo anterior parece indicar que existe una adaptación que permite a los animales predecir relaciones entre eventos o estímulos ambientales. Tal es el caso de la ingesta de alimentos nocivos que ponen en riesgo la vida del animal, por lo que es probable que los cerebros hayan evolucionado mecanismos neuronales diseñados para reconocer eventos que suelen ocurrir juntos (Kandel, 2009).

Finalmente, en estudios sobre el aprendizaje se ha aceptado que los cambios asociativos son propiedades de los circuitos neuronales. Como se mencionó anteriormente, Hebb fue

el primero en proponerlo, sugiriendo que el mecanismo asociativo ocurre en células individuales, y que las sinapsis son fortalecidas por asociaciones aprendidas. Por lo anterior, interesa realizar estudios que permitan visualizar en qué neuronas se llevan a cabo los procesos asociativos durante el aprendizaje.

III.- MEMORIA GUSTATIVA

En la naturaleza existen múltiples formas o mecanismos que desarrollan los animales para adecuarse al mundo en el que viven y sobrevivir. Una de las estrategias que han desarrollado es el poder recordar y discriminar la comida de acuerdo a las consecuencias posteriores a su consumo. Este aprendizaje ha sido necesario, ya que la alimentación es una actividad de vital importancia. A este tipo de memoria se le conoce como memoria de reconocimiento del sabor, y consiste en la capacidad de reconocer comida o algún líquido que ya había sido previamente probado (Bermúdez-Rattoni, 2004). Cuando un animal se encuentra un nuevo sabor se rehúsa a consumirlo en grandes cantidades ya que no conoce sus consecuencias, teniendo un comportamiento neofóbico. Sin embargo, si dicho sabor no tuvo consecuencias nocivas se registra como un sabor seguro, y hay un incremento en su consumo, a esta conducta se le llama atenuación de la neofobia. Por el contrario, cuando el sabor tiene alguna consecuencia de malestar gástrico, el sabor se registra como tóxico, y en consecuencia el animal se rehúsa a seguirlo consumiendo, presentando una aversión a dicho sabor. A esta conducta se le llama condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) (Bermúdez-Rattoni, 2004). En la figura 3 se muestran estos dos tipos de conductas.

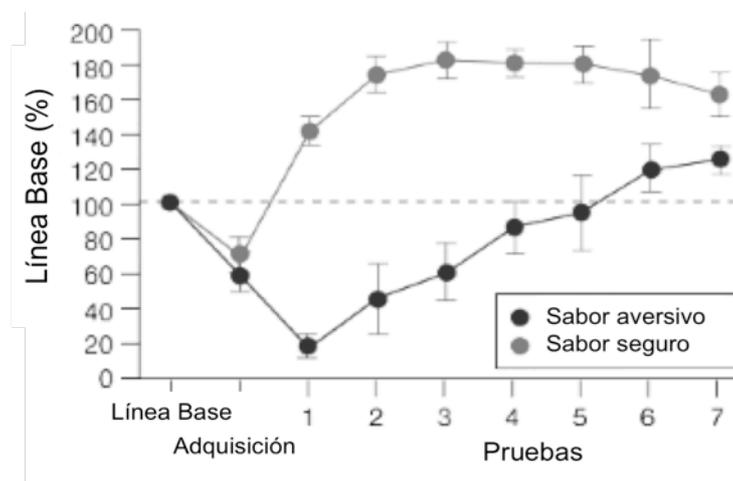


Figura 3. Se muestran los dos tipos de conducta que se observan como consecuencia de haber ingerido un sabor nuevo. Si el sabor consumido se codifica como seguro, los días posteriores se incrementará el consumo (atenuación de la neofobia o sabor seguro). Si se asocia el sabor novedoso con un malestar gástrico, el consumo en el día posterior del sabor disminuirá (aversión a los sabores o sabor aversivo). Si ya no se vuelven a presentar consecuencias gástricas nocivas se irá aumentando en los días siguientes el consumo del sabor, fenómeno llamado extinción (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

3.1.- Condicionamiento de aversión al sabor

Una gran variedad de mamíferos presentan aversión a comidas o líquidos específicos si éstos produjeron algún tipo de malestar gástrico, tanto en la naturaleza como en condiciones de laboratorio. El condicionamiento de aversión al sabor (CAS) fue descrito por primera vez por John García en 1955 (Welzl, 2001). El aprendizaje de aversión al sabor protege a los animales de una repetición de la ingesta de comida o bebidas tóxicas (Reilly *et al*; 2005).

En condiciones de laboratorio, el CAS es un paradigma ampliamente utilizado en la investigación de procesos de memoria. Durante la adquisición del CAS, el animal asocia un sabor o estímulo condicionado (EC) con un tratamiento que produce malestar (Ej., inyección intraperitoneal de LiCl) o estímulo incondicionado (EI). El CAS sigue las reglas del condicionamiento clásico donde se asocian los dos estímulos antes mencionados, la asociación tiene como consecuencia la evasión del sabor, llamada respuesta condicionada (RC), como se muestra en la figura 3.1. En este tipo de condicionamiento el sabor se convierte en desagradable para el animal y es evitado (Bernstein y Koh, 2007).

El CAS tiene un gran número de ventajas por las cuales es un modelo muy útil en la investigación de la neurobiología, y que a su vez lo hace diferente de otros tipos de paradigmas conductuales. Algunas de estas ventajas son (Bernstein y Koh, 2007):

- 1.- Rápida adquisición, el CAS se adquiere en un solo apareamiento del EC (sabor) con el EI (inductor de malestar gástrico).
- 2.- El aprendizaje es potente y durable por lo que proporciona una ventana clara de tiempo en la cual se pueden identificar señales neuronales.
- 3.- Se puede adquirir aunque exista una separación amplia entre la presentación del los dos estímulos (EC y EI), ésta puede ser desde minutos hasta horas.

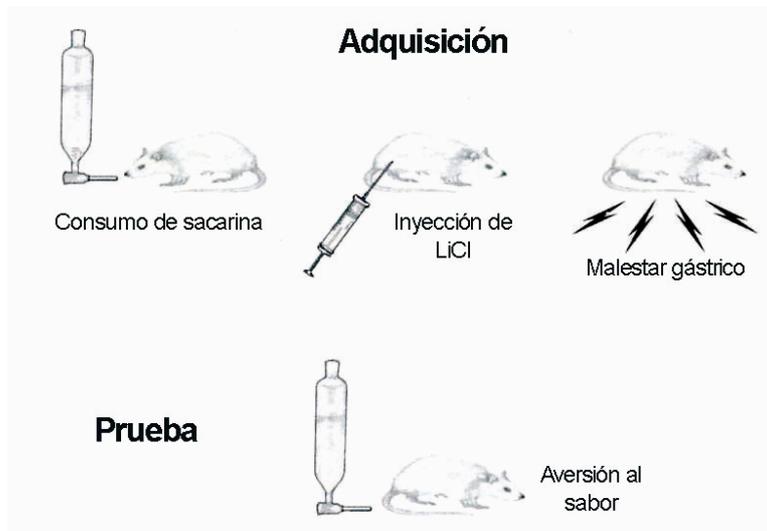


Figura 3.1. Esquema representativo del paradigma conductual del CAS. En este protocolo le es presentado al animal un sabor novedoso, sacarina (EC). Posterior al consumo del sabor se le inyecta vía intraperitoneal un inductor de malestar gástrico (EI), cloruro de litio (LiCl). Cuando el sabor es presentado nuevamente al animal, éste evita beber dicho sabor debido a las consecuencias negativas experimentadas. A este comportamiento se le conoce como aversión al sabor (Modificado de Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

3.2.- Vías de procesamiento de la información gustativa

Las vías de procesamiento de la información gustativa de sabor y visceral del malestar gástrico han sido ampliamente descritas y estudiadas, por lo que están bien caracterizadas, y se muestran en la Fig. 3.3. Dicho procesamiento inicia con la transducción de la señal del sabor que se realiza en células especializadas localizadas en la cavidad oral, dichas células están inervadas por neuronas sensoriales y cuando son excitadas envían la señal a través de varios nervios craneales, entre ellos el facial (VII), el glossofaríngeo (IX) y el vago (X) (Kandel *et al*; 2000). La información se recibe en la porción anterior del núcleo del tracto solitario, luego viaja al núcleo parabraquial del tálamo, a partir de aquí existen dos vías posibles, una que va tanto al hipotálamo lateral, la sustancia innominata, y la amígdala, mientras la otra viaja al núcleo ventroposterior del tálamo, de donde luego viaja a la neocorteza (Bermúdez-Rattoni *et al*; 2004). Las vías viscerales que transmiten la información de malestar, detectado por la irritación del sistema gastrointestinal, llegan al nervio vago (X), al núcleo del tracto solitario y al

subnúcleo lateral del núcleo parabraquial, luego finalmente llega al núcleo central de la amígdala y al núcleo paraventricular hipotalámico (Bures *et al.*; 1998). Son de particular interés la corteza insular y la amígdala, estructuras para las cuales existe un gran número de estudios que han demostrado su importancia en la adquisición y almacenamiento a largo plazo de la memoria de aversión al sabor (Bermúdez-Rattoni *et al.*; 2004).

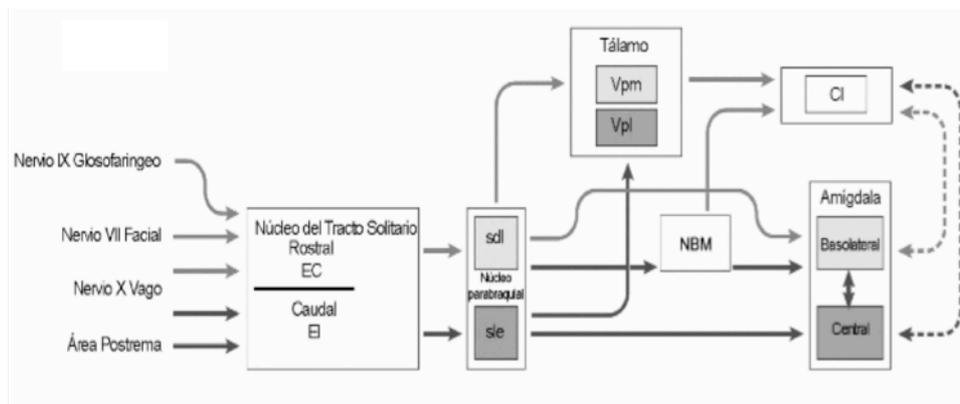


Figura 3.2. Dibujo esquemático de las vías de procesamiento de la información gustativa (líneas continuas) y visceral (líneas punteadas) en el sistema nervioso. EC, estímulo condicionado. EI, estímulo incondicionado. sdl, subnúcleo dorsolateral. sle, subnúcleo exteriorlateral. NBM, núcleo basal magnocefal. Vpm, ventroposteromedial. Vpl, ventroposterolateral. CI, corteza insular (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

El estudio en este trabajo se enfocó en la detección de la expresión del gen *Arc* en células de la corteza insular y de la amígdala basolateral, por lo que a continuación se describen los antecedentes de cada estructura.

3.3.- La corteza insular en el CAS

La corteza insular (CI) es una región que está relacionada con el procesamiento y almacenamiento de la información gustativa. En ratas se encuentra en la superficie lateral del hemisferio cerebral, en la región dorsal del surco rinal rostral a la corteza perirrinal, por donde cruza la arteria cerebral media. Histológicamente se divide en tres regiones, agranular, disgranular y granular debido a la presencia de neuronas granulares. La región disgranular está relacionada con el sistema gustativo (Yamamoto *et al.*, 2006). Es una estructura importante tanto para la detección del sabor y de los efectos viscerales

posteriores. La corteza gustativa (CG) presenta conexiones recíprocas con la amígdala y con el núcleo parabraquial. Además de encargarse del procesamiento de información gustativa en la rata, se ha relacionado con la consolidación del condicionamiento de aversión al sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004).

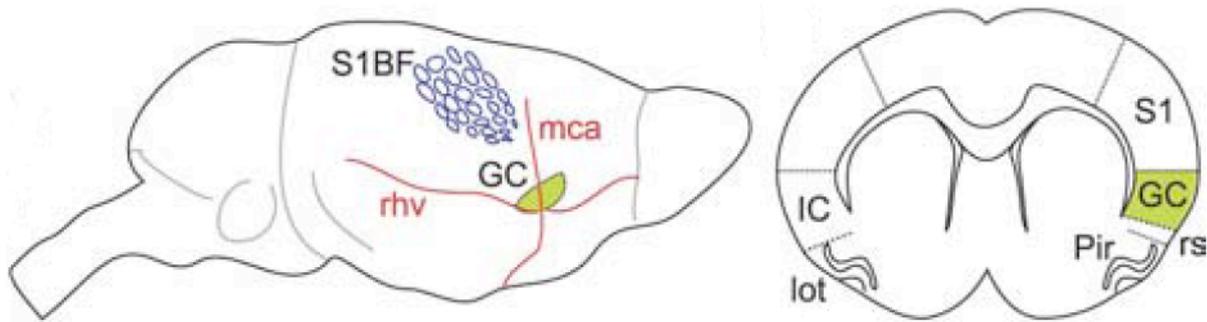


Figura 3.3. Ubicación de la corteza gustativa en el cerebro de rata. En la ilustración de la derecha se muestra un corte coronal del cerebro de la rata que muestra la ubicación de la corteza insular (Acolla *et al*; 2007).

Se ha estudiado de manera más específica la participación de esta estructura en el procesamiento de la información durante la adquisición del CAS. Se sabe que es necesaria para la formación de la memoria. Las lesiones en la corteza insular provocan que los animales no aprendan el condicionamiento de aversión al sabor. En un trabajo, mediante la inactivación funcional de la CI, por medio de tetrodotoxina, antes de la presentación del sabor, se observó que se impide la formación de la memoria de aversión al sabor (Gallo *et al*, 1992). Asimismo, se ha observado que si se aplica un inhibidor de la síntesis de proteínas en la CI se previene la formación del CAS (Rosenblum *et al*; 1993).

