



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**SEÑALIZACIÓN CELULAR IMPLICADA EN LA CONSOLIDACIÓN  
DE LA MEMORIA DE AVERSIÓN AL SABOR**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

**Q.F.B. LUIS ALFREDO RODRÍGUEZ BLANCO**

TUTOR PRINCIPAL: **DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DRA. LIVIA SÁNCHEZ CARRASCO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

**DRA. GINA LORENA QUIRARTE**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

**CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DEL 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	2
<b>II. SUMMARY</b> .....	5
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	6
1. Acerca de la Memoria .....	6
2. Transcripción y traducción génicas en la consolidación de la memoria .....	8
3. Epigenética de la memoria .....	12
3.1 La acetilación de histonas .....	13
4. El condicionamiento de aversión a los sabores .....	17
5. La corteza insular y la vía gustativa .....	21
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	25
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>VI. METODOLOGÍA</b> .....	27
1. Sujetos experimentales .....	27
2. Canulación .....	27
3. Condicionamiento de aversión a los sabores .....	28
4. Histoquímica de Nissl .....	29
5. Análisis de Datos .....	29
<b>VII. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	35
1) Histológicos .....	35
2) Conductuales .....	36
2.1 La consolidación de la memoria del CAS requiere síntesis de nuevo ARNm inmediatamente y 7 h después de la adquisición de esta memoria .....	36
2.2 La inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I fortalece la memoria de un CAS débil transformándolo en uno fuerte .....	38
2.3 La inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I en la corteza insular no fortalece la memoria en un CAS fuerte .....	39
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	42
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	42
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	48
<b>XI. ANEXO</b> .....	59

## I. RESUMEN

La visión actual de la neurobiología del aprendizaje y la memoria sugiere que la memoria de largo plazo (LTM) depende no sólo de la síntesis de proteínas sino también de la síntesis de ARNm incluso horas después de la adquisición de la memoria. Sugiere asimismo, que la regulación de la transcripción a través de la acetilación de histonas es esencial para el establecimiento de la memoria. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que la inhibición de la síntesis proteica en la corteza insular (CI) alrededor del tiempo de entrenamiento y de 5 a 7 horas después de la adquisición previene la consolidación del condicionamiento de aversión al sabor (CAS), un paradigma de aprendizaje y memoria bien establecido en el que un animal aprende a asociar un sabor novedoso con malestar gástrico. Sin embargo, la participación de la síntesis de ARNm, así como la regulación epigenética a través de la acetilación de histonas en este proceso permanece aún inexplorada. En el presente estudio evaluamos el efecto de la inhibición de la transcripción y la deacetilación de histonas en la consolidación del CAS mediante la infusión de 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) y MS-275 respectivamente en la CI inmediatamente y siete horas después de la adquisición de esta tarea. Nuestros resultados muestran que la inhibición de la transcripción inmediatamente y 7 horas después de la adquisición del CAS deteriora la consolidación de esta memoria, mientras que la inhibición de la deacetilación de histonas fortalece esta memoria en las citadas ventanas temporales. Estos hallazgos revelan que la memoria del CAS requiere de rondas recurrentes de eventos de modulación transcripcional en la CI para consolidar este trazo de memoria. Sugieren asimismo, que la modulación transcripcional y epigenética contribuye de manera sustancial a las

funciones relacionadas con la consolidación de la memoria, efectuadas por un área neocortical incluso varias horas después de la adquisición de la memoria.

## II. SUMMARY

The current view of the neurobiology of learning and memory suggests that long-term memory (LTM) depends not only on the de novo protein synthesis but also on the synthesis of mRNA even hours after the acquisition of memory, as well as that the regulation of transcription through the histone acetylation is essential for the memory establishment. Our previous studies showed that protein synthesis inhibition around the time of training and 5 to 7 hours after acquisition in the insular cortex (IC) prevents the consolidation of conditioned taste aversion (CTA), a well-established learning and memory paradigm in which an animal learns to associate a novel taste with nausea. However, the participation of mRNA synthesis and the epigenetic regulation through histone acetylation in this process remains unexplored. In the present study we evaluated the effect of the inhibition of transcription as well as deacetylation of histones at two temporal windows on the consolidation of CTA. Thus, immediately or seven hours after CTA acquisition animals received a microinfusion of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) or MS-275 in the IC, respectively. The present results show that transcription inhibition immediately and 7 hours after acquisition impairs the CTA memory consolidation, whereas the inhibition of histone deacetylation strengthens this memory at those temporal windows. These findings reveal that CTA memory requires recurrent rounds of transcriptional modulation events in the IC in order to consolidate this memory trace, demonstrating that transcriptional and epigenetic modulation substantially contribute to memory-consolidation-related functions performed by a neocortical area even several hours after memory acquisition.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **1. Acerca de la memoria**

La memoria es el proceso por el cual el conocimiento adquirido es codificado, almacenado y más tarde recuperado (Kandel et al., 2000).

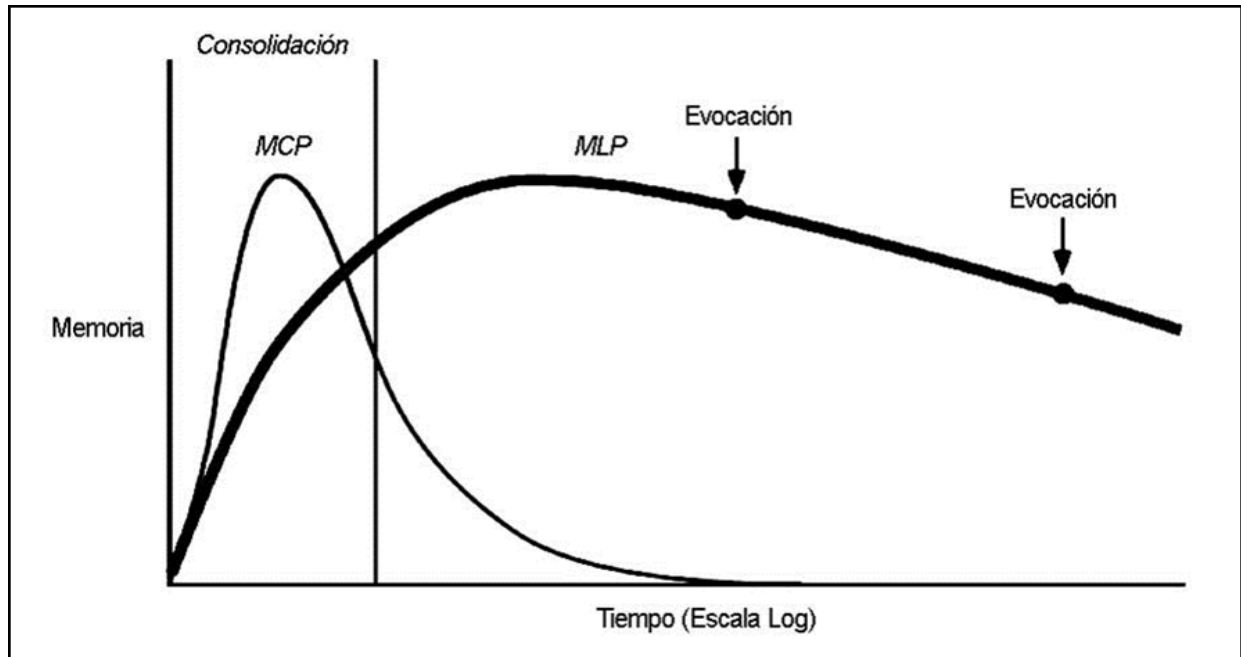
Desde el punto de vista de su curso temporal, la memoria puede ser dividida en al menos dos fases: una fase independiente de síntesis de proteínas (memoria a corto plazo; MCP) con capacidad para retener temporalmente, en un rango de segundos a horas, una cantidad limitada de la información recientemente percibida (i.e. 7 más o menos 2 ítems) (Atkinson & Shiffrin, 1968); esta forma de memoria depende del repaso activo y de la atención, pues es fácilmente afectada por la adquisición de nueva información o por la exposición a distractores (Gluck, et al., 2008). Y una fase dependiente de síntesis de proteínas (memoria a largo plazo; MLP) que va de varias horas, días o hasta años de duración y con capacidad para retener durante periodos prolongados de tiempo, en un rango de días a meses o años, grandes cantidades de información independientemente del momento de adquisición de la misma (Bailey et al., 2004; Medina et al., 2008; Sternberg, 2012).

Existe una transición de la memoria de corto a la de largo plazo. Tras la adquisición existe un intervalo de tiempo limitado durante el cual las asociaciones se refuerzan y se vuelven estables, este proceso es denominado consolidación (McGaugh, 2000).

Las observaciones de Müller y Pilzecker así como las observaciones clínicas llevaron respectivamente a utilizar el término consolidación para referirse a dos procesos relacionados. El primero se denomina consolidación sináptica, y se refiere a los cambios asociados al remodelamiento funcional y/o estructural a nivel sináptico, los cuales tienen lugar en los primeros minutos u horas después de la adquisición (Frankland & Bontempi, 2005). Por su parte, el segundo, es denominado consolidación de sistemas y se refiere a la reorganización lenta y progresiva de las regiones cerebrales que sustentan a la memoria (Dudai, 2004).

Numerosos estudios han demostrado que la expresión génica y la síntesis de nuevas proteínas son eventos necesarios para la consolidación de la memoria, ya que la inhibición de la transcripción o de síntesis proteica inmediatamente después del aprendizaje disminuye el desempeño de los animales en tareas de condicionamiento clásico y memoria espacial (Igaz et al, 2002; Roozendaal, 2002).





**Figura 1.** Clasificación temporal de la memoria. MCP: Memoria de corto plazo, MLP: Memoria de largo plazo (Modificado de Dudai, 2004).

## 2. Transcripción y traducción génicas en la consolidación de la memoria

La transcripción, el primer paso de la expresión génica es el mecanismo a través del cual se copia una secuencia de ácido desoxiribonucleico (ADN) hacia una de ácido ribonucleico (ARN). Es un proceso intrincado que requiere la acción concertada de complejos proteína-ARN que dictan la expresión de un gen particular. Se estima que entre el 5% y el 10% de las secuencias expresadas en el genoma humano codifican para los reguladores de transcripción, lo que subraya la importancia y la complejidad de la regulación de la transcripción. Los reguladores de la transcripción incluyen a las proteínas de unión al ADN que definen la tasa de transcripción de genes y son

comúnmente conocidos como factores de transcripción, requiere asimismo cofactores que interactúan con los factores de transcripción, reguladores de la cromatina, la maquinaria general de transcripción, así como sus reguladores. La mayoría de los genes que son expresados en una célula, son transcritos en el núcleo en una molécula llamada ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que es transportado del núcleo hacia el citoplasma, donde es traducido a proteínas (Figura 2). Numerosas evidencias experimentales indican que la consolidación de la memoria es un proceso dependiente de la síntesis de nuevas proteínas y ARNm (Davis y Squire, 1984; McGaugh, 2000; Dudai y Eisenberg, 2004).

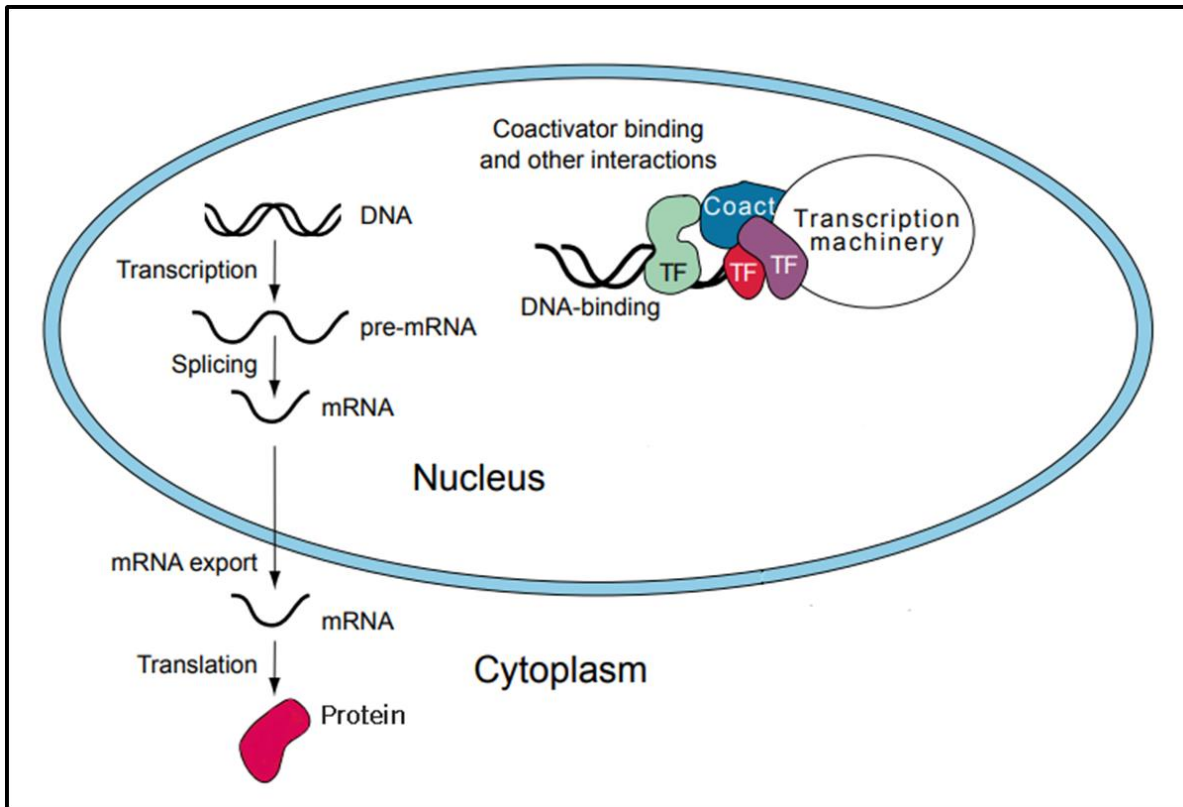
Por lo anterior, el empleo de fármacos que inhiben la síntesis de proteínas o de ARNm permite el análisis de la participación de estos mecanismos moleculares en los procesos de aprendizaje y memoria. Entre los fármacos que inhiben la traducción, la anisomicina ha sido ampliamente utilizada debido a que es un inhibidor potente, estructuralmente específico y reversible, cuyo pico de actividad se encuentra entre los 20 y 30 minutos posteriores a su administración (Davis y Squire, 1984; Rosenblum et al., 1993). Por otra parte, entre los fármacos que inhiben el proceso de transcripción, destaca el 5,6- Di-cloro-benzimidazol-ribósido (DRB) debido a que su efecto es reversible (entre las 2 y 3 horas después de su aplicación) y su pico de actividad se ubica alrededor de los 15 min tras su infusión (Nguyen et al., 1994). Además, el DRB inhibe selectivamente a la ARN polimerasa II (ARNP II), afectando la producción de transcritos maduros, en contraste con la actinomicina- D y la  $\alpha$ -amanitina, las cuales afectan también la síntesis de ARN de transferencia y ribosomal, puesto que interfieren

con la actividad de las ARNP I y ARNP III, la  $\alpha$ -amanitina afecta también el nivel de traducción proteínica a altas concentraciones (Clement y Wilkinson, 2000).

Estudios empleando inhibidores de la transcripción de ARNm en una variedad de especies que van desde invertebrados hasta mamíferos han demostrado que la consolidación de la memoria requiere de la síntesis de ARNm y su traducción en proteínas, y que estos eventos transcripcionales son fundamentales como parte de los mecanismos preservados evolutivamente para la formación de la memoria de largo plazo (Emptage and Carew, 1993; Izquierdo et al., 1998; Nestler 1993; Pedreira et al. 1996). La consolidación de la memoria requiere de la transcripción y traducción en múltiples fases durante una ventana temporal inicial y limitada. Por ejemplo, en el hipocampo de la rata, una región clave para la formación de memoria explícita, se requiere de al menos dos períodos de transcripción para establecer una memoria de evitación inhibitoria a largo plazo. El primer período de transcripción tiene lugar durante el entrenamiento en tanto que el segundo ocurre alrededor de 3 a 6 h más tarde (Quevedo et al., 1999; Igaz et al. 2002). Se ha reportado que el requerimiento de transcripción inicial en el hipocampo continúa por más de 24 h y termina 48 horas tras el entrenamiento (Taubenfeld et al. 2001; Garcia-Osta et al. 2006; Bekinschtein et al. 2007; Chen et al. 2011).

El importante papel de la transcripción génica para la formación de la memoria de largo plazo ha sido confirmado por su requerimiento durante los mecanismos celulares que contribuyen a su formación. Entre éstos se incluyen la potenciación de largo plazo (LTP) y la depresión de largo plazo (LTD) en vertebrados e invertebrados (Lynch 2004),

fortaleciendo así la conclusión de que la transcripción y la expresión génica son mecanismos esenciales para estabilizar la plasticidad sináptica de largo plazo.



**Figura 2. Representación esquemática del proceso de transcripción.** El proceso de transcripción es iniciado en el núcleo de la célula, el pre-ARNm es sintetizado a partir del ADN, el pre-ARNm es transportado al citoplasma de la célula donde es convertido en ARNm maduro y traducido a proteínas. La parte superior derecha esquematiza de manera general el complejo necesario para el proceso de transcripción. Abreviaciones: TF, factor de transcripción; coact, coactivador. Modificado de Schwechheimer, 1998.

Entre los factores de transcripción involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria se encuentran el factor de transcripción nuclear kappa  $\beta$  (NFK $\beta$ ) y la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), así como los productos de la

expresión de genes de expresión temprana que incluyen a las proteínas c-Fos, Zif268 (factor de transcripción zinc finger) y Arc (proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad) (Guzowski 2002; Veyrac et al. 2014).