También se ha estudiado el papel funcional que tiene el sistema de neurotransmisión colinérgico en esta estructura durante la formación del CAS. Se observó que la aplicación de inhibidores muscarínicos antes de la presentación del sabor afectan la formación de la memoria de aversión en el largo plazo, no así cuando se aplican después de la adquisición del condicionamiento (Miranda *et al*; 2003).

3.4.- La amígdala basolateral en el CAS

Existe evidencia de que la amígdala está involucrada en los procesos de atención y recompensa. Es una estructura en donde se llevan a cabo cambios neuronales que

subyacen la asociación de tareas adquiridas con respuestas de tipo emocional. Asimismo, existe un fuerte consenso de que está involucrada en mediar el componente emocional de las memorias (McGaugh *et al*; 2002).

La amígdala es un conjunto pequeño de neuronas que forman parte del sistema límbico localizado en el lóbulo temporal. En los mamíferos la amígdala se puede dividir en dos grupos de núcleos: un grupo filogenéticamente más antiguo compuesto por un núcleo medial, uno central y cortical, mientras el otro, filogenéticamente más nuevo, está compuesto por un núcleo lateral y uno basal (amígdala basolateral, ABL) (Bures *et al*; 1998).

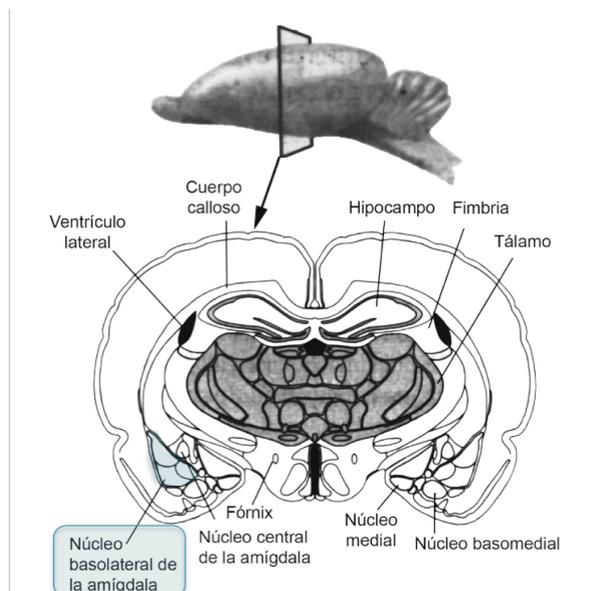


Figura. 3.4. Corte coronal del cerebro de la ratona donde se muestra los distintos núcleos de la amígdala (Modificado de Swanson L. W., 1992).

Se sabe que el sistema límbico, en particular la amígdala está involucrada en procesos asociativos de diferentes tareas de aprendizaje, incluyendo las asociaciones viscerales en el condicionamiento de aversión al sabor. La amígdala ha sido asociada con aspectos emocionales que regulan la ingesta de comida y agua.

Ha sido reportado que lesiones en la amígdala basolateral evitan que se forme la memoria del CAS sólo si el EC que se presenta es novedoso, pero no cuando ya es familiar (Morris *et al*; 1999) y que su inactivación funcional con tetrodotoxina impide la adquisición del CAS (Roldan & Bures, 1994). En el primer trabajo mencionado se realizaron lesiones con

ácido iboténico de al menos el 90% del núcleo basolateral de la amígdala en ratas. Posteriormente se realizó el CAS y 4 días después se evaluó la memoria. Lo que observaron fue que los animales con lesiones en la ABL son incapaces de aprender el CAS y cuando se realizaron las lesiones en ratas que habían sido pre-expuestas días antes al EC (sacarosa) no se afectó el CAS.

Así también, se reportó que el bloqueo funcional de la ABL entre el estímulo gustativo y el visceral impide la formación de la memoria de aversión (Miranda *et al*; 2003). En ese trabajo se estudió el papel del sistema noradrenérgico en la amígdala basolateral durante la presentación del estímulo incondicionado (EI) y durante la consolidación de la tarea. Se realizaron inyecciones bilaterales de propanolol, antagonista de receptores noradrenérgicos, en la ABL de la rata. Se les dio como estímulo condicionado sacarina y 30 minutos después se les realizó la microinyección del fármaco, inmediatamente después se aplicó el cloruro de litio vía intraperitoneal como estímulo incondicionado. La prueba de memoria se llevó a cabo tres días después y se observó que el consumo de sacarina aumentó en los animales experimentales en comparación con el grupo control. Sin embargo, no se observó diferencia alguna en los consumos del día de la inyección. Este efecto indica la participación de la ABL por medio de los receptores noradrenérgicos. Dado que éste efecto se obtiene cuando la inyección se da entre los dos estímulos se sugiere que la ABL está involucrada en el procesamiento de la información visceral de esta tarea de aversión.

Esto indica, en resumen, que la participación de la corteza insular y de la amígdala basolateral en el aprendizaje del CAS, es necesaria para la formación de aversión al sabor.

3.5.- Activación de poblaciones neuronales en la adquisición del CAS

Utilizando la técnica de catFISH se han realizado estudios para visualizar activación de neuronas después de tareas de aprendizaje, como es el caso del CAS. En el trabajo realizado por Barot y colaboradores del 2008, se utilizó el paradigma conductual del CAS, con el fin de evaluar la convergencia de estímulos en la amígdala basolateral y en la región agranular de la corteza insular de rata. Se realizó por medio catFISH, que permite determinar qué células responden al estímulo condicionado, qué células responden al

estímulo incondicionado y qué células responden a los dos estímulos.

Como se muestra en la figura 3.5; los resultados que obtuvieron revelaron que existen células de la amígdala basolateral que responden sólo a un estímulo y otras que responden a ambos, Por lo tanto, concluyen que la información de los EC y EI durante la adquisición del CAS, coincide en una subpoblación de neuronas de la ABL. Sin embargo, no encontraron diferencias con respecto al grupo control en la cantidad de células activadas por un estímulo o ambos en la corteza insular. Asimismo, encontraron que cuando se realiza un condicionamiento reverso, en donde se presenta primero el EI y luego el EC, los animales no muestran aversión al sabor en la prueba de memoria, y que no hay un aumento en el número de neuronas activadas. La falta de activación después del condicionamiento reverso indica que la coincidencia en células de la ABL es una consecuencia específica de la asociación de los estímulos, y no sólo por la presentación de los mismos (Barot *et al*; 2008).

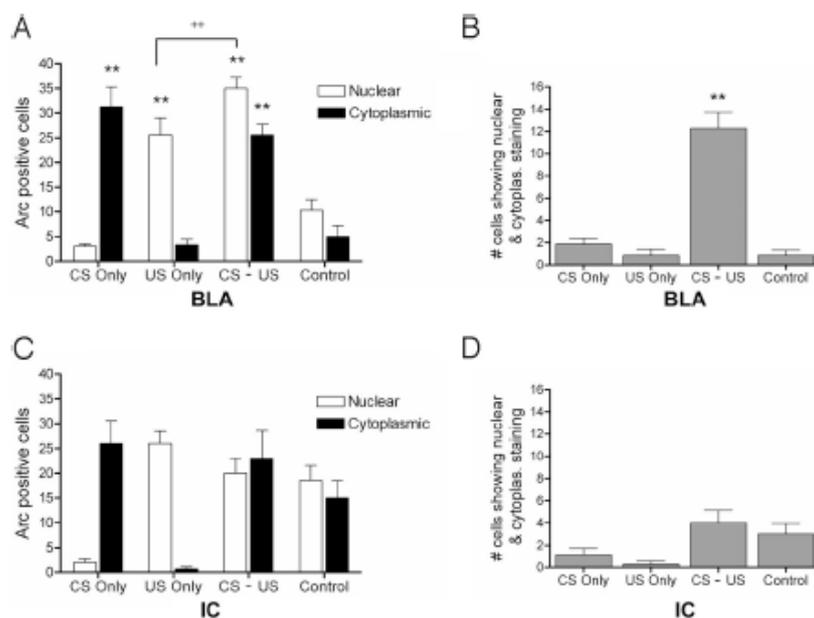


Figura 3.5. Expresión de Arc en células de la ABL y de la CI de rata. La gráficas A y C muestran el número de células en la ABL y CI respectivamente que muestran actividad de Arc en el núcleo (barras blancas) o en el citoplasma (barras negras) después de la presentación de los estímulos (EC, EI, EC-EI, control). Las gráficas B y D muestran el número de células en la ABL y CI respectivamente que muestran actividad tanto en núcleo como en citoplasma después de la presentación de los estímulos (EC, EI, EC-EI, control) (Barot *et al*; 2008).

Los resultados anteriores demuestran que hay un grupo de neuronas de la amígdala basolateral de rata que se activa por la presentación de los EC, EI o ambos después de la adquisición del condicionamiento de aversión al sabor. Los datos de Barot y colaboradores del 2008, sugieren que en las células activadas de la ABL después del CAS, está convergiendo la información de estímulos y probablemente esas células sean sitios de modificaciones sinápticas.

IV.- ANTECEDENTES DIRECTOS EN RELACIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

4.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita en 1907 por Alois Alzheimer. Él observó tres características que son reconocidas actualmente como signos distintivos de la enfermedad: placas seniles, principalmente en el hipocampo, marañas neurofibrilares y pérdida neuronal (Squire & Kandel, 2009).

Las placas seniles están compuestas por depósitos de una proteína llamada beta-amiloide, y se encuentran rodeadas por tres elementos celulares: neuronas pre y postsinápticas, astrocitos y microglia. El componente principal de las placas es el péptido de beta-amiloide, que se forma a partir del corte de una proteína transmembranal llamada APP (*amyloid precursor protein*). Las marañas neurofibrilares son estructuras filamentosas compuestas por la proteína tau, y se alojan en los cuerpos celulares y dendritas. Estas formaciones se componen de la forma hiperfosforilada de tau, proteína asociada al citoesqueleto (Oddo *et al*; 2006).

Se han identificado tres mutaciones en genes específicos que predisponen al padecimiento de la EA, en personas con antecedentes familiares y en personas con desarrollo temprano de la enfermedad. Uno de los genes es el que codifica para la proteína APP, que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 21, también el gen que codifica para la proteína presenilina 1 en el cromosoma 14, y el que codifica para la proteína presenilina 2 ubicado en el cromosoma 1. Estas tres mutaciones son del tipo autosómico dominante (Squire & Kandel, 2009).

La patología se desarrolla en estructuras cerebrales particulares que están implicadas en procesos mnemónicos y de aprendizaje. La patología más severa en la EA está localizada en el lóbulo temporal medial, y los primeros cambios patológicos aparecen en la región entorrinal, progresan hacia la formación hipocampal y después hacia áreas neocorticales (Braak & Braak, 1991).

4.2.- Ratón triple transgénico 3x-Tg modelo de enfermedad de Alzheimer

El grupo de Oddo y colaboradores desarrolló un ratón transgénico con el fin de estudiar la interacción entre tau y beta amiloide en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Dicho ratón se obtuvo a partir de un ratón knock-in para la mutación del gen presenilina 1 (PS1_{M146V}). Se obtuvieron embriones del ratón PS1_{M146V} y se les inyectaron los genes con las mutaciones APP_{Swe}, tau P_{301L}, como se ilustra en la siguiente figura 3.3. Ambos genes se introdujeron en un cassette bajo el control del elemento regulador Thy 1.2, que se ha visto regula la expresión de transgenes, específicamente en el sistema nervioso central. Este modelo transgénico presenta la ventaja de desarrollar tanto la patología de acumulación de placas, formadas por el péptido de beta amiloide, y también la caracterizada por la acumulación de marañas neurofibrilares de tau (Oddo *et al*; 2003).

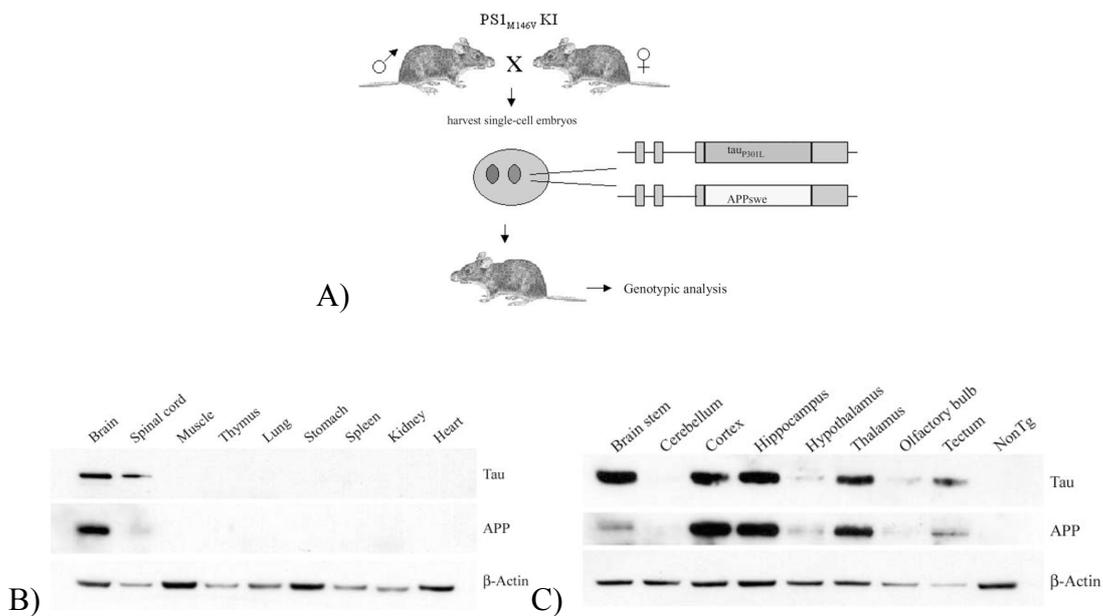
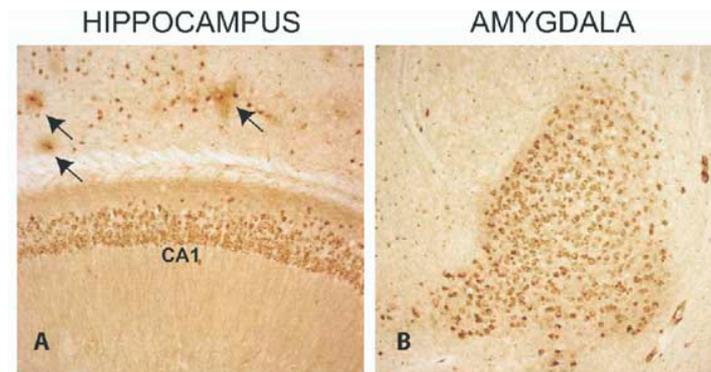


Figura 4.2.1. En A se muestra la ilustración que ejemplifica la estrategia para desarrollar al ratón triple transgénico. En B se muestra una fotografía de un western blot, donde se observa la expresión de las proteínas Tau y APP específicamente en el sistema nervioso central. En C se muestra la expresión de Tau y APP en estructuras del cerebro de ratón implicadas en procesos de aprendizaje y memoria (Oddo *et al*; 2003).