### **3. Epigenética de la memoria**

La epigenética hace referencia al conjunto de elementos funcionales que regulan la expresión génica de una célula sin alterar la secuencia de ADN (Ionita-Laza, Lange y Laird 2009, Jiang et al. 2008; Levenson y Sweatt 2005). La acetilación y fosforilación de histonas así como la metilación del ADN constituyen algunos de los mecanismos más ampliamente estudiados en torno a la modificación de la cromatina. Las colas N-terminales de las histonas no están estructuradas y son susceptibles de adición o eliminación de grupos funcionales. La adición de grupos acetilo y fosfato da como resultado la exposición del ADN y por lo tanto favorece la formación del estado activo de la cromatina o eucromatina, mientras que la ubiquitinación y la SUMOilación “oculta” el ADN protegiéndolo de la maquinaria transcripcional. Por su parte, la metilación de las colas de histonas puede originar ya sea la activación o la represión de genes. Por ejemplo, las formas mono-, di-, y tri-metiladas de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me, H3K4me<sub>2</sub>, H3K4me<sub>3</sub>) y la mono-metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me) da como resultado la activación de la transcripción mientras que la di y tri-metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me<sub>2</sub>, H3K9me<sub>3</sub>) da como resultado la represión de la transcripción (Gupta et al. 2010). A diferencia de los grupos acetilo y fosfato, los grupos

metilo regulan la transcripción funcionando como sitios de acoplamiento para reclutar proteínas activadoras o represoras para reestructurar la cromatina.

La regulación de la expresión génica derivada de la actividad neuronal durante los procesos de aprendizaje y memoria involucra modificaciones epigenéticas. Entre estas modificaciones se encuentran, el remodelamiento de la cromatina, la modificación post-traduccionales de histonas, y la metilación de ADN, los cuales regulan la estructura de la cromatina (Cortés-Mendoza et al., 2013). El estado de condensamiento del ADN alrededor de los nucleosomas es un determinante crítico de la actividad transcripcional; si el ADN está altamente condensado (heterocromatina) los factores de transcripción y la ARN polimerasa no pueden acceder a las regiones promotoras de los genes, por lo cual la transcripción se mantiene inactiva; sin embargo, si el ADN se desenrolla (eucromatina), se habilita el acceso de los factores de transcripción y la ARN polimerasa a las regiones promotoras de los genes promoviendo la transcripción. Este estado condensado del ADN puede ser alterado por distintas modificaciones post-traduccionales que tienen lugar en las colas N-terminales de las histonas; entre dichas modificaciones se han descrito la fosforilación, la metilación y la acetilación, esta última principalmente estudiada en los procesos de plasticidad sináptica y en la memoria dependiente del hipocampo (Guan et al., 2002; Jenuwein & Allis, 2001; Suganuma & Workman, 2011).

### 3.1 La acetilación de histonas

La acetilación de las histonas consiste en la adición de un grupo acetilo (-CO-CH<sub>3</sub>) en los residuos de lisina de la proteína en cuestión. Al acetilarse, las histonas pierden su afinidad electrostática con el ADN promoviendo la apertura de la cromatina y la activación de la actividad transcripcional; la cual es regulada por las enzimas histonas acetil transferasas (HAT), como CBP, P300, y el factor asociado a P300/CBP (PCAF). Asimismo, la acetilación de las histonas es revertida por las deacetilasas de histonas (HDAC) entre las cuales HDAC1, HDAC2 y HDAC3 son las más estudiadas y están presentes en numerosos complejos de represión disminuyendo la actividad transcripcional (Gräff & Tsai, 2013a; Sweatt, 2009). Durante la deacetilación las histonas cambian su equilibrio hacia la condensación de la cromatina y en consecuencia se silencia la expresión génica. A diferencia de las HAT, las HDAC tienen una rica diversidad estructural, que les confiere diversidad funcional convirtiéndolas en objetivos potenciales para la generación de fármacos de intervención terapéutica. Numerosas HDAC comparten un dominio catalítico común dependiente de zinc, pero difieren en los dominios accesorios que les confieren especificidad hacia sus proteínas blanco. Las HDAC de mamíferos se dividen en cuatro clases principales (1-4), siendo las de las clases I y II las que reciben mayor atención debido a su participación en el sistema nervioso (Carey & La Thangue 2006). En mamíferos, existen 11 diferentes histonas deacetilasas entre las cuales las dependientes de zinc se dividen en las clases I, II y IV con base en la homología de su secuencia. La clase III contiene una familia de deacetilasas dependientes de NAD ahora llamadas sirtuinas, que son estructural y

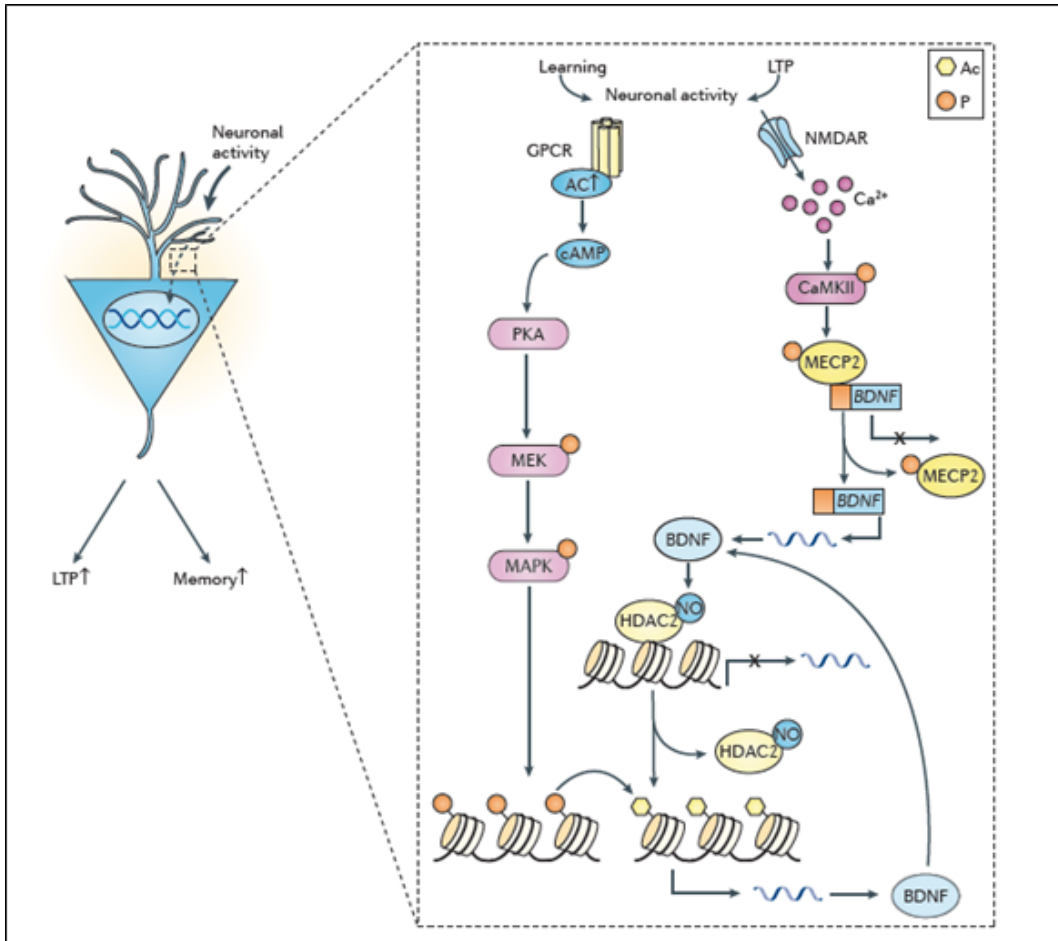
funcionalmente distintas de las HDAC "clásicas" dependientes de zinc. Se han encontrado diferencias importantes entre las HDAC en términos de la expresión específica en tejido, localización subcelular y funciones fisiológicas. Las HDAC de clase I; 1, 2, 3 y 8 se expresan de manera ubicua y se localizan predominantemente en el núcleo. Por el contrario, HDACs 4,5,7 y 9 (clase IIa), HDACs 6 y 10 (clase IIb) y HDAC 11 (clase IV) muestran patrones de expresión más restringidos y son citoplásmicas (HDAC6) o se transportan entre el núcleo y el citoplasma (HDAC 4,5,7 y 9-11), (Fischer et al., 2010; Haberland et al., 2009).

La acetilación de histonas es una modificación epigenética prominente del sistema nervioso central que está inequívocamente asociada con un aumento en la tasa de transcripción de genes (Gräff y Tsai, 2013b). Las HDAC y los complejos correpresores asociados pueden funcionar en las neuronas, en parte, como "frenos moleculares". Las HDAC se localizan en los promotores de los genes activos y actúan como represores persistentes que requieren una señalización fuerte dependiente de actividad para liberar temporalmente estos complejos, activando así la expresión génica requerida para la formación de la memoria de largo plazo (McQuown y Wood, 2011). La primera evidencia de que la acetilación de histonas podría estar relacionada en los procesos de formación de la memoria se identificó por primera vez en estudios donde se examinó la acetilación de histonas, 1 y 24 hrs después del condicionamiento contextual del miedo e inhibición latente donde se encontró un aumento en la acetilación de la histona H3 1 hora después del condicionamiento contextual del miedo en la región CA1 del hipocampo (Levenson et al., 2004).