En un estudio realizado por Billings y colaboradores, se evaluó el desempeño de ratones 3xTg-AD en tareas de aprendizaje. Evaluaron la memoria en el laberinto acuático de Morris y en la tarea de prevención pasiva. Es significativo que los autores observaron

déficits cognitivos desde los 4 meses de edad para ambas tareas, concomitante con la observación de la acumulación del péptido beta amiloide intracelular y extracelular en hipocampo y amígdala, estructuras implicadas en el aprendizaje y almacenamiento de la memoria de las tareas evaluadas. La acumulación de la beta amiloide (Figura 4.2.2) correlaciona temporalmente con la edad a la que observaron los déficits de aprendizaje (Billings *et al*; 2005).



*Figura 4.2.2. Acumulación de beta-amiloide en hipocampo y amígdala de tejido de ratón 3x-Tg. En A y B se muestran fotografías de una inmunohistoquímica contra el péptido de beta-amiloide en la región CA1 del hipocampo y en la amígdala respectivamente de tejido obtenido de un ratón de 6 meses de edad. Se observa la acumulación del péptido intracelular en las zonas de mayor densidad óptica y las flechas indican algunas acumulaciones extracelulares del péptido (Billings *et al*; 2005).*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los desordenes neurodegenerativos más comunes asociados al envejecimiento. Y se caracteriza por las fallas progresivas en el aprendizaje y en la memoria. Los estudios para entender los mecanismos que provocan los problemas cognitivos de esta enfermedad en animales de laboratorio se han enfocado tradicionalmente a tareas de tipo espacial (Billings *et al*; 2005). Por ejemplo, se ha utilizado el laberinto acuático de Morris, para evaluar el aprendizaje y la memoria en modelos murinos con EA. Sin embargo, hay trabajos que han estudiado el aprendizaje y la memoria en otros tipos de paradigmas conductuales, como es el caso del CAS para obtener información sobre memoria implícita en EA (Pistell *et al*; 2009, Devi & Ohno, 2010).

4.3.- CAS en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer

Con el fin de evaluar un tipo de memoria implícita en un modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer, Pistell y colaboradores, realizaron un estudio en un modelo doble transgénico (PS1 + APP). Evaluaron la tarea del CAS a una edad de 10 meses, cuando ya se observa acumulación de placas de beta-amiloide. Presentaron sacarina, como EC, a los animales y una hora después inyectaron vía intraperitoneal cloruro de litio, como EI. Realizaron la prueba de memoria 48 horas después del condicionamiento. Observaron que los animales PS1 + APP, en comparación con los animales de tipo silvestre, no son capaces de adquirir la tarea del CAS, e incluso desde los 6 meses se observan estas deficiencias en el aprendizaje de aversión al sabor. Los resultados de Pistell y cols. se muestran en la figura 3.4.1.

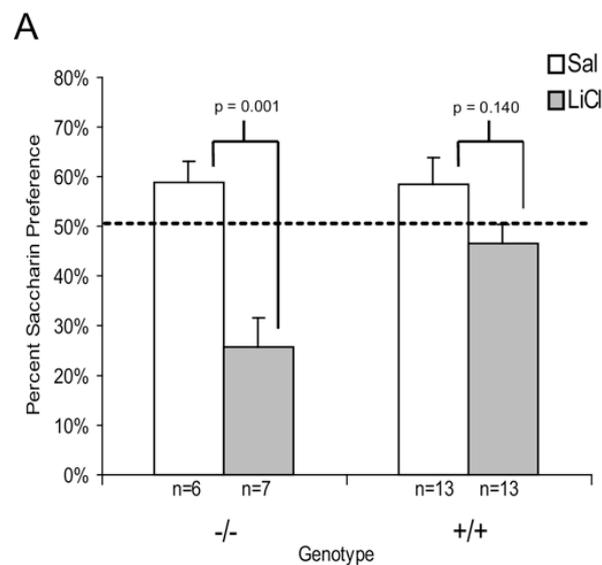


Figura 4.3. Prueba de memoria en ratones transgénicos (PS1 + APP) y ratones de tipo silvestre después del CAS. En esta gráfica se muestra el porcentaje de preferencia de sacarina el día de la prueba de memoria. De lado izquierdo se muestra la preferencia de sacarina de los ratones de tipo silvestre. Las barras de la derecha corresponden a la preferencia de los animales transgénicos PS1+APP. Las barras blancas representan los grupos de animales control a los que se les inyectó cloruro de sodio como EI y las barras de color gris representan el grupo del condicionamiento, al que se le presentó cloruro de litio como EI. A todos los animales se les presentó sacarina como EC (Pistell et al; 2008).

Asimismo, otro trabajo de Moreno y colaboradores, evaluaron la formación de la memoria de aversión al sabor en un grupo de animales 3x-Tg AD. Se observó, en la prueba de memoria, que los ratones de edad de 9 meses no muestran aversión al sabor en comparación con el grupo de ratones de tipo silvestre. Mientras que los ratones 3x-Tg de 2 meses de edad sí presentan aversión al sabor en la prueba de memoria, y desde los cinco meses de edad se observa un menor índice de aversión en los ratones 3x-Tg. Sus resultados sugieren que a la edad de 9 meses los animales transgénicos (3xTg-AD) ya presentan déficits en la formación de la memoria de aversión al sabor (Moreno *et al*; 2010).

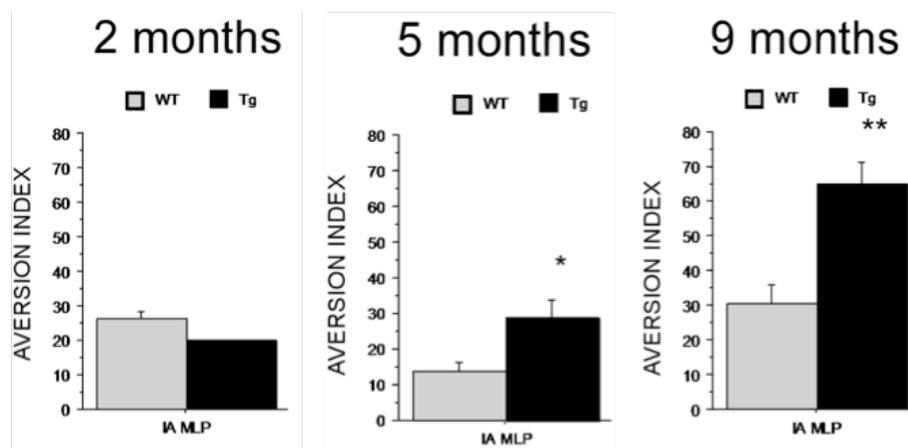


Figura 4.4. Prueba de memoria después del CAS en ratones 3x-Tg AD y ratones de tipo silvestre. En la figura se muestra el índice de aversión 24 horas después de un condicionamiento de aversión al sabor en ratones de tipo silvestre y 3x-Tg AD, ambos en grupos 2, 5 y de 9 meses de edad. Se observa que los ratones con enfermedad de Alzheimer desde la edad de 5 y 9 meses no presentan aversión al sabor en comparación con el grupo de animales de tipo silvestre (Moreno *et al*; 2010).

Como conclusión de los trabajos antes descritos, donde se evalúa la memoria de aversión al sabor, se puede decir que los animales transgénicos que desarrollan la patología de la EA presentan déficits para adquirir el condicionamiento de aversión al sabor.

En resumen, hay antecedentes que indican que ratones modelo para la enfermedad de Alzheimer son incapaces de aprender el condicionamiento de aversión al sabor. Tanto en el modelo de ratón triple transgénico 3xTg-AD (PS1M146V, APP Swe, tau P301L), como en otros modelos transgénicos para la enfermedad se han reportado estas fallas en

el aprendizaje del CAS (Pistell *et al*; 2008, Janus *et al*; 2004 y Hanna *et al*; 2009). Asimismo, se han reportado estudios donde se ve una desregulación global de la expresión del gen *Arc* en modelos con EA (Dickey *et al*; 2003) y se sabe que *Arc* es necesario para la consolidación de la tarea del CAS (Plath *et al*; 2006). Por todo lo anterior, resulta interesante y relevante llevar a cabo estudios más específicos con resolución celular y temporal, por medio de catFISH, de la expresión de *Arc* durante el aprendizaje de aversión al sabor, CAS, en ratones 3x-Tg.

V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1.- Planteamiento del problema

1.- Dados los antecedentes anteriores, es de gran interés visualizar por medio de catFISH los grupos de neuronas que se activan durante el aprendizaje de aversión al sabor, en las regiones de la corteza insular y la amígdala basolateral de ratón de tipo silvestre, ya que ambas son estructuras necesarias para que se forme la memoria de aversión al sabor.

2.- Debido a que se ha reportado que animales transgénicos modelo para la enfermedad de Alzheimer no son capaces de adquirir el condicionamiento de aversión al sabor, es necesario estudiar por medio de catFISH la activación de neuronas en la corteza insular y de amígdala basolateral después de la adquisición del CAS, y evaluar si hay diferencias con el grupo silvestre.

5.2.- Hipótesis

En la corteza insular y en la amígdala basolateral se visualizará un mayor número de células activadas que responden a los estímulos condicionado, incondicionado y a ambos después de la adquisición del CAS en ratones de tipo silvestre, no así en animales 3x-Tg AD.

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la hipótesis anterior por medio de los siguientes objetivos específicos.

5.3.- Objetivos:

1) Identificar los grupos de neuronas en la corteza insular y amígdala basolateral que responden a los estímulos condicionado, incondicionado, y a ambos, después de la adquisición del condicionamiento de aversión al sabor en ratones de tipo silvestre.

2) Identificar los grupos de neuronas en la corteza insular y amígdala basolateral que responden a los estímulos condicionado, incondicionado, y a ambos, después de la adquisición del condicionamiento de aversión al sabor en ratones 3x-Tg AD.

VI.- METODOLOGÍA

6.1.- Sujetos

Se utilizaron ratones macho C57BL/6, y ratones triple transgénicos modelo para la enfermedad de Alzheimer (3x-Tg) con las mutaciones PS1M146V, APP Swe y tau P301L, de 9 a 11 meses de edad. Cada animal se colocó de manera individual con acceso ilimitado a comida, el agua se restringió en tiempos determinados durante la fase experimental, que se llevó a cabo durante la fase de luz.

6.2.- Procedimiento conductual

Condicionamiento de Aversión al Sabor

Se utilizó un protocolo de condicionamiento de aversión al sabor en ratones de tipo silvestre (n=4) y ratones 3xTg-AD (n=4). Los animales se privaron de agua por 24 h., para después ser sometidos a un régimen durante los siguientes 5 días, en el que se les presentaron 10 ml de agua durante 5 minutos cada 24 horas por medio de un tubo Corning® de 15 ml y un tapón metálico que funcionó como bebedero, al final se registró el consumo de agua de cada animal para calcular la tasa de consumo base. Se utilizó como estímulo condicionado sacarina en una concentración del 0.3%. Como estímulo incondicionado, se utilizó cloruro de litio en una concentración 0.4 M.

El día 6 se presentaron 10 ml. de sacarina como EC por 5 minutos. Se registró el consumo individual de cada animal, 30 minutos después se inyectó vía intraperitoneal un inductor de malestar gástrico (LiCl; 7.5 mL/kg) como EI, 5 minutos después de la inyección se sacrificó a cada animal.

Para evaluar la respuesta en el número de neuronas que responden a los estímulos del CAS presentados por separado, sacarina o litio, se realizó otro grupo conductual. Los animales de tipo silvestre (n=4) y 3xTg-AD (4) fueron expuestos únicamente a uno de los dos estímulos (EC o EI). Dicho grupo de animales se privó por 24 h de agua, y durante los siguientes días se les presentó de la misma manera 10 ml. de agua durante 5 minutos y se registró su consumo. El sexto día a un grupo de animales se les presentó sacarina durante 5 minutos, se registró el consumo y se sacrificaron 25 minutos después. Al otro

grupo de animales se les inyectó cloruro de litio vía intraperitoneal y se sacrificaron 5 minutos después.

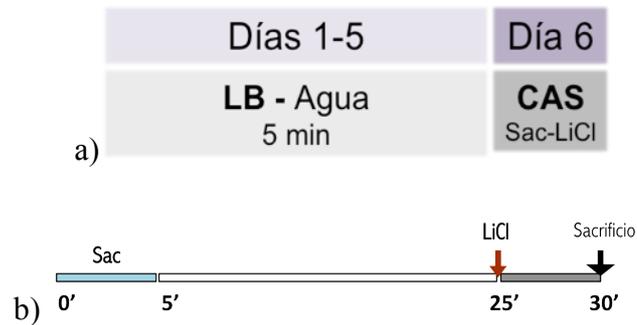


Figura 6.2.1. Esquema del protocolo conductual del CAS. En a) se muestra el protocolo conductual que se utilizó para el condicionamiento. Los días 1 a 5 se dió agua por 5 minutos y se registró el consumo, el sexto día se presentaron los EC y EI. En b) se muestra como fueron presentados los estímulos durante el día del condicionamiento, por 5 minutos se presentó la sacarina 0.3%, 25 minutos después se inyectó el LiCl intraperitoneal y se sacrificó a los animales 5 minutos después.

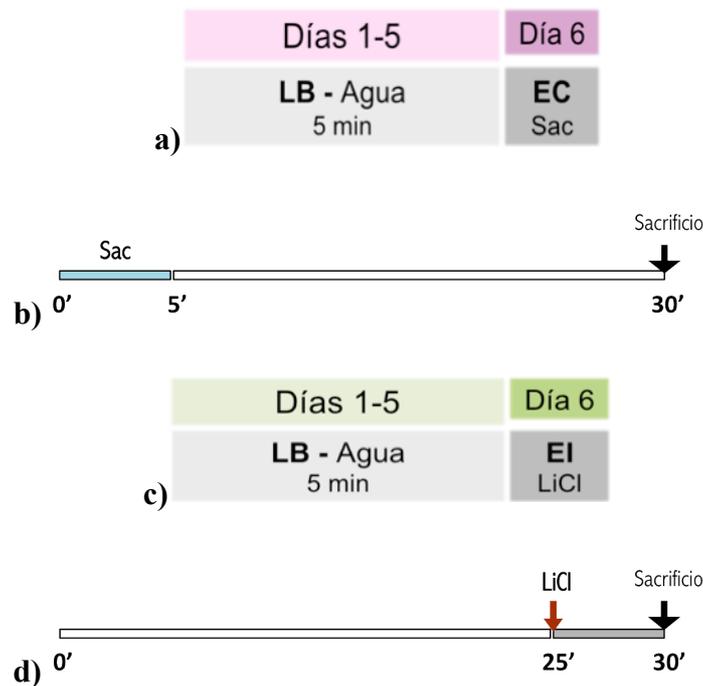


Figura 6.2.2. En a) se muestra el protocolo conductual que se utilizó para el grupo del EC, los días 1 a 5 se presentó agua por 5 minutos y se registró el consumo, el sexto día, se muestra en b) y se presentó únicamente la sacarina por 5 minutos. Se sacrificaron los animales 25 minutos después. En el esquema c) se muestra el protocolo para el grupo del estímulo incondicionado y se le dio línea base de agua igual que el grupo anterior. El sexto día se inyectó el LiCl y 5 minutos después se sacrificó a los animales.

Como control se utilizaron animales intactos de las mismas edades para ambos grupos, 3x-Tg y silvestres, y se sacrificaron el mismo día que los grupos que tuvieron presentación de estímulos. Se utilizó una n de 3 por cada grupo de ratones.

6.3.- Sacrificio y procesamiento del tejido

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Después del sacrificio se extrajeron los cerebros rápidamente y se colocaron en un molde de plástico que se sumergió en una solución a una temperatura de -30° C de isopentano en un baño con etanol y hielo seco. Los cerebros fueron almacenados en un congelador a -70° C. Posteriormente se seccionaron los cerebros en una matriz de sección de la siguiente manera: se colocó una primer navaja en el límite de la corteza cerebral y el cerebelo, se colocó una segunda navaja 2 mm anterior a la primer navaja y por último, una tercera 5 mm anterior en relación a la segunda. Se colocaron los cerebros de todos los grupos en un molde de plástico y se les cubrió con compuesto OCT Tissue-Tek® para ser cortados después en un crióstato Leica® CM 1850. Se realizaron cortes de todos los cerebros en el crióstato a una temperatura de -18° C, tuvieron un grosor de 20 micras y fueron recolectados en laminillas (Superfrost VWR®). Los tejidos obtenidos se dejaron secar y posteriormente fueron almacenados herméticamente a -70° C, hasta que fueron procesadas para hibridación *in situ* del gen *Arc*.

6.4.- Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Los tejidos fueron procesados por medio de hibridación in situ fluorescente para detectar el transcrito del gen *Arc*. Se seleccionaron laminillas que contenían secciones de la corteza insular y de la amígdala basolateral de los tejidos para el procedimiento histológico. El procesamiento consistió en fijar los tejidos con paraformaldehído, después se colocaron en una solución de acético anhídrido y por último en una de acetona-metanol. Después se realizó un paso de prehibridación, se colocaron los tejidos con buffer de hibridación sin sonda, en una cámara húmeda de incubación cerrada herméticamente, para después realizar la hibridación en la misma cámara. Se colocó una sonda de ARN antisentido del mensajero del gen *Arc* marcada con digoxigenina (200 ng de sonda por cada 100 µl de buffer de hibridación, Sigma St. Louis MO) y se mantuvieron los tejidos a

una temperatura de 56° C durante 16-18 horas. Posterior a la hibridación se realizó una serie de lavados incluyendo uno con RNAasa A, para eliminar el ARN no hibridado y los restos de sonda que no hibridaron en el proceso anterior. Después de los lavados se realizó una incubación con anticuerpo primario anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa durante toda la noche, a una temperatura de 4° C. Se detectó el anticuerpo por medio del sistema de amplificación de PerkinElmer® con TSA y el fluoróforo cianina 3 (Cy3). Por último se tiñeron los núcleos con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o Sytox.

6.5.- Análisis confocal

Se obtuvieron las imágenes con un objetivo 40X de inmersión, utilizando un microscopio confocal Olympus® FV1000, con el cual por medio de un láser 543 He/Ne se excitó la señal de CY3, un láser 488 de Ar para excitar la señal de Sytox y un láser multilínea azul de Ar para excitar la señal de DAPI. Se realizaron apilados en el plano de Z de las estructuras de interés, y los parámetros se establecieron de acuerdo a un animal del grupo control y se mantuvieron a lo largo de la laminilla. Se tomaron 6 diferentes áreas a lo largo del plano de Z en la corteza insular y 5 áreas en el caso la amígdala basolateral. Posteriormente se analizaron las fotografías obtenidas con el software de Image J.

6.6.-Análisis de imágenes

Para el análisis de las imágenes se tomaron en cuenta todos los planos en Z de cada una de las fotografías, y se obtuvo el plano medio a partir de la división en dos del total de los planos. A partir del plano medio se tomaron en cuenta para el conteo el 60% de los planos hacia arriba y hacia abajo que componen la imagen. Se contabilizaron las células totales y las que presentaron tinción del ARN mensajero del gen *Arc* según los siguientes parámetros:

- Células positivas para *Arc* en citoplasma: aquellas con *marca* en el 60% del citoplasma.
- Células positivas para *Arc* en núcleo: aquellas con *marca* de los dos alelos del gen en al menos 4 planos de Z.
- Células positivas para *Arc* en citoplasma y núcleo: aquellas que cumplieran los dos criterios anteriores.
- Células negativas para *Arc*: aquellas que no cumplieron ningún criterio anterior.

6.7.- Genotipificación

Para corroborar que los animales utilizados en el experimento fueron efectivamente 3xTg-AD o silvestres, se tomó un fragmento de cola de cada animal después de su sacrificio. Se extrajo el DNA y posteriormente se corrió un protocolo de PCR convencional para detectar los genes APP-tau y PS1.

6.8.- Análisis estadístico

Se obtuvieron, a partir de los conteos realizados en el análisis de imágenes, el número de neuronas totales de las estructuras analizadas, y el número de neuronas con ARN mensajero del gen *Arc* según su localización celular. Se sumaron el total de neuronas contabilizadas para cada animal, y se realizó una proporción entre las neuronas positivas para cada condición de expresión de *Arc* y el total de células. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y luego un análisis post-hoc de Fishers para evaluar si había diferencia entre los grupos en el caso del análisis de células. Se realizó una prueba *t* de Student pareada para analizar el consumo de sacarina y agua consumida en los grupos de ratones. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$ para todos los casos.

VII.- RESULTADOS

7.1.- Consumo de agua durante la línea basal y de sacarina en la neofobia

Los animales fueron expuestos a un sabor novedoso seguido de un inductor de malestar gástrico el día del condicionamiento, después de cinco días de línea base de agua. Se registraron los consumos de líquido durante los días de consumo de agua y el día de la presentación de la sacarina. Una prueba t de Student pareada no reveló diferencias significativas entre el consumo de sacarina y el promedio de consumo de agua para ningún grupo.

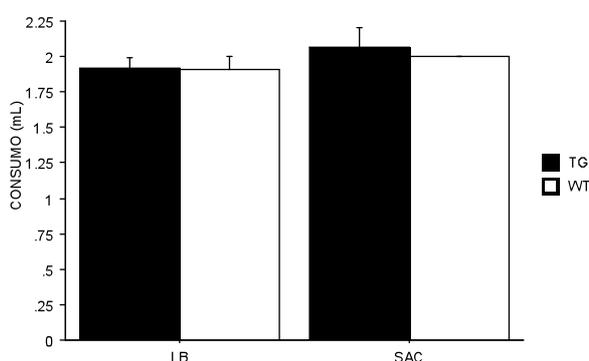


Figura 7.1. Consumo de línea base de agua y sacarina de ratones de tipo silvestre y 3x-Tg AD. En esta gráfica se muestra el consumo en mililitros de línea base de agua y el consumo de sacarina el día del condicionamiento. No se observan diferencias entre los grupos.

Estos resultados indican que los animales de tipo silvestre o 3x-Tg no muestran neofobia al sabor novedoso. Sin embargo, esto podría deberse al poco volumen que consumen durante los días, ya que el tiempo en el que pueden beber está restringido a sólo 5 minutos, debido a que esto es necesario para realizar el protocolo de catFISH.

7.2.- Análisis de imágenes

Se presentó el estímulo condicionado (sacarina 0.3%) durante 5 minutos, 30 minutos después se inyectó el estímulo incondicionado (cloruro de litio 0.4M) vía intraperitoneal, y 5 minutos después se sacrificaron los animales. Se realizaron dos grupos control, a los que sólo se les presentó uno de los dos estímulos del CAS. Se obtuvieron los cortes correspondientes a las estructuras deseadas y se realizó el protocolo de catFISH antes descrito. Las imágenes se analizaron de acuerdo a los siguientes criterios: se incluyeron

en el análisis las neuronas identificadas por medio de la contratinción de Sytox que estuvieran en el plano medio de las imágenes y se descartaron las células gliales del análisis. Una vez identificadas las neuronas, se identificaron aquellas que mostraron señal de *Arc* por medio de la tinción de Cy3, y se consideraron positivas las células que tuvieran tinción en núcleo y/o citoplasma en al menos el 60% de los planos medios.

Debido a la dinámica de expresión del gen *Arc*, éste se puede ver expresado en el núcleo cuando las células responden al estímulo más reciente en el tiempo, es decir, al cloruro de litio. Cuando las células responden al estímulo más lejano en el tiempo, sacarina, la expresión de *Arc* se observa en el citoplasma. Por lo tanto, las células que muestran señal de *Arc* en el núcleo y citoplasma, son aquellas que responden a los dos estímulos.

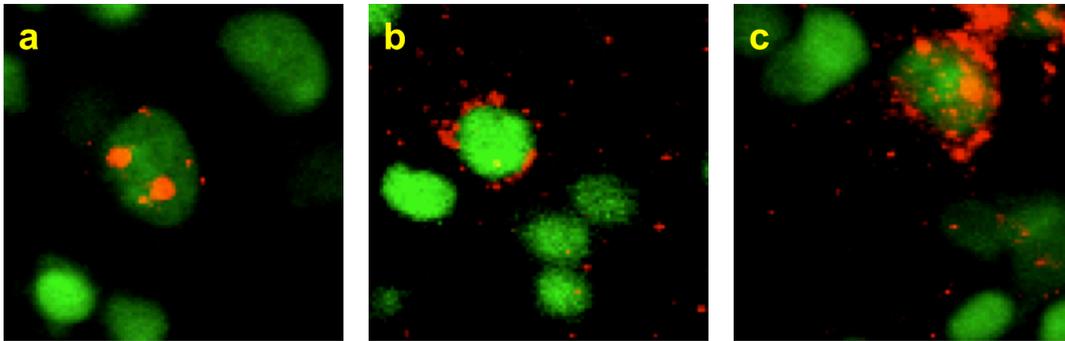


Figura 7.2.1 Expresión de Arc en neuronas después de la presentación de los estímulos del CAS. Se muestran imágenes representativas de células activadas después de la adquisición del CAS. El color verde es la señal de Sytox que tiñe los núcleos y la señal de color rojo es de Cy3 que indica la señal del transcrito del gen Arc. a) célula con tinción nuclear b) célula con tinción en citoplasma c) célula con tinción en núcleo y citoplasma.

La cuantificación de las células se llevo a cabo en todas las áreas de la corteza insular, como se muestra en la figura 7.2.2, y se analizaron las imágenes como se describió anteriormente a partir de las fotografías obtenidas.