Se ha descrito que, en regiones cerebrales involucradas en la formación de la memoria, como la amígdala, el hipocampo y la corteza, prevalece la expresión de HDAC de la clase I (Broide et al., 2007). Existe evidencia experimental de que facilitar la acetilación de las histonas empleando butirato de sodio (NaB) o tricostatina (TSA) promueve una mejora en la consolidación de la memoria de largo plazo durante la tarea de condicionamiento contextual del miedo (Levenson et al., 2004); los mismos efectos facilitadores se han observado al inyectar TSA inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos (Roosendaal, et al., 2010) y en el laberinto acuático de Morris (Dash, Orsi, y Moore, 2009). De la misma manera un aprendizaje que no tiene la fortaleza para promover el almacenamiento de largo plazo puede ser transformado a través de la inhibición de HDAC's con NaB (Stefanko, 2009). Así, la administración sistémica de NaB mejoró el aprendizaje del condicionamiento de aversión al sabor haciéndolo más resistente a la extinción e incrementó significativamente los niveles de c-Fos y la fosfo-acetilación de la histona H3 en la amígdala central (Kwon y Houpt, 2010). En un estudio efectuado por Stafford y colaboradores, la infusión de NaB en el hipocampo condujo a aumentos en la acetilación de histonas, así como en la expresión de c-Fos consistente con una extinción fuerte en la corteza infralímbica (Stafford et al., 2012). Por su parte, el entinostat, conocido como SNDX-275 y MS-275, es un novedoso y potente derivado benzamídico inhibidor de HDAC's (Saito et al., 1999), que en contraste con otros inhibidores es más selectivo afectando solo a las HDAC1 de la clase I (Hu et al., 2003; Khan et al., 2008). Hawk et al., (2011) mostraron que la inhibición de las HDACs de la clase I empleando MS-275 facilita el desempeño de la memoria de lago plazo en la tarea de localización de objetos. El MS-275 muestra preferencia por HDAC1 y HDAC2

respecto a HDAC3 y no parece inhibir apreciablemente HDAC8 (Hu et al., 2003; Vannini et al., 2004; Inoue et al., 2006) sugiriendo que HDAC1 o HDAC2 de la clase I son el blanco crítico de MS-275 para mejorar la memoria.



**Figura 3. La actividad neuronal induce la acetilación de histonas.** La parte izquierda de la figura muestra cómo las señales de actividad neuronal al núcleo inducen modificaciones epigenéticas que sostienen el aprendizaje y la memoria. La parte de la derecha esquematiza dos vías experimentalmente investigadas que inducen tales modificaciones epigenéticas en términos de acetilación de histonas. Una de estas vías, representada en el lado izquierdo del recuadro, muestra cómo la actividad neuronal, en términos de potenciación a largo plazo (LTP) y el aprendizaje pueden activar a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o los receptores NMDA y activar diferentes cascadas de señalización que culminan en la acetilación de histonas y la expresión de genes necesarios para el establecimiento de estos procesos. Tomado de Gráff and Tsai, 2013.

#### 4. El condicionamiento de aversión a los sabores

La supervivencia de un organismo está basada entre otras cosas en la capacidad de aprender y recordar que un alimento ingerido fue seguido de un malestar, anticipando de esta forma el potencial dañino de cualquier alimento que tenga atributos similares y evitando su consumo. El condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) es un paradigma ampliamente utilizado para el estudio de procesos de memoria y aprendizaje. En esta tarea un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo cuando es asociado con malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni, 2014; Bertrand et al., 2009). John García describió por primera vez en 1955, que las ratas desarrollaban aversión a soluciones con sabor dulce cuando estas eran seguidas por la aplicación de rayos gamma. Posteriormente surgió un paradigma obtenido por el apareamiento de un sabor y un estímulo que producía malestar gástrico, como el cloruro de litio (LiCl), fue entonces cuando a este paradigma se le llamo condicionamiento de aversivo a los sabores (García y Koellin, 1966). García y Koellin demostraron que una solución con sabor se asocia más fácilmente a la inducción de náusea que a la aplicación de choques eléctricos en las patas de los roedores, lo cual nos muestra que, en este condicionamiento donde el estímulo condicionado es el sabor, es importante que el estímulo aversivo sea visceral. Una de las características más importantes del CAS es su selectividad a los estímulos gustativos, ya que un solo entrenamiento basta para producir una fuerte aversión ante un sabor novedoso (Berstein, 1991). Una característica importante del CAS es que la asociación entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado está mediada por tiempos bastante amplios desde minutos

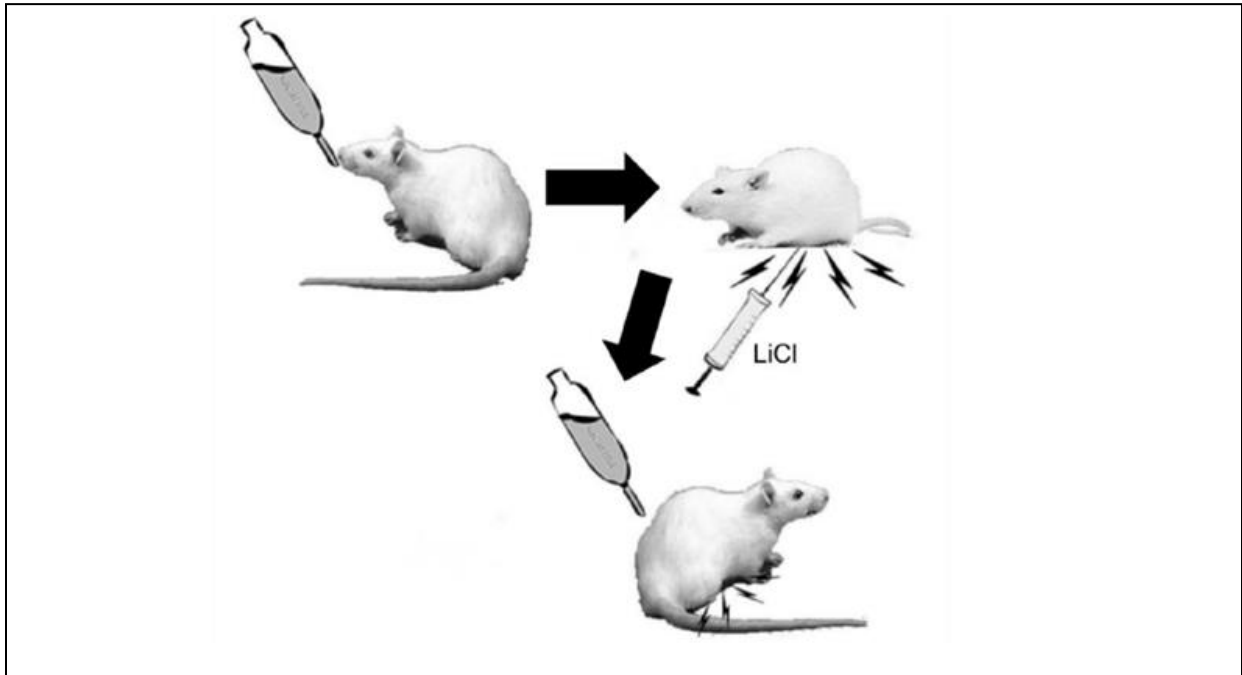
hasta horas (Bures, 1998). Esta característica facilita el estudio de los diferentes procesos subyacentes al CAS: rastro de memoria gustativa, asociación entre estímulo gustativo y malestar, y consolidación de memoria de largo plazo (Bermúdez-Rattoni y Miranda 2004).

Los principios generales del condicionamiento de aversión a los sabores son:

a) Si un animal consume un alimento con sabor y subsecuentemente sufre malestar gástrico, en los siguientes encuentros con ese sabor el animal evitará o disminuirá drásticamente su consumo (García, Lasiter, Bermúdez-Rattoni y Deems, 1985).

b) La fuerza de la aversión aprendida está directamente relacionada con la intensidad del sabor y del malestar, y está inversamente relacionada al intervalo entre la presentación del sabor y la inducción de malestar. Este intervalo puede durar horas, a diferencia de otros condicionamientos, en los cuales es necesario que el intervalo entre el EC y el EI sea de segundos (Domjan, 1985).

c) Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (García y Koelling, 1966).



**Figura 4.** El CAS es un tipo de condicionamiento, donde el sabor sirve como estímulo condicionado y el malestar gástrico como estímulo incondicionado, de modo que un estímulo gustativo adquiere la capacidad de inducir una respuesta condicionada (RC). Los animales pueden aprender el CAS si la solución con sabor es ingerida espontáneamente, pero también presentan el aprendizaje de la tarea cuando el estímulo aversivo es inyectado por vía intraperitoneal o intravenosa (Bradley y Mistretta, 1971; Bures y Buresova, 1989).

El CAS es una tarea de aprendizaje que requiere la formación de un trazo de memoria aversiva mediante la asociación de dos estímulos que son relacionados en la CI. En primer lugar, se encuentra el estímulo gustativo, el cual activa la vía gustativa hasta su relevo final en la CI para la formación del trazo de memoria gustativa de tipo "seguro". En segundo lugar, se encuentra el estímulo aversivo, el cual activa a la CI a través de la amígdala para la formación de un trazo de memoria gustativa de tipo "aversivo" (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Para la formación del trazo de memoria gustativa de tipo seguro, se ha propuesto que el estímulo gustativo incrementa los niveles de acetilcolina en la CI, proveniente de la conexión de esta

corteza con el núcleo basalis magnocelularis (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). La acetilcolina activa a receptores de tipo muscarínicos en la CI, los cuales promueven la activación de la PKC, la cual tiene injerencia en la modulación de los receptores NMDA y en la activación de otras cinasas como la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Por otro lado, con respecto a la formación del trazo de memoria gustativa de tipo aversivo, se ha observado que el malestar gástrico incrementa los niveles de glutamato en la CI debido a la activación de la vía amígdalo-cortical, lo cual promueve la entrada de calcio al interior de las neuronas en dicha corteza, iniciando cambios plásticos dependientes de la actividad (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Actualmente, se considera que la conjunción de los mecanismos del trazo gustativo y del trazo aversivo en la CI activan diferentes proteínas relacionadas con la plasticidad como la PKC o la PKA, que son parte de una cadena molecular que culmina con la activación de factores de transcripción como CREB, los cuales promueven la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con el mantenimiento de la memoria del CAS (Yasoshima, Morimoto y Yamamoto, 2000; Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005).