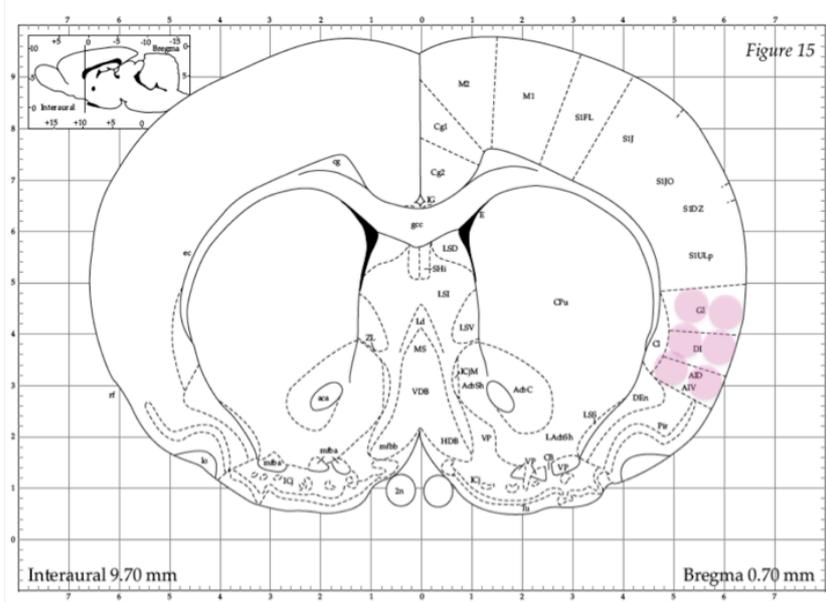


Figura 7.2.2. Esquema representativo de las sección analizada de la corteza insular. Cada círculo representa una zona de donde se obtuvo una fotografía. (modificado de Paxinos & Watson, 1998).

La cuantificación de las células en la amígdala basolateral se llevó a cabo como se muestra en la figura 7.2.3, y se analizaron las fotografías obtenidas como se describió anteriormente.

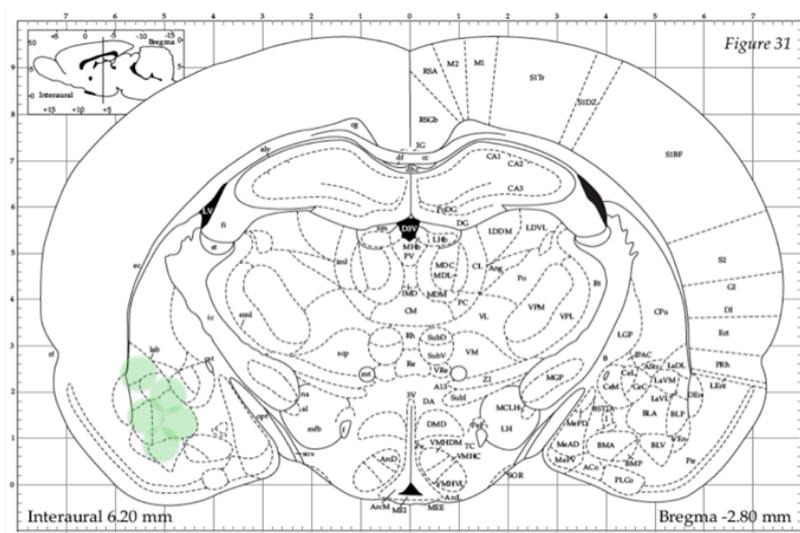


Figura 7.2.3 Esquema representativo de las sección analizada de la amígdala basolateral. Cada círculo representa la zona de donde se obtuvo cada fotografía. (modificado de Paxinos & Watson, 1998).

7.3.- Identificación de neuronas que expresan *Arc* después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la CI de animales de tipo silvestre.

El análisis de imágenes en la corteza insular de animales de 9-11 meses de edad de tipo silvestre demostró que hay un incremento en el número de neuronas que responden a la presentación del sabor en comparación con el grupo control ($p > 0.05$). Los resultados muestran un mayor número de células que expresan *Arc* en el citoplasma, cuando el EC es presentado solo, no así cuando es presentado junto con el EI después del CAS.

También se observa un aumento en el número de neuronas que expresan *Arc* en el núcleo, en el grupo conductual al que sólo se le presentó el EI. Se observan diferencias significativas en el porcentaje de células con expresión en núcleo, después de la presentación del EC, en comparación del grupo control intacto ($p < 0.01$). No se observan diferencias en el número de células con expresión nuclear, después de la presentación de los estímulos en el grupo del CAS.

Finalmente, para la expresión de *Arc* localizada tanto en núcleo como en citoplasma, se observa que hay un incremento significativo ($p < 0.01$) en el número de neuronas marcadas en comparación con el grupo control de caja, después de la presentación de los dos estímulos juntos (CAS). No se observó aumento en el número de neuronas que expresaron *Arc* en núcleo y citoplasma cuando alguno de los estímulos se presentó solo. Estos resultados se muestran en la figura 7.3.2, en donde se graficó el porcentaje del total de neuronas que expresan *Arc* después de la exposición de estímulos del CAS según el grupo conductual.

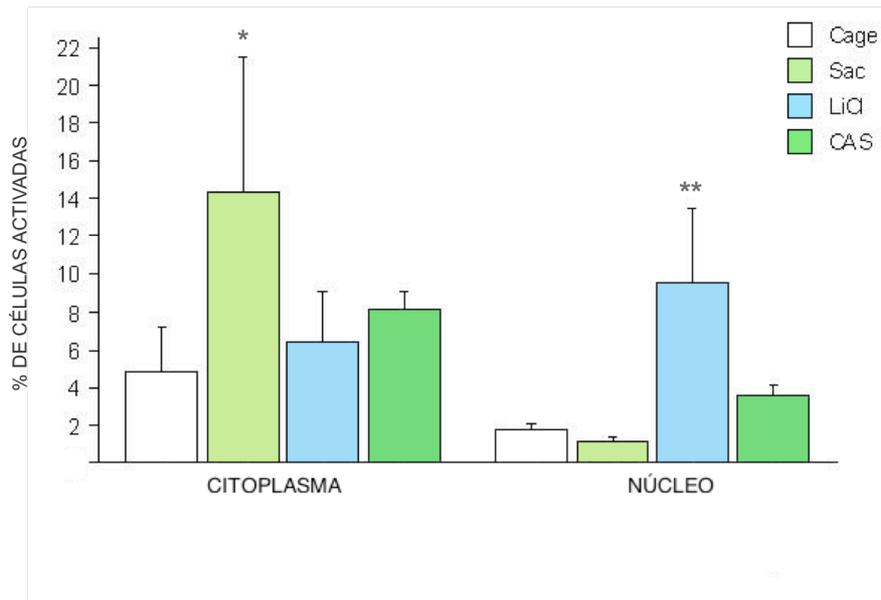


Figura 7.3.1. Activación de neuronas que expresan Arc en citoplasma o núcleo en la corteza insular de ratones silvestres de 9-11 meses de edad. La gráfica muestra el porcentaje de células activadas que expresan Arc de acuerdo al total de células encontradas. Las células que respondieron sólo a uno de los dos estímulos después de la adquisición del CAS, muestran tinción de Arc en citoplasma si fueron activadas por el EC (sacarina) o en núcleo si fueron activadas por el EI (Cloruro de Litio). Los * muestran si hay diferencias entre un grupo y su respectivo control de caja, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$.

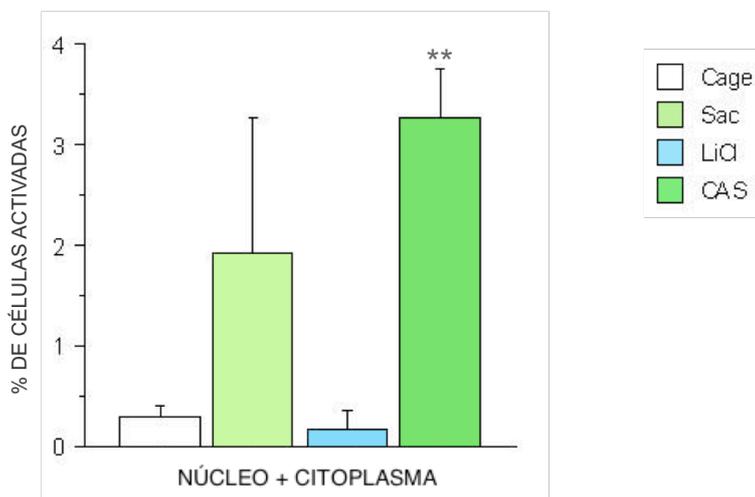


Figura 7.3.2. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo y citoplasma en la corteza insular de ratones silvestres de 9-11 meses de edad. Se observa un aumento en el porcentaje de células que expresan Arc en núcleo y citoplasma después de la presentación de los EC y EI después del CAS, en comparación con en el grupo control. No se observa activación doble en los grupos de los estímulos presentados por separado. Los * muestran si hay diferencias entre un grupo y su respectivo control de caja, **= $p < 0.01$.

7.4.- Identificación de neuronas que expresan *Arc* después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la CI de animales 3x-Tg AD.

El análisis de resultados para el grupo de animales 3x-Tg AD de 9-11 meses de edad no reveló diferencias para las células que se activan en núcleo o citoplasma en la región de la corteza insular, para ninguna de las condiciones conductuales en comparación con su control de caja. Como se muestra en la gráfica 7.4.1, no se observa ningún incremento en el porcentaje de células que expresan *Arc* después de la presentación de estímulos, en citoplasma o núcleo, en comparación con el grupo control intacto.

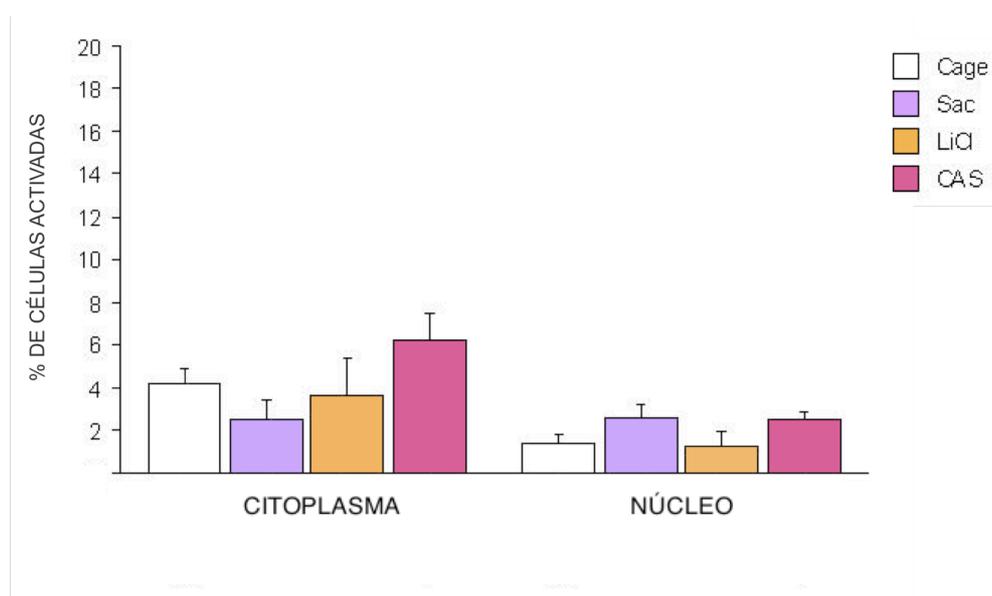


Figura 7.4.1. Activación de neuronas que expresan *Arc* en núcleo o citoplasma en la corteza insular de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad. Se muestra el porcentaje de células que muestran expresión de *Arc* en núcleo o citoplasma y no se observan diferencias en la activación de células que responden a los estímulos EC o EI, presentados solos o después del CAS, en comparación con el grupo control.

Asimismo, en la activación doble (citoplasma y núcleo) de células de la corteza insular de ratones 3x-tg AD de 9-11 meses de edad, no se observaron diferencias después de la presentación de los estímulos solos o apareados, en comparación con el control conductual intacto. En la siguiente gráfica 7.4.2, podemos observar el porcentaje de células con expresión del gen *Arc* en núcleo y citoplasma que responden a los estímulos del CAS en la corteza insular. No se observan diferencias en el porcentaje de células activadas en los ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad en comparación con el grupo control.

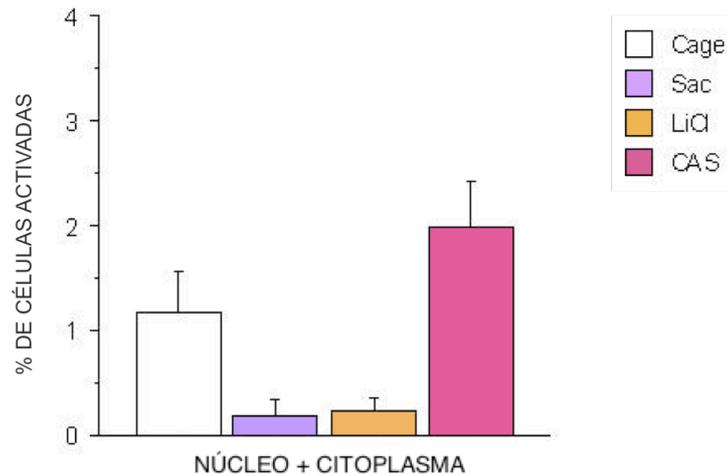


Figura 7.4.2. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo y citoplasma en la corteza insular de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad. No se observa un aumento significativo en el porcentaje de células activadas que responden a los dos estímulos después del CAS, ni tampoco en los grupos a los que se les presentaron los estímulos por separado, en comparación con el grupo control intacto.

En resumen, los resultados obtenidos en la corteza insular indican que en los animales silvestres hay una población de neuronas que responde al estímulo incondicionado después de su presentación sola ya que hay diferencias significativas entre este grupo y el control respectivo ($p < 0.01$). Asimismo, en este grupo de animales silvestres se observa que para las células que responden al EC en el citoplasma, hay diferencias entre el grupo control de caja y el que sólo recibió EC, lo que indica que en la corteza insular hay una población de neuronas que responde al estímulo de la sacarina cuando se presenta sólo ($p < 0.05$). Cuando se realiza el condicionamiento de aversión hay un aumento en el porcentaje de neuronas que responden a ambos estímulos en la CI, en comparación con la activación de neuronas del grupo control intacto ($p < 0.01$). Por el contrario, en los animales 3x-Tg AD, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de activación de células que responden a los estímulos, presentados solos o después del CAS, en comparación con sus respectivos grupos control intactos.

Los datos obtenidos en la corteza insular nos muestran que hay un grupo de células de la CI de los animales de tipo silvestre que se activa y responde a los estímulos, condicionado e incondicionado, después del aprendizaje del CAS. Así como también podemos ver que en los grupos control con presentación de EC o EI, hay células de la CI que responden sólo a esa estimulación. Los datos no muestran diferencia en el porcentaje

de las células con expresión de *Arc* en la CI de animales 3x-Tg AD de 9-11 meses en comparación al grupo control intacto. Esto indica que no hay un aumento en el número de neuronas que responden a los estímulos después del CAS o a los estímulos solos. Esto sugiere una posible relación entre la falta de activación de células después del condicionamiento de aversión con la patología de la enfermedad de Alzheimer que presentan los animales 3x-Tg.

7.5.- Identificación de neuronas que expresan *Arc* después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la ABL de animales de tipo silvestre.

El análisis de las imágenes en la región de la amígdala basolateral de animales de 9-11 meses de edad de tipo silvestre, demostró que hay un incremento en el número de neuronas que responden a la presentación del sabor, EC, en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Las neuronas que respondieron al EC expresaron *Arc* en el citoplasma, cuando la sacarina fue presentada sola, y no mostraron esta activación cuando la sacarina fue presentada junto con el EI en el grupo del CAS. También se observa un aumento en el número de neuronas que expresan el gen *Arc* en el núcleo, en el grupo conductual al que sólo se le presentó el EI, y se observan diferencias significativas con el grupo control intacto ($p < 0.05$). No se observan diferencias en la expresión citoplásmica o nuclear después de la presentación de los estímulos durante el CAS. Los resultados se muestran en la gráfica 7.5.1, en porcentaje de células que expresan *Arc* en citoplasma o núcleo con respecto al total de células contabilizadas en esta estructura.

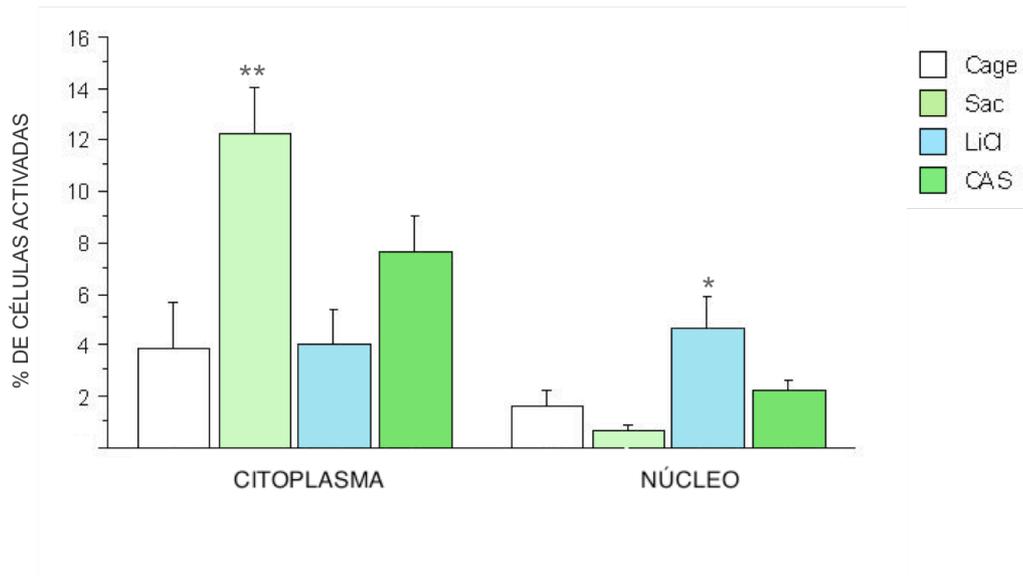


Figura 7.5.1. Activación de neuronas que expresan *Arc* en núcleo o citoplasma en la ABL de ratones silvestres de 9-11 meses de edad. Se grafica en porcentaje de células activadas, las neuronas que expresan *Arc* en núcleo o citoplasma, después de la presentación de los estímulos del CAS. Los * muestran si hay diferencias entre un grupo y su respectivo control intacto **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$.

Se observó en los animales de tipo silvestre un aumento significativo en el porcentaje de células de la ABL que expresan *Arc*, como respuesta a los dos estímulos en el grupo del condicionamiento con respecto al grupo control intacto. Es decir, hay un aumento en el número de células en las que coincide la información de los estímulos en la ABL después del condicionamiento de aversión al sabor. *= $p < 0.05$. No se observaron cambios en el porcentaje de células que expresaron *Arc* en los grupos que sólo tuvieron presentación de sacarina o litio en comparación al grupo control intacto.

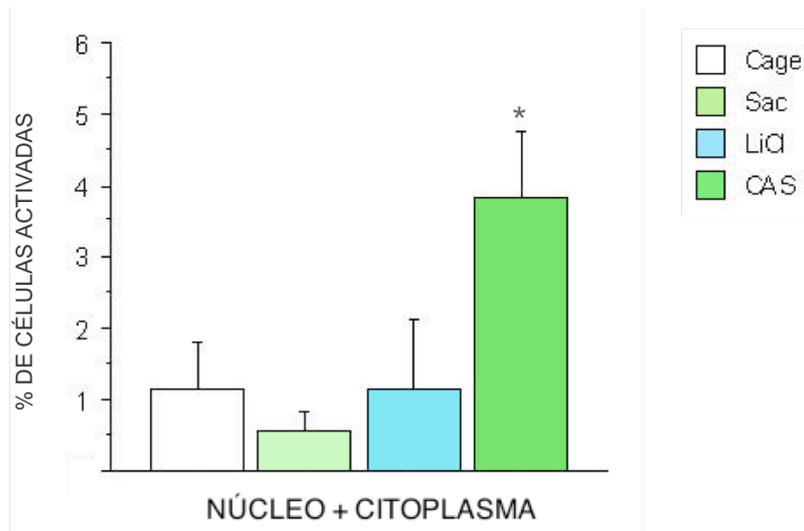


Figura 7.5.2. Activación de neuronas de la ABL de ratones silvestres de 9-11 meses de edad que expresan *Arc* en núcleo y citoplasma. Se muestra en porcentaje de células que expresan *Arc* en citoplasma y núcleo la respuesta a los estímulos condicionado e incondicionado después de la presentación de los estímulos del CAS. Los * muestran si hay diferencias entre un grupo y su respectivo control de caja, $* = p < 0.05$.

7.6.- Identificación de neuronas que expresan *Arc* después de la presentación de los estímulos durante el CAS en la ABL de animales 3x-Tg AD.

El análisis de resultados en la amígdala basolateral para el grupo de animales 3x-Tg AD de 9-11 meses de edad, no mostró diferencias en la activación de células que responden a la presentación de estímulos solos o juntos en el CAS. Como se muestra en la gráfica 7.6.1, no se observa ningún incremento en el porcentaje de células que expresan *Arc* en citoplasma o núcleo, en comparación con el grupo control intacto, cuando los estímulos son presentados solos o después de la presentación de ambos durante el condicionamiento de aversión al sabor.

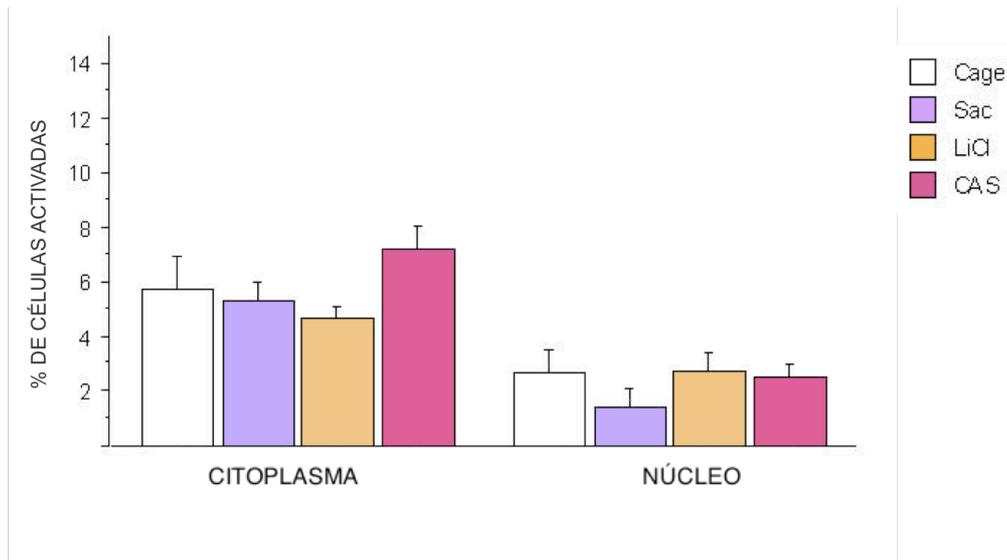


Figura 7.6.1. Activación de neuronas en la ABL de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad que expresan Arc en núcleo o citoplasma . La gráfica muestra el porcentaje de células activadas, que respondieron sólo a uno de los estímulos después de la adquisición del CAS, o después de la presentación de los estímulos solos. No se observan diferencias significativas entre los grupos conductuales y el grupo control intacto para la activación de células que muestran tinción de Arc en núcleo o citoplasma.

El análisis estadístico de la expresión de *Arc* en núcleo y citoplasma en la amígdala basolateral de ratones 3x-Tg AD de 9-11 meses de edad no reveló diferencias significativas para el grupo conductual que recibió los dos estímulos durante la adquisición del CAS en comparación con el grupo control. Tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos donde se presentó un solo estímulo con respecto al grupo control intacto. Estos resultados se pueden observar en la siguiente gráfica 7.6.2.

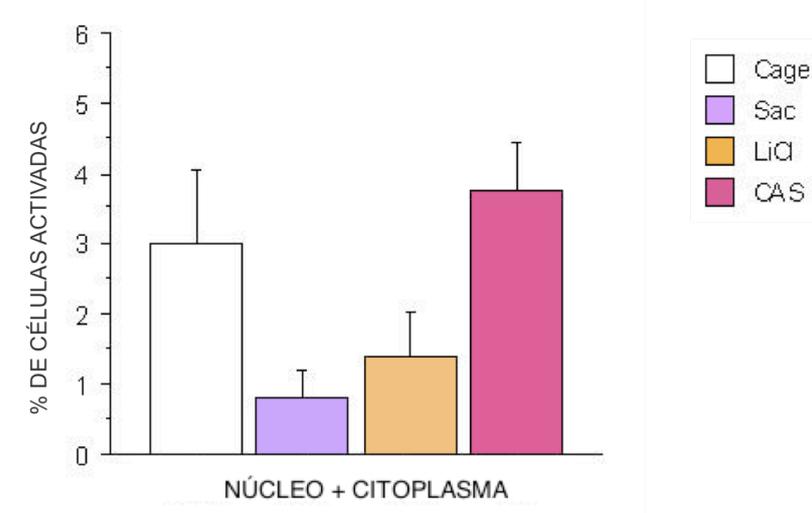


Figura 7.6.2. Activación de neuronas que expresan Arc en núcleo y citoplasma en la ABL de ratones 3x-Tg de 9-11 meses de edad. La gráfica muestra en porcentaje de células activadas, aquellas que respondieron a los dos estímulos después de la adquisición del CAS, o después de la presentación de los estímulos solos. No se observan diferencias significativas entre alguno de los grupos conductuales y el grupo control para el porcentaje de neuronas que muestran tinción de Arc en núcleo y citoplasma.

Los resultados en la ABL de ratones 3x-Tg AD de 9-11 meses de edad muestran que no hay un incremento en el porcentaje de células que expresan el gen *Arc* como respuesta a los estímulos, ya sean presentados juntos durante el CAS o solos, en comparación con el grupo control intacto.

En resumen, los datos obtenidos en este trabajo, muestran que en la corteza insular y en la amígdala basolateral de ratones de tipo silvestre hay un grupo de neuronas que se activa por la presentación de los estímulos condicionado o incondicionado, respondiendo sólo en citoplasma o núcleo, cuando se presentan solos. Por otra parte, muestran que hay un grupo de células en la CI y ABL, en las que la información de los estímulos después del condicionamiento coincide, ya que se ve un incremento en la expresión del gen *Arc* tanto en núcleo como en citoplasma, en comparación con la expresión del grupo control intacto. En el caso de los datos obtenidos en la CI y ABL de ratones 3x-Tg AD, los resultados no muestran un aumento en el número de células que expresan *Arc* después de la presentación de los estímulos solos o de la adquisición del condicionamiento. Lo anterior sugiere que la falta de activación de neuronas en este grupo de ratones puede estar relacionado a procesos asociados a la patología de la enfermedad de Alzheimer.

VIII.- DISCUSIÓN

8.1.- Convergencia de estímulos en la CI y ABL durante la adquisición del CAS en animales de tipo silvestre.