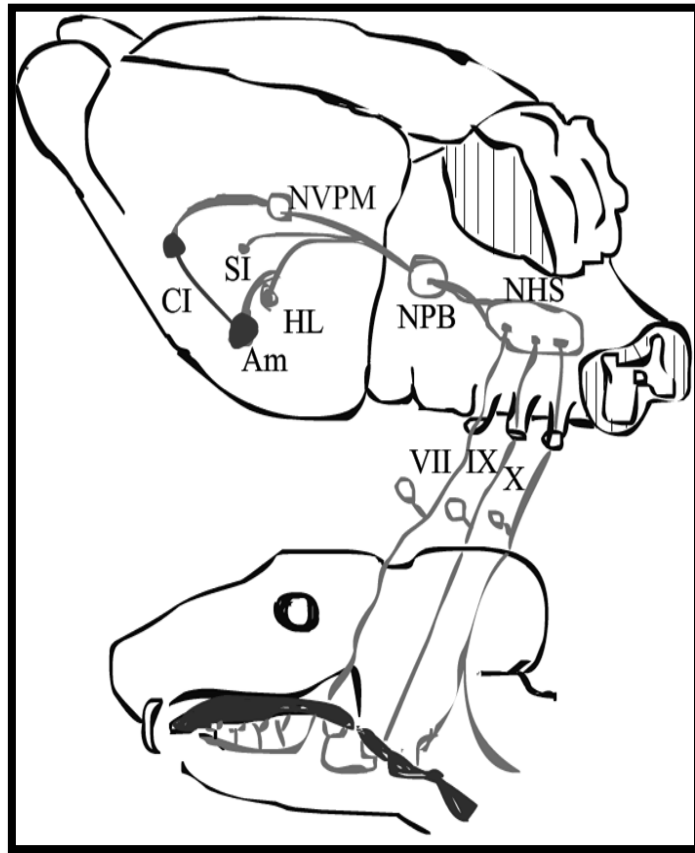
## **5. La corteza insular y la vía gustativa**

La corteza insular (CI) es una región de la corteza temporal en el cerebro de rata que ha sido implicada en la adquisición y almacenamiento de diferentes tareas de aprendizaje aversivo como el laberinto espacial, la evitación inhibitoria y el

condicionamiento de aversión al sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). La CI recibe proyecciones directas desde el núcleo basolateral de la amígdala y se conoce que esta proyección contribuye a la formación y retención de memorias gustativas (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Rodríguez-Duran et al, 2011). Las conexiones anatómicas de la corteza insular claramente sugieren que esta región cerebral juega un papel en la integración y posiblemente en el almacenamiento de información visceral (Bures et al., 1998). La CI recibe información visceral y gustativa desde el tálamo y envía proyecciones directas al núcleo del tracto solitario. La CI también tiene conexiones con estructuras límbicas, incluyendo la amígdala, el núcleo dorso medial del tálamo y la corteza prefrontal medial (Bermúdez-Rattoni et al., 1991). Los vertebrados detectamos los sabores por medio de la activación de células quimiorreceptoras las cuales responden a moléculas o iones que están disueltos en la saliva. Estas células, junto con células basales y de soporte forman las yemas gustativas. Éstas son consideradas los órganos sensoriales del sentido del gusto. Tanto en el humano como en la rata, la ubicación de las yemas gustativas dentro de la cavidad oral se observa en pequeñas protuberancias del epitelio de la lengua denominadas papilas. Por su forma, se pueden distinguir tres tipos de papilas gustativas distribuidas en la lengua: circunvaladas, foliadas y fungiformes. Es relevante mencionar que tanto el paladar como la faringe, epiglotis y parte superior del esófago presentan yemas gustativas, pero solo las yemas que se encuentran en la lengua están agrupadas en papilas (Bear, 1996). Inicialmente el sabor es detectado por los receptores gustativos y es transmitido hacia la porción anterior del núcleo del tracto solitario en el tallo cerebral, a través de los nervios craneales: facial (VII), glossofaríngeo (IX) principalmente, y de manera secundaria el nervio vago (X) que llevan la información

de las yemas gustativas (Witt y Reutter, 1998). El nervio facial lleva información de las papilas fungiformes que se encuentran en la parte anterior de la lengua, así como de las yemas gustativas localizadas en el paladar y en el conducto nasoincisor. Por su parte, el nervio glossofaríngeo lleva información de las papilas foliadas y circunvaladas que se encuentran en la parte posterior de la lengua, mientras que el nervio vago lleva información de las yemas gustativas de la epiglotis laringe y esófago. Por otra parte, el nervio trigémino inerva la periferia de las yemas gustativas y transmite información somatosensorial, de textura y temperatura de los alimentos (Witt y Reutter, 1996). El segundo relevo del estímulo gustativo se ubica en el núcleo parabraqueal del puente, en lo que se ha denominado área gustativa del puente. A partir de esta estructura se siguen dos vías, las aferencias del núcleo parabraqueal del puente se dirigen en su mayoría a estructuras ventrales del cerebro basal, como son la amígdala, el hipotálamo y la sustancia innominada, la segunda vía se dirige al complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la corteza insular (Travers, 1993). Cabe destacar que el núcleo del tracto solitario recibe aferencias que son originarias del área hepática del vago, así como señales del área postrema y del sistema vestibular. Estas señales proveen información relacionada con irritación gástrica (Yamamoto et al., 1992). De la misma manera se debe considerar las conexiones recíprocas entre la CI y la amígdala, esta última relacionada con tareas aversivas como el condicionamiento del miedo y conductas agresivas (McGaugh et al., 1991; Le Doux, 1993). A partir de la conectividad de la CI ha sido posible considerarla una estructura fundamental en los procesos de integración y almacenamiento de información gustativo-visceral (Kiefer, 1985; Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991).





**Figura 5.** Vías aferentes gustativas en rata. VII, nervio facial; IX, nervio glossofaríngeo; X, nervio vago; NHS, núcleo del tracto solitario; NPB, núcleo parabraquial del puente; NVPM, núcleo ventroposteromedial del tálamo; CI, corteza insular, SI, sustancia innominada; HL, hipotálamo lateral; Am, amígdala. (Bear et al., 2001).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria, amplían la comprensión acerca del cómo se almacena la información en el sistema nervioso. Numerosas evidencias experimentales indican que la consolidación de la memoria involucra cambios en la síntesis de proteínas y de ARNm. En este contexto, el empleo de fármacos como el DRB que inhibe la síntesis de ARNm, resulta fundamental en el análisis de la participación de este mecanismo en los procesos de aprendizaje y memoria. La regulación de la expresión génica derivada de la actividad neuronal durante los procesos de aprendizaje y memoria involucra modificaciones epigenéticas, entre las cuales destaca la acetilación de histonas. Evidencias experimentales demuestran la participación de la acetilación de histonas en la consolidación de la memoria dependiente de hipocampo. La acetilación de histonas es un mecanismo que facilita el proceso de transcripción y consecuentemente la traducción. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que la consolidación de la memoria es dependiente de una fase de síntesis de nuevas proteínas en la corteza insular. Sin embargo, aún no se ha explorado la participación de la síntesis de nuevo ARNm y la acetilación de histonas en esta región neocortical. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la inhibición de la síntesis de ARNm en la CI así como la inhibición de histonas deacetilasas, durante la adquisición del condicionamiento de aversión a los sabores analizando así la relevancia de estos procesos en el establecimiento de la memoria de largo plazo en áreas neocorticales.

## **V. OBJETIVOS**

### **General**

Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de ARNm y de histonas deacetilasas de la clase I en la corteza insular sobre la consolidación de la memoria de aversión a los sabores.

### **Particulares**

- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de ARNm mediante la microinfusión de DRB en la CI sobre la consolidación de la memoria de aversión al sabor.
- Analizar el efecto de la inhibición de HDAC (clase I) mediante la microinfusión de MS-275 en la CI sobre la consolidación de la memoria de aversión al sabor.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **1. Sujetos experimentales**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso entre 350-380gr, alojadas en cajas individuales de policarbonato, en un ciclo de luz-obscuridad 12h/12h a una temperatura promedio de 21°C, con comida y agua ad libitum (excepto donde se especifique lo contrario), los sujetos fueron sometidos a un periodo de habituación a las condiciones de bioterio durante una semana.