Arc es un gen de expresión temprana, que está involucrado en procesos de memoria y aprendizaje. Se sabe que ratones knock-out para este gen, son incapaces de aprender nuevas tareas y consolidarlas, entre ellas el CAS (Plath *et al*, 2006). Por otro lado, si se inyecta una secuencia antisentido de oligonucleótidos, antes de una tarea de aprendizaje se bloquea la adquisición de la misma, y cuando se administra la secuencia antes de la inducción de la PLP se bloquea la fase tardía de la potenciación (Guzowski *et al*, 2000). Por lo tanto, la expresión de la proteína para la que codifica el gen *Arc* juega un papel importante en la plasticidad y la formación de la memoria de largo plazo.

El análisis de catFISH permite visualizar neuronas que expresan el gen *Arc* y que se han activado por estímulos recientes (Guzowski *et al*; 1999). En el caso particular de esta tesis, resultó una técnica muy útil, ya que los tiempos de expresión de *Arc* necesarios para su detección en citoplasma y núcleo se acoplan de manera ideal a los tiempos de presentación de los estímulos durante la adquisición del CAS. De tal manera, el catFISH nos permitió visualizar las células que respondieron al estímulo gustativo, sacarina, aquellas que lo hicieron al malestar gástrico como estímulo incondicionado, y por lo tanto también se identificaron las células que respondieron a los dos estímulos.

En la literatura se ha descrito el papel que juegan la corteza insular y la amígdala basolateral en la formación de la memoria de aversión al sabor. Se ha reportado que lesiones de estas estructuras o la aplicación de inactivadores, como tetrodotoxina, inhibidores de la síntesis de proteínas, o bloqueadores funcionales de los sistemas de neurotransmisión, bloquean la formación de la memoria de aversión al sabor (Gallo *et al*; 1992; Rosenblum *et al*; 1994, Bermúdez-Rattoni, 2004, Morris *et al.*, 1999, Miranda *et al.*, 2003). En conjunto, los trabajos mencionados sugieren que en estas estructuras se están llevando a cabo procesos importantes para la asociación de la información del aprendizaje de aversión al sabor y para su almacenamiento en el largo plazo. Por lo tanto, era sugerente pensar que en estas estructuras podríamos observar coincidencia de estímulos después de la adquisición del CAS, ya que ambas son necesarias para el almacenamiento de la información de la memoria de aversión al sabor.

Los resultados mostrados en el presente trabajo son coincidentes con los encontrados por Barot y colaboradores en el 2008. En dicho estudio evaluaron por medio de catFISH la coincidencia de estímulos durante el CAS en la amígdala basolateral de rata. Observaron que hay una población de neuronas en dicha estructura en donde converge la información del aprendizaje. Los datos encontrados en esta tesis en animales de tipo silvestre muestran que en la ABL de ratón hay un grupo de neuronas que responden a los EC y EI después del CAS, ya que observamos un incremento en el número de neuronas que expresan *Arc* en citoplasma y núcleo después del CAS.

Sin embargo, con respecto a la corteza insular, en este trabajo se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas que responden a los estímulos después de la adquisición del CAS en la corteza insular de ratón, a diferencia del trabajo de Barot y cols. La diferencia podría deberse a que el área analizada en ese trabajo fue la región agranular de la CI y en esta tesis se analizaron tanto las áreas agranular, disgranular y granular de la corteza. Los datos aquí presentados concuerdan con otros resultados como el de Ferreira y colaboradores del 2006, que demostraron que la corteza insular es activada por la asociación de los estímulos condicionado e incondicionado después del CAS. Evaluaron la activación de esta estructura específicamente la región disgranular, por medio de inmunohistoquímica de la proteína codificada por otro gen de transcripción temprana, c-Fos. Observaron que cuando el sabor novedoso es asociado a un malestar gástrico, hay un aumento en la inducción de la expresión de c-Fos en la corteza insular, específicamente en la región disgranular. Por lo tanto, los datos aquí presentados son coincidentes con aquellos que demuestran la participación de la corteza insular, y específicamente la región disgranular durante el aprendizaje de aversión al sabor.

En un trabajo reciente, se observó que por medio de la infusión de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en el núcleo central de la amígdala de rata antes del condicionamiento, se podía afectar la formación de la memoria gustativa (García-de-laTorre *et al*; 2010). Sin embargo, en el trabajo antes mencionado no se encuentran efectos cuando la inyección del inhibidor se realizó en el núcleo basolateral de la amígdala. Por lo tanto, para estudios futuros resultaría de gran interés estudiar, por medio de la técnica de catFISH, la expresión de *Arc* en neuronas de la región central de la amígdala, y después evaluar diferencias con la región basolateral.

Los resultados presentados en esta tesis de la corteza insular y amígdala basolateral concuerdan con los diversos estudios que han estudiado la importancia y la participación de estas estructuras en la formación de la memoria de aversión al sabor. En este trabajo fue posible visualizar de manera específica poblaciones de neuronas en la CI y ABL que respondieron a los estímulos después de la adquisición del CAS, ya que se pudieron identificar cuales de ellas responden al estímulo gustativo, al estímulo visceral o a ambos.

Se ha establecido que durante el aprendizaje de tipo asociativo (Fanselow & Poulos, 2005), la convergencia de estímulos en células particulares es lo que permite que ocurran cambios plásticos y posteriormente que se almacene la memoria. Así como también, se sabe que los mecanismos plásticos, entre los que se encuentran, la transcripción de genes y la expresión de proteínas, son los que permiten que ocurra la consolidación de memorias en las neuronas que conforman una red formada por aquellas células activadas. Es decir, con los resultados aquí presentados se está identificando un circuito neuronal que responde a la asociación específica de dos estímulos después de su presentación.

La identificación de células activadas después de la asociación de estímulos tiene una implicación importante para el estudio del aprendizaje y la memoria. Las ideas para explicar la asociación entre estímulos se han planteado desde tiempos antiguos. Como lo fueron los postulados filosóficos de Aristóteles, que explicaban el aprendizaje a partir de la asociación de ideas simples y su transformación en ideas más complejas, a los planteamientos de David Hartley sobre la asociación de estímulos a través de los nervios, hasta los postulados teóricos de Donald Hebb en su libro *“The Organization of Behavior”*. Éste último sugirió que la activación convergente de los estímulos asociados ocurre en “ensambles” (circuitos, redes) neuronales que subyacen al aprendizaje. Por lo tanto, los datos de este trabajo muestran un conjunto de neuronas de la amígdala basolateral y de la corteza insular que podrían ser parte de los circuitos neuronales en los que se almacena la información de la memoria de aversión al sabor.

Posibles líneas de investigación futura en relación a nuestros resultados

A) Para la identificación de poblaciones neuronales en la investigación de procesos asociativos en animales silvestres

Se han desarrollado técnicas que permiten estudiar de manera específica la participación de células particulares en alguna tarea conductual. Específicamente, Han y colaboradores

en el 2009, reportaron un método que permite afectar únicamente las células que se activan después de cierto comportamiento, y así evaluar si son necesarias en la prueba de memoria. Han y cols. utilizaron un ratón transgénico en el cual se puede inducir muerte neuronal de manera selectiva por medio de la infusión de la toxina de la difteria y al tiempo requerido. Con este diseño, la infusión de la toxina permite causar muerte neuronal sólo en las células que expresan CREB después del condicionamiento. De esta manera causaron la muerte específica de las neuronas que se activaron después del condicionamiento al miedo y como consecuencia bloquearon la expresión de la memoria del miedo. La pérdida de la memoria fue permanente, lo que indica que identificaron un circuito de neuronas de la amígdala que activado después del aprendizaje resulta necesario para el almacenamiento de la información adquirida.

El uso de la metodología del trabajo de Han y cols. podría ser empleado para estudiar si la activación de las células que se observó en los resultados de esta tesis, en la amígdala basolateral y en la corteza insular después del CAS, es necesaria para el almacenamiento de la memoria. De esta manera se comprobaría que la convergencia de información de los estímulos durante la adquisición determina en qué células se almacenará la memoria.

B) Para estudios de plasticidad en células que expresan *Arc* donde converge la información de estímulos del CAS

La función del gen de *Arc* ha sido estudiado ampliamente. Se ha determinado que la proteína para la que codifica juega varios papeles en la plasticidad sináptica (Shepard *et al*; 2006, Rial Verde *et al*; 2006; Chowdury *et al*; 2006). Además, su expresión es necesaria para la adquisición de varias tareas de aprendizaje (Plath *et al*; 2006).

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que hay un grupo de neuronas en la corteza insular y en la amígdala basolateral de los animales de tipo silvestre de 9 meses en las que la información de los estímulos condicionado e incondicionado converge. Dado que se ha establecido que dicha coincidencia puede provocar cambios plásticos en las neuronas involucradas, como por ejemplo el fortalecimiento de sinapsis entre otros (Blair *et al*; 2003), y debido a que *Arc* es un indicador de plasticidad, estos datos sugieren que probablemente sea en estas células en particular, dónde se lleven a cabo cambios plásticos que contribuyen a la formación de la memoria de aversión al sabor. Por lo tanto, en estudios futuros, también se podrían estudiar los cambios plásticos que ocurren en

estas células específicas, como consecuencia de su activación por la coincidencia de información durante el aprendizaje de aversión al sabor.

8.2.- Convergencia de estímulos en la CI y ABL durante la adquisición del CAS en animales 3x-Tg modelo de la enfermedad de Alzheimer.

En los animales 3x-Tg con enfermedad de Alzheimer, por el contrario a lo encontrado en los animales de tipo silvestre, no se observa un incremento en la activación de las células por la presentación de estímulos durante el CAS. Esto sugiere que tal vez la falta de expresión del gen *Arc* en las neuronas de la corteza y amígdala basolateral, esté relacionada con algún mecanismo de la patología de la enfermedad de Alzheimer. También se observa que los animales 3x-Tg no muestran el incremento en la respuesta al estímulo gustativo como lo muestran los animales de tipo silvestre, o al estímulo visceral por separado.

Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con otros resultados conductuales obtenidos en nuestro grupo de trabajo por Moreno y colaboradores. Los animales 3x-Tg a partir de los 9 meses de edad no son capaces de adquirir el condicionamiento de aversión al sabor (Moreno *et al*; 2010). Asumiendo que las células donde converge la información después del CAS puedan formar parte del circuito donde se almacenará la memoria, y que en este trabajo no se observa dicha coincidencia, entonces se puede decir que los datos concuerdan con la conducta observada en dichos ratones.

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran dos grupos de ratones, unos que aprenden la tarea del CAS (ratones de tipo silvestre) y los que no la aprenden (3x-Tg) (Moreno *et al*; 2010), los primeros muestran un incremento en la coincidencia de estímulos después del aprendizaje de aversión mientras que los segundos no. Por lo que se pueden distinguir dos modelos que indican que cuando hay aprendizaje se puede observar coincidencia, y cuando no hay aprendizaje no se observa la coincidencia en células de estructuras importantes durante el procesamiento de información gustativa.

Aunque ya se ha reportado en diversos estudios que las fallas cognitivas en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer comienzan en edades tempranas, y que correlacionan con la cantidad de acumulación de las proteínas beta-amiloide o tau, aún no se conocen los mecanismos moleculares exactos que provocan las fallas en el almacenamiento de la memoria. Sin embargo hay estudios que han intentado explicar las fallas cognitivas y los procesos celulares involucrados en el almacenamiento de la memoria.

En el trabajo mencionado, Moreno y cols, evaluaron también la liberación de dopamina durante la presentación del estímulo gustativo, en ratones 3x-Tg de 9 meses y 5 meses y se comparó con la liberación de dopamina en animales de tipo silvestre. Encontraron que hay una deficiencia en la liberación de dopamina en la CI de los animales 3x-Tg. Demostraron que la falla en la liberación de neurotransmisor coincide con la prueba conductual en donde los animales 3x-Tg no reconocen la sacarina como estímulo novedoso ya que el volumen de consumo del sabor novedoso se ve incrementado, en comparación con los otros grupos de ratones como se muestra en la siguiente figura 7.2.1 (Moreno-Castilla *et al*; 2010).

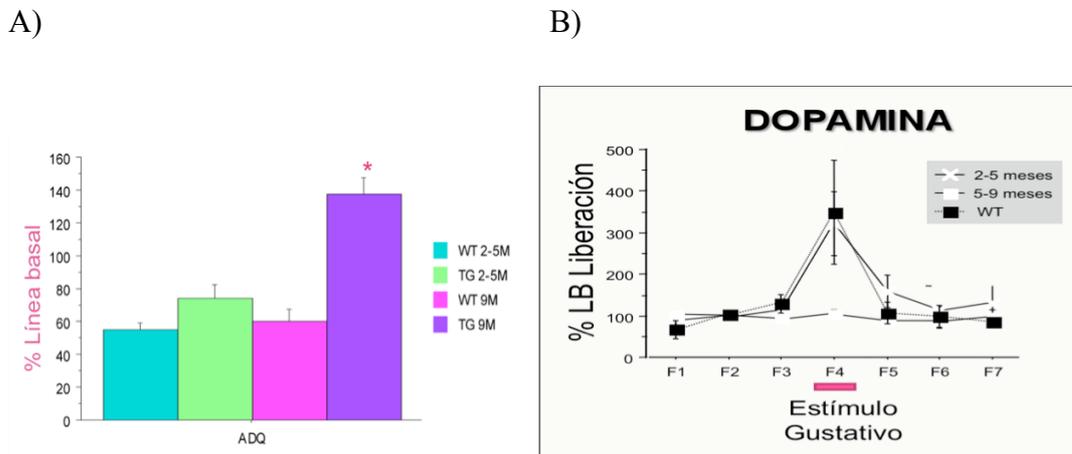


Figura 8.2.1. A) Neofobia en animales de tipo silvestre y 3x-Tg de 2-5 y 9 meses de edad. Se muestra el consumo de sacarina en porcentaje de línea basal de agua en la consolidación del CAS y se observa un incremento en el consumo de líquido en los animales 3x-Tg de 9 meses. B) Liberación de dopamina en la CI durante la presentación de un sabor novedoso en ratones de tipo silvestre y 3x-Tg, de 2-5 y 5-9 meses de edad. Se muestra que en los animales 3x-Tg de 5 a 9 meses no hay un incremento en la liberación de dopamina como en los animales jóvenes de 2 a 5 meses, o como en los animales de tipo silvestre, por la presentación de un sabor novedoso (Moreno-Castilla *et al*; 2010).

El trabajo de Moreno y cols, sugiere que la falla de liberación de dopamina en la CI ocasiona que no haya reconocimiento de un sabor novedoso en los ratones 3x-Tg de edad avanzada. En conjunto, estos datos son correlativos con los encontrados en la tesis aquí presentada, dado que no se observa un incremento en la activación de las células que responden a la sacarina cuando es presentada sola, mientras que en los animales silvestres si se observa dicho incremento. Sugiriendo así, que en los ratones 3x-Tg de edad avanzada hay un impedimento para reconocer el sabor novedoso, y como consecuencia no se esté procesando la información gustativa necesaria para que ocurra la coincidencia de estímulos en células de la corteza insular y de la amígdala.

Como ya se había mencionado, las vías de procesamiento de la información gustativa del sabor, y la visceral del malestar gástrico han sido ampliamente descritas y están caracterizadas, como se muestran en la figura 3.2. Por lo tanto, para evaluar si la falla en la coincidencia de estímulos es provocada por el déficit para reconocer un sabor novedoso en ratones 3x-Tg AD, se podría analizar la activación de células en otras estructuras por donde la información pasa antes de llegar a la corteza gustativa o a la amígdala, después la presentación de los estímulos. Dicha estructura a estudiar podría ser el núcleo basal magnocelular, que recibe la información gustativa del núcleo parabraquial y envía proyecciones hacia la corteza y a la amígdala (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Otra posible explicación acerca de la incapacidad que tienen animales con patología la EA es la asociada a la acumulación del péptido de beta-amiloide que se explica en el siguiente reporte. Empleando otro modelo murino para la enfermedad de Alzheimer se evaluó la memoria de aversión al sabor (Devi & Ohno, 2010). Probaron la formación de la memoria en el modelo 5XFAD. Observaron que los ratones utilizados muestran déficits desde los 9 meses para adquirir el CAS y que hay depósito del péptido de beta amiloide en la CI y ABL. Evaluaron la memoria a largo plazo en otro grupo de ratones BACE 1+/5XFAD modificado genéticamente para reducir los sitios de corte de beta-amiloide. Observaron en la prueba de memoria que presentaban una mejora en la capacidad de adquirir el aprendizaje de aversión al sabor, a niveles de aversión equivalentes a los de animales de tipo silvestre. También observaron que la acumulación de beta-amiloide en la CI y ABL estaba reducida en el grupo de los BACE1+/5X-FAD en comparación con la acumulación en los animales 5xHAD.

El trabajo de Devi y Ohno es una evidencia directa de la relación entre la acumulación de beta-amiloide y las fallas en la memoria gustativa de aversión, en un modelo transgénico que desarrolla la patología de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, es necesario estudiar más a fondo los mecanismos celulares por los cuales el péptido de beta amiloide puede afectar estos procesos cognitivos.

En un estudio previo, de Dickey y cols, se reportó en un modelo de ratón con EA de APP y PS1, que muestra la patología de acumulación beta amiloide, la desregulación de la expresión de varios genes necesarios para la consolidación de ciertos tipos de memoria, entre ellos genes relacionados con plasticidad sináptica y genes de expresión inmediata, como el gen *Arc*. Los resultados mostraron que la acumulación del péptido de beta amiloide puede disminuir la expresión de genes necesarios para la plasticidad y la consolidación de la memoria de manera selectiva (Dickey *et al*; 2004)

Algunos procesos celulares que se sabe participan en las cascadas de señalización del gen *Arc* se han visto afectados en modelos de laboratorio para el estudio de la EA. Se reportó, en un trabajo de Snyder y cols, que en cultivos de neuronas corticales el péptido de beta amiloide promueve la endocitosis de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA. También vieron que en ratones transgénicos con mutaciones en el gen que codifica para la proteína APP, se observa una menor cantidad de receptores NMDA en la superficie celular (Snyder *et al*; 2005). Asimismo, se reportó que el péptido de beta-amiloide inhibe la inducción de la PLP cuando es dependiente de receptores NMDA (Wang *et al*; 2004). En conjunto, estos antecedentes podrían ayudar a explicar las diferencias encontradas en esta tesis de expresión del gen *Arc* en neuronas de la CI y ABL después del CAS, ya que como se mencionó con anterioridad su expresión depende de la activación de receptores NMDA.

Otro reporte de Dineley y colaboradores del 2001, utilizando un modelo de ratón transgénico para el gen de APP, demostró una regulación por el péptido beta amiloide de los receptores nicotínicos nACh, asociada a una disminución de la proteína MAPK en el hipocampo. También observaron un menor nivel de fosforilación de la proteína CREB provocado por altos niveles del péptido A β 42. Cabe señalar que CREB también es capaz de promover la transcripción del gen *Arc* por medio de su unión al elemento regulador SARE, necesario para la expresión de *Arc* (Bramham *et al*; 2010).

Para poder concluir algo más acerca del efecto que tiene la patología característica de la enfermedad de Alzheimer en la expresión de *Arc* en los ratones 3x-Tg, sería necesario realizar más experimentos. Éstos podrían analizar los mecanismos celulares que permiten la convergencia de información de estímulos en células particulares en condiciones normales, es decir, en animales silvestres. Luego se podrían estudiar cuáles de esos mecanismos se están viendo afectados y si están relacionados a las fallas cognitivas observadas a edades tempranas en modelos de laboratorio. De esta manera, junto con el desarrollo de nuevas metodologías se podría contribuir a la búsqueda de un tratamiento que ayude a revertir o disminuir los efectos en el aprendizaje y la memoria, y por lo tanto un entendimiento más completo de la EA.

IX.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados de los experimentos antes descritos en este proyecto podemos concluir lo siguiente:

- La asociación de estímulos incrementa la activación coincidente en neuronas de la corteza insular y de la amígdala basolateral después del aprendizaje del condicionamiento de aversión al sabor en ratones de tipo silvestre.
- En ratones 3x-Tg con enfermedad de Alzheimer no se observa un incremento en el número de neuronas en la corteza insular o amígdala basolateral que hayan sido activadas por la coincidencia de estímulos después del aprendizaje de aversión al sabor.
- Hay un incremento en neuronas activadas de la corteza insular y de la amígdala basolateral de ratones de tipo silvestre que responden a los estímulos, sacarina o cloruro de litio, presentados solos.
- En ratones 3x-Tg con enfermedad de Alzheimer no se observa un incremento en el número de neuronas que responden a los estímulos de la sacarina o cloruro de litio, cuando se presentan solos.

X.- BIBLIOGRAFÍA

- Abrams TW, Karl KA, Kandel ER. (1991) Biochemical studies of stimulus convergence during classical conditioning in *Aplysia*: dual regulation of adenylate cyclase by Ca²⁺/calmodulin and transmitter. *J Neurosci.* 2655-65.
- Barot SK, Kyono Y, Clark E. W, and Bernstein I. L. (2008). Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *PNAS.* 20959-63.
- Bermúdez-Rattoni F. y Prado Alcalá. R.. (2001) *Memoria, donde reside y cómo se forma.* México: Trillas (11-36).
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004) Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nat Rev Neurosci,* 209-217.
- Bernstein I. L. y Koh M. T. (2007) Molecular Signaling during Taste Aversion Learning. *Chem Senses* 32, 99-103
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron.* 45(5):675-88.
- Blair HT, Tinkelman A, Moita MA, LeDoux JE. (2003). Associative plasticity in neurons of the lateral amygdala during auditory fear conditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 985:485–87.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232(2):357-74.
- Braak H and Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259.

- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K. (2010) The *Arc* of synaptic memory. *Exp Brain Res.* (2):125-40.
- Bures, J. Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. Editors, *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*, Oxford University Press, New York (1998)
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. (2006) *Arc/Arg3.1* interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron.* 52(3):445-59.
- Devi L, Ohno M. (2010). Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *Eur J Neurosci.* 31(1):110-8.
- Dickey CA, Gordon MN, Mason JE, Wilson NJ, Diamond DM, Guzowski JF, Morgan D. (2004). Amyloid suppresses induction of genes critical for memory consolidation in APP + PS1 transgenic mice. *J Neurochem.* 88(2):434-42.
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. (2001). Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21(12):4125-33.
- Dudai, Y.(2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology.* 55: 51-86.
- Fanselow MS, Poulos AM. (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annual Reviews of Psychology.* 56(3): 207-34.
- Ferreira G, Ferry B, Meurisse M, Lévy F. (2006). Forebrain structures specifically activated by conditioned taste aversion. *Behav Neurosci.* 120(4):952-62.
- Finger, S. (2001) The Nature of the memory tree. En *Origins of Neuroscience: A history of Explorations into Brain Function*. Oxford University Press.

- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA. (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science*. 323(5920):1492-6.
- Gallo, M; Roldan, G; Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research*. 52(1):91-7.
- Garcia-Delatorre P, Rodríguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F. (2010). Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *Eur J Neurosci*. 32(6):1018-23.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Environment-specific expression of the immediate early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat. Neurosci*. 1999; 2: 1120.
- Guzowski JF. *et al.* Inhibition of activity-dependent *arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long term memory. *J. Neurosci*. 2000; 20: 3993
- Hebb DO. The Organization of Behavior. John Wiley & Sons; New York: 1949.
- Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. (2000) Learning and memory. In Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill-Health Division. 642, 1227-1246.
- Kandel ER (2009) Molecules for Short Term Memory. En Memory: Form Mind to Molecules 2nd Ed. L. Squire & Kandel ER. Roberts and Company Publishers.
- Kelly MP, Deadwyler SA. (2003) Experience-dependent regulation of the immediate-early gene *arc* differs across brain regions. *J Neurosci*. Jul 23;23(16):6443-51.

- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*. 2004 Nov 10;24(45):10191-200.
- Lansner A. (2009). Associative memory models: from the cell-assembly theory to biophysically detailed cortex simulations. *Trends Neurosci*. Mar;32(3):178-86. Epub 2009 Jan 31.
- Levy WB, Steward O. (1983). Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. *Neuroscience* Apr;8(4):791-7.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:649-711.
- Martinez, J. L., Jr., y Kesner, R. P. (Eds.) (1998). *Neurobiology of learning and memory*. San Diego, CA: Academic.
- McGaugh, J.L. (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in Neurosciences* Vol.25 No.9
- Miranda, MI; LaLumiere, T; Buen, T.V; Bermúdez-Rattoni, F; McGaugh, J.L. (2003) Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 18, pp. 2605±2610,
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF (2008) Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 89:269–284
- Moreno-Castilla P., Guzmán K. R., F. Bermúdez- Rattoni. Dopaminergic dysfunction during novel stimuli presentation in aged triple transgenic mice for Alzheimer disease, ; Society for Neuroscience Annual Meeting. San Diego CA. November 2010.

- Morris, R; Frey, S; Kasambira, T; Petrides, M; (1999) Ibotenic Acid Lesions of the Basolateral, but Not the Central, Amygdala Interfere With Conditioned Taste Aversion: Evidence From a Combined Behavioral and Anatomical Tract-Tracing Investigation. Behavioral and Anatomical Tract-Tracing Investigation. Behavioral Neuroscience, 291-302.
- Oddo, S., *et al.* (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, CA.
- Pistell PJ, Zhu M, Ingram DK. Acquisition of conditioned taste aversion is impaired in the amyloid precursor protein/presenilin 1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2008;152:594–600
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bosl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D. 2006 *Arc/Arg3.1* is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*. 52: 437.
- Purves, D; Augustine, George J; Pitzpatrick, David; Hall, William C; Lamantia, Anthony S; McNamara, James O; Williams, S. Mark (Eds.) (2003). *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc.; Sunderland, MA.
- Ramírez-Amaya, V (2007) Molecular mechanisms of synaptic plasticity underlying long-term memory formation. En: F. Bermúdez-Rattoni, Editor, Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging, Taylor and Francis Group, Florida: 209–224.
- Reilly, S., y Bornovalova, M. (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: A critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Rev. 20: 1–22

- Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT. Increased expression of the immediate-early gene *arc/arg3.1* reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*. Nov 9;52(3):461-74.
- Roediger, H; Dudai, Y; Fitzpatrick, S. (2007). *Science of Memory: Concepts*. Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Roldan, G. y Bures, J. (1994) Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research*, 65(2):213-9.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol*. 1993 Jan;59(1):49-56.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. (2006). *Arc/Arg3.1* mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*. Nov 9;52(3):475-84.
- Siegel, G; Albers, R. W.; Brady, S; Price, D; (eds.); (1999). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed; American Society for Neurochemistry, USA.
- Steward O, Worley PF (2002) Local Synthesis of Proteins at Synaptic Sites on Dendrites: Role in Synaptic Plasticity and Memory Consolidation?. *Neurobiology of Learning and Memory* 78, 508–527
- Squire, L.R. & Kandel, E. (2009). *Memory: From Mind to Molecules*, 2nd Edition. Greenwood Village: Roberts & Company Publishers.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, *et al*. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*. 2005;8(8): 1051–1058
- Tronson N.C. y Taylor J.R. (2007) Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 8(4):262-75. Review.

- Tzingounis A.V. and Nicoll R.A. (2006) *Arc/Arg3.1*: Linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52:403-407.
- Wang Q, Rowan MJ, Anwyl R. (2004). Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci.*;24(27):6049–6056.
- Welzl, H, D’Adamo P., and Lipp H.P. (2001) Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioral Brain Research* 125: 205–213.
- Yamamoto T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol.* 2006 Dec;69(4):243-55.