### **2. Canulación**

Las cirugías se efectuaron por métodos estereotáxicos convencionales. Los animales fueron implantados bilateralmente con cánulas de acero inoxidable de calibre 23 de 1 cm de largo bajo anestesia (Pentobarbital, 50ml/kg i.p.) en las coordenadas AP= +1.2mm, ML=  $\pm$ 5.5mm, DV= 4,5mm (Paxinos et al., 2007). Las puntas de las cánulas guía fueron colocadas 2mm por encima de la CI bilateralmente y se fijaron con acrílico dental de secado rápido. Dentro de las cánulas se colocó un estilete para evitar su obstrucción. Los fármacos fueron administrados por agujas de calibre 30 alcanzando la CI a través de las cánulas previamente implantadas. Microinyectores se conectaron por tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l conducidas por una bomba de microinfusión (ColeParmer Co). Las microinyecciones fueron dosificadas a una

velocidad de 1 1µl/min dejando 1 minuto más el inyector para asegurar la difusión del fármaco o vehículo.

### **3. Condicionamiento de aversión a los sabores**

Tras una semana de recuperación de la cirugía de canulación los animales fueron entrenados en el condicionamiento de aversión al sabor (CAS). Las ratas fueron privadas de agua por 24 hrs y tras este tiempo habituadas a beber agua durante 10 minutos dos veces al día (09.00hrs y 17:00hrs) hasta establecer una línea base de consumo (3 días). En el día de adquisición (4° día) las ratas fueron privadas de alimento y el agua se sustituyó por un sabor novedoso (solución de sacarina 1%, sigma, St. Louis, MO, USA), 10 minutos después del consumo de agua, se les administro vía intraperitoneal solución de cloruro de litio (LiCl) (0.2M o 0.1M, dependiendo de la condición del grupo experimental; 9.37mg/kg), con la finalidad de inducirles malestar gástrico fuerte o débil. Posterior al día de adquisición se restableció la línea base de consumo de agua (3 días). Una vez restablecida la línea base de consumo de agua, esta se sustituyó nuevamente por solución de sacarina para probar la aversión. La diferencia en el consumo de sacarina entre la prueba de aversión y el día de adquisición es usada como medida de la aversión.

#### **4. Histoquímica de Nissl**

Tras los experimentos los cerebros de los animales fueron analizados mediante tinción histoquímica de Nissl con la finalidad de observar que las cánulas implantadas se localizaran sobre la corteza insular. Para esto, las ratas fueron perfundidas a través del ventrículo izquierdo (perfusión trascardiaca) con 500 ml de solución salina al 9%, seguido de 400 ml de solución fijadora: buffer de fosfatos (PBS), paraformaldehído (4%) y glutaraldehído (.2%). Los cerebros fueron entonces transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS 0.1M (pH 7.4) en la cual se mantiene a 4°C durante 48 horas. Secciones coronales de 40 µm fueron colectadas en amortiguador de fosfatos tras su obtención por microtomo de congelación (LEICA RM 2000R). Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz.

#### **5. Análisis de Datos**

El análisis de los datos generados durante los experimentos conductuales se efectuó a través de ANOVA factorial y la prueba post-hoc de Fisher para analizar las diferencias particulares entre los grupos.

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar los efectos de la inhibición de la síntesis de ARNm y la inhibición de histonas deacetilasas de la clase I en la corteza insular sobre la consolidación de la memoria de aversión al sabor, los sujetos fueron asignados a los siguientes grupos:

- **Grupo DRB (DRB0 n=7):** Los sujetos se sometieron a la cirugía de canulación como se describió previamente y tras 7 días de recuperación fueron entrenados en el CAS, durante la adquisición, inmediatamente después de la administración de LiCl recibieron una microinfusión del inhibidor de las síntesis de ARNm DRB disuelto en PBS-DMSO al 8% como vehículo (40 ng/ 1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min; Sigma-Aldrich; Martínez- Moreno, 2013; Torres-García, 2012; Hagena y Manahan-Vaughan, 2013) en la CI con el fin de inhibir la síntesis de ARNm. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

- **Grupo Vehículo-DRB (VEH0h n=7):** De manera similar al grupo anterior los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la adquisición, inmediatamente después de la administración de LiCl recibieron una microinfusión de PBS-DMSO como vehículo (1 $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min) en la CI. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

- **Grupo MS-275 (CASf-MS, n=8):** Los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la adquisición, inmediatamente después de la administración de LiCl (0.2M), recibieron una microinfusión del inhibidor de histonas deacetilasas de la clase I (MS-275) disuelto en DMSO-salina como vehículo

(750 ng/ 1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min; Bahari-Javan et al., 2012) en la CI con la finalidad de inhibir las histonas deacetilasas. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

- **Grupo Vehículo/ MS-275 (CASf-VEH, n=7):** De manera similar al grupo anterior los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la adquisición, inmediatamente después de la administración de LiCl (0.2M) recibieron una microinfusión de DMSO-salina, como vehículo (1 $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min). Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

Diversas evidencias experimentales han mostrado efectos de fortalecimiento de la memoria cuando los animales son entrenados en tareas que derivan en la formación de una memoria débil. Con el propósito de evaluar si la inhibición de histonas deacetilasas de la clase I facilita la consolidación de la memoria de un condicionamiento débil se analizaron los siguientes grupos:

- **Grupo MS-275 CAS DÉBIL (CASd-MS0h, n=8):** Los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la adquisición, inmediatamente después de la administración de LiCl (0.1 M, Martínez Moreno et al., 2016), recibieron una microinfusión de MS-275 disuelto en DMSO-salina como vehículo (750 ng/ 1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min; Bahari-Javan et al., 2012) en la CI con la finalidad de inhibir las histonas deacetilasas. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

- **Grupo Vehículo/ MS-275 CAS DÉBIL (CASd-VEH0h, n=8):** De manera similar al grupo anterior los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la adquisición, inmediatamente después de la



administración de LiCl (0.1M) recibieron una microinfusión del vehículo DMSO-Salina, (1µl; 1 µl/min). Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

Por otro lado, con el fin de explorar si la inhibición de la síntesis de ARNm es requerida en una ventana temporal más amplia tras la adquisición del CAS, y considerando que estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que 7 horas después de la adquisición de esta tarea se requiere de síntesis proteica (Martínez Moreno et al., 2011), se evaluaron los siguientes grupos:

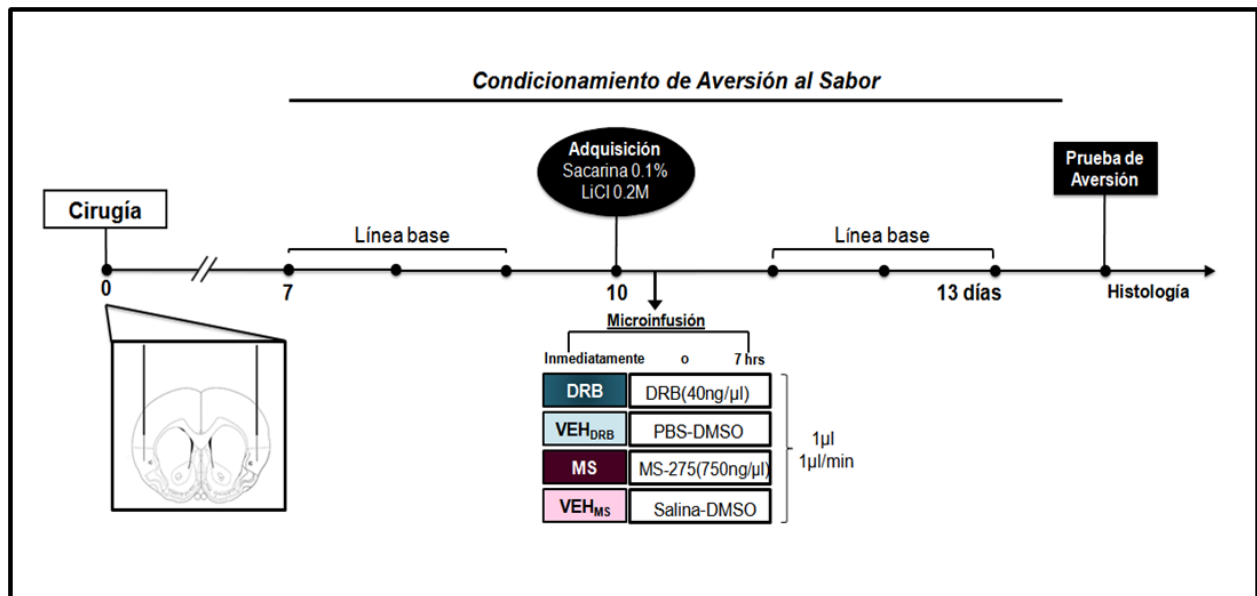
- **Grupo DRB ventana temporal 7 hrs (DRB7h, n=7):** Los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación como se describió previamente y tras 7 días de recuperación se entrenaron en el CAS, durante la sesión de adquisición, 7 horas después de la administración de LiCl (Martínez Moreno et al., 2011) recibieron una microinfusión de DRB disuelto en PBS-DMSO al 8% como vehículo (40 ng/ 1 µl; 1 µl/min; Sigma-Aldrich; Martínez- Moreno, 2013; Torres-García, 2012; Hagen y Manahan-Vaughan, 2013) en la CI con el fin de inhibir la síntesis de ARNm. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

- **Grupo Vehículo-DRB Ventana temporal 7 hrs (VEH7h, n=8):** De manera similar al grupo anterior los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la sesión de adquisición, 7 horas después de la administración de LiCl recibieron una microinfusión de PBS-DMSO como vehículo (1µl; 1 µl/min) en la CI. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

De la misma manera se exploró si la inhibición de deacetilasas de histonas de la clase I es requerida en una ventana temporal más amplia tras la adquisición de un CAS débil, con este fin se evaluaron los siguientes grupos:

- **Grupo MS-275 CAS DÉBIL 7 h (CASd-MS7h, n=7):** Los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la sesión de adquisición, 7 horas después de la administración de LiCl (0.1 M, Martínez Moreno et al., 2016), recibieron una microinfusión de MS-275 disuelto en DMSO-Salina como vehículo (750 ng/ 1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min; Bahari-Javan et al., 2012) en la CI con la finalidad de inhibir las histonas deacetilasas de la clase I. Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.

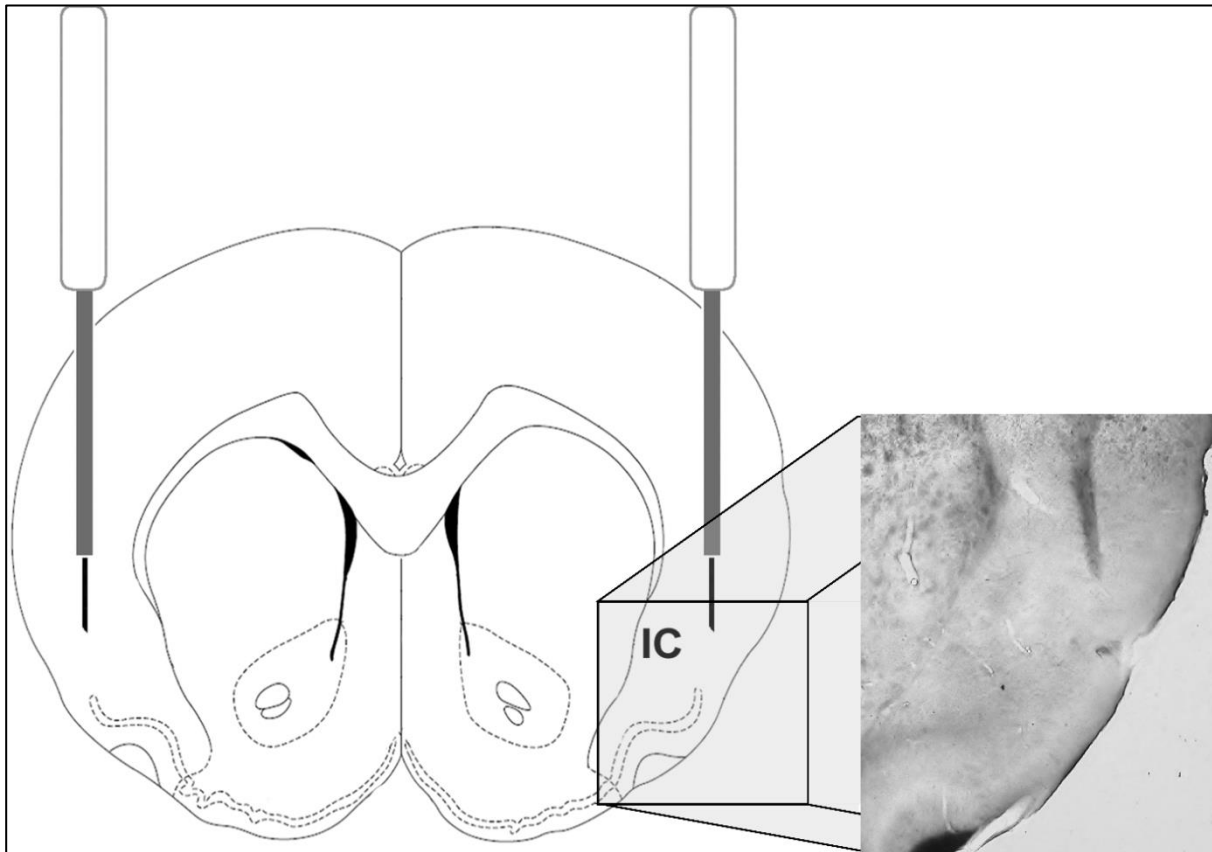
- **Grupo Vehículo/ MS-275 CAS DÉBIL 7 h (CASd-VEH7h, n=7):** De manera similar al grupo anterior los sujetos fueron sometidos a la cirugía de canulación y al entrenamiento en el CAS, durante la sesión de adquisición, 7 horas después de la administración de LiCl (0.1M) recibieron una microinfusión del vehículo DMSO-Salina, (1 $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min). Tres días después se evaluó su efecto en la prueba de aversión.



**Figura 6.** Esquema general representativo del procedimiento experimental

## VII. RESULTADOS

### 1) Histológicos



**Figura 7. Ubicación de los inyectores en la corteza insular.** Corte coronal representativo procesado con tinción de Nissl donde se aprecia la posición del inyector en la corteza insular (CI).

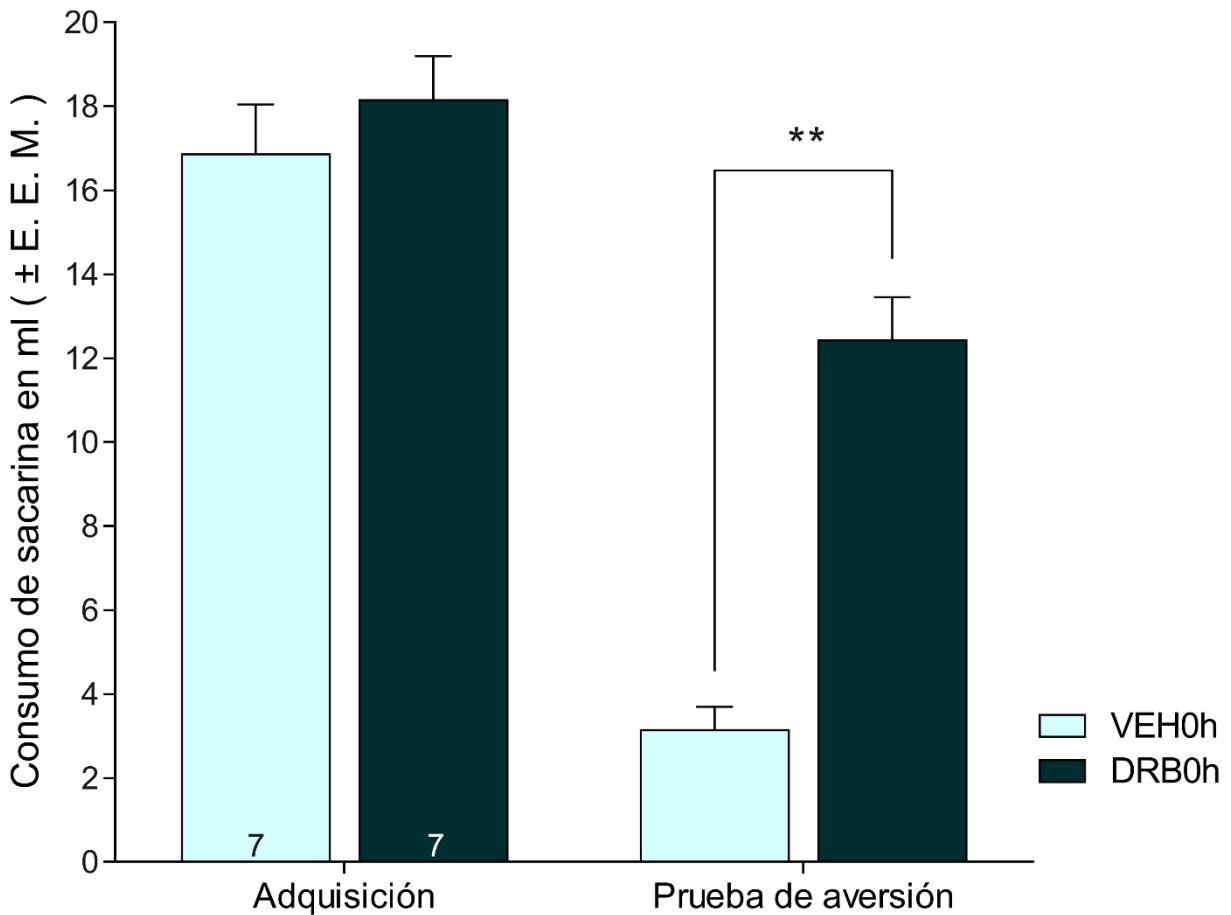
## 2) Conductuales

No se observaron diferencias significativas entre los diez grupos durante el consumo basal de agua ni durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. El promedio de consumo de agua, en mililitros, durante la línea base ( $\pm$  E. E. M.) fue de  $16.5 \pm 0.73$ ,  $17.8 \pm 1.81$ ,  $16.44 \pm 1.31$ ,  $15 \pm 0.91$  para los grupos VEH0h, DRB0h, VEH7h, DRB7h y  $16.63 \pm 0.68$ ,  $15.57 \pm 1.49$ ,  $16.75 \pm 0.86$ ,  $15.5 \pm 1.12$ ,  $14.86 \pm 0.60$ ,  $17.76 \pm 0.42$  para los grupos CASf-MS, CASf-VEH, CASd-VEH0h, CAS+d-MS0h, CASd-VEH7h, CASd-MS7h. Por otro lado, los promedios de consumo de sacarina (en ml) durante la sesión de adquisición fueron los siguientes:  $16.86 \pm 1.18$ ,  $18.14 \pm 1.05$ ,  $16.25 \pm 0.67$ ,  $16.14 \pm 0.73$  para los grupos VEH0h, DRB0h, VEH7h, DRB7h y  $17.25 \pm 0.79$ ,  $19 \pm 0.81$ ,  $18.25 \pm 0.72$ ,  $17.5 \pm 1.08$ ,  $18.14 \pm 0.59$ ,  $17.14 \pm 0.63$  para los grupos CASf-MS, CASf-VEH, CASd-VEH0h, CASd-MS0h, CASd-VEH7h, CASd-MS7h.

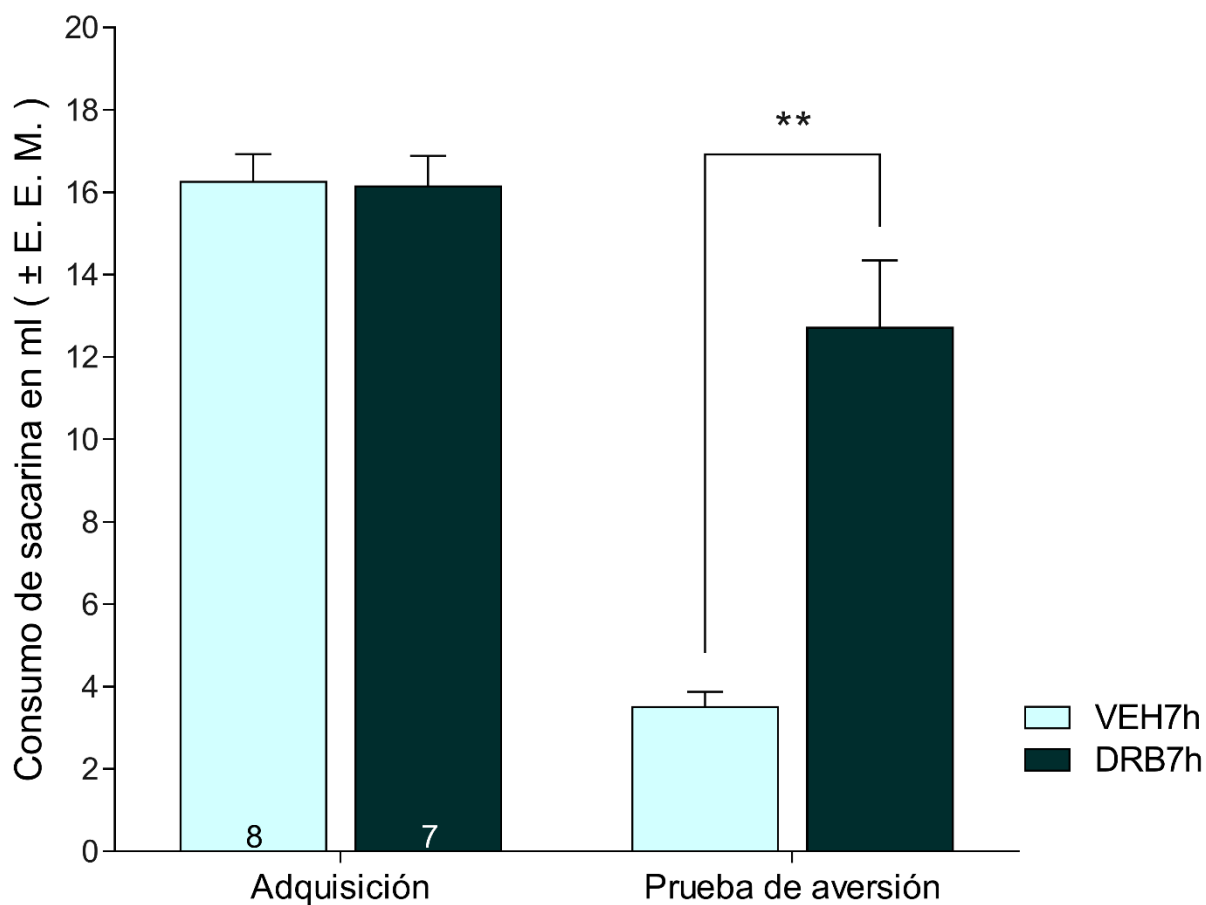
### 2.1 La consolidación de la memoria del CAS requiere síntesis de nuevo ARNm inmediatamente y 7 h después de la adquisición de esta memoria

Los grupos que recibieron una microinfusión intracortical de DRB muestran un deterioro significativo de la consolidación de la memoria del CAS. El ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas para el consumo de sacarina durante la prueba de aversión en los grupos tratados con DRB ( $F_{3,25} = 22.46$ ,  $p < 0.001$ ). El análisis post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas de los grupos DRB0h y DRB7h en comparación con los

grupos control (VEH0h y VEH7h) ( $p < 0.001$ ) (Figura 8 y 9). Estos resultados revelan que la consolidación de la memoria del CAS requiere síntesis de nuevo ARNm inmediatamente y 7 h después de la adquisición de esta memoria.



**Figura 8. La inhibición de ARNm en la corteza insular inmediatamente después de la adquisición del CAS deteriora la consolidación de esta memoria. Los animales recibieron una microinfusión de PBS-DMSO al 8% como vehículo (1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min) y una microinfusión de DRB (40 ng/ 1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min) 10 minutos después de la adquisición del CAS. \*\*<math>0.001</math>.**

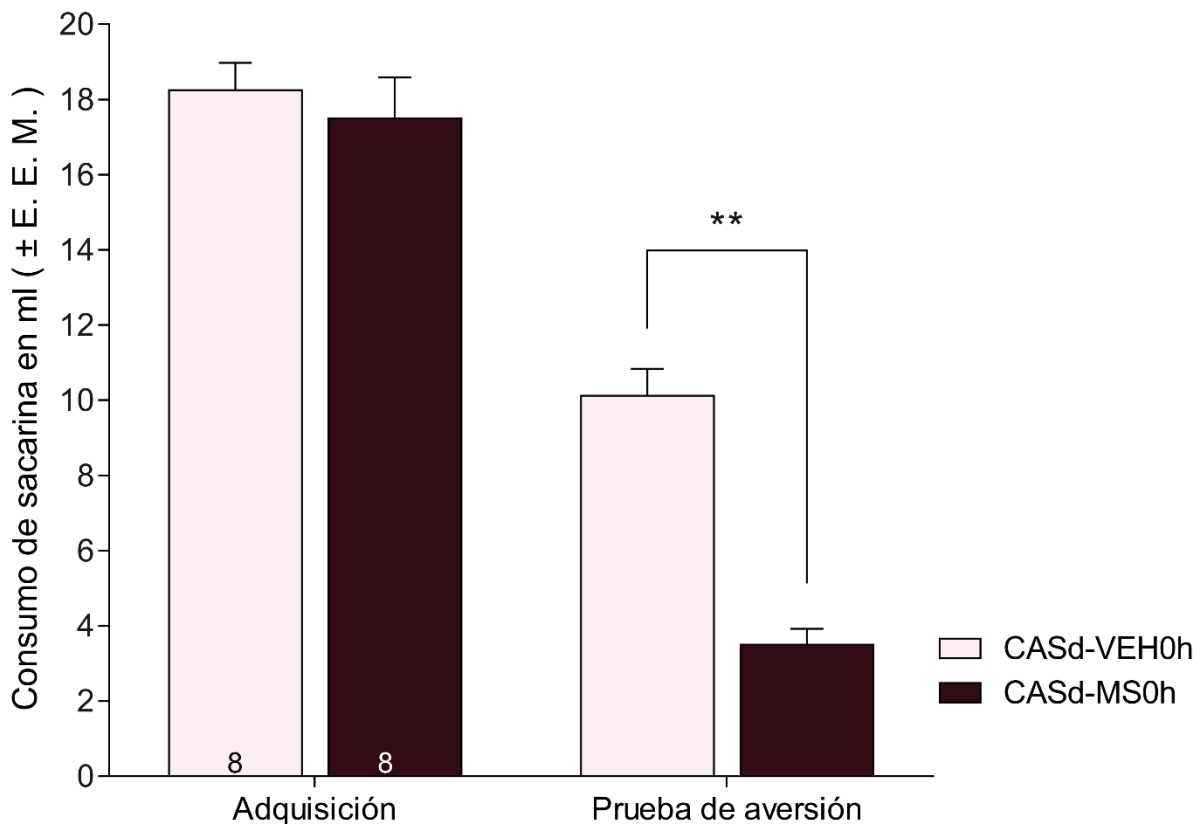


**Figura 9. La inhibición de la síntesis de ARNm en la corteza insular 7 horas post-adquisición deteriora la consolidación de la memoria de aversión al sabor.** Los animales recibieron una microinfusión de PBS-DMSO al 8% como vehículo (1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min) y una microinfusión de DRB (40 ng/ 1  $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min) 7 horas después de la adquisición. \*\*<0.001.

## 2.2 La inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I fortalece la memoria de un CAS débil transformándolo en uno fuerte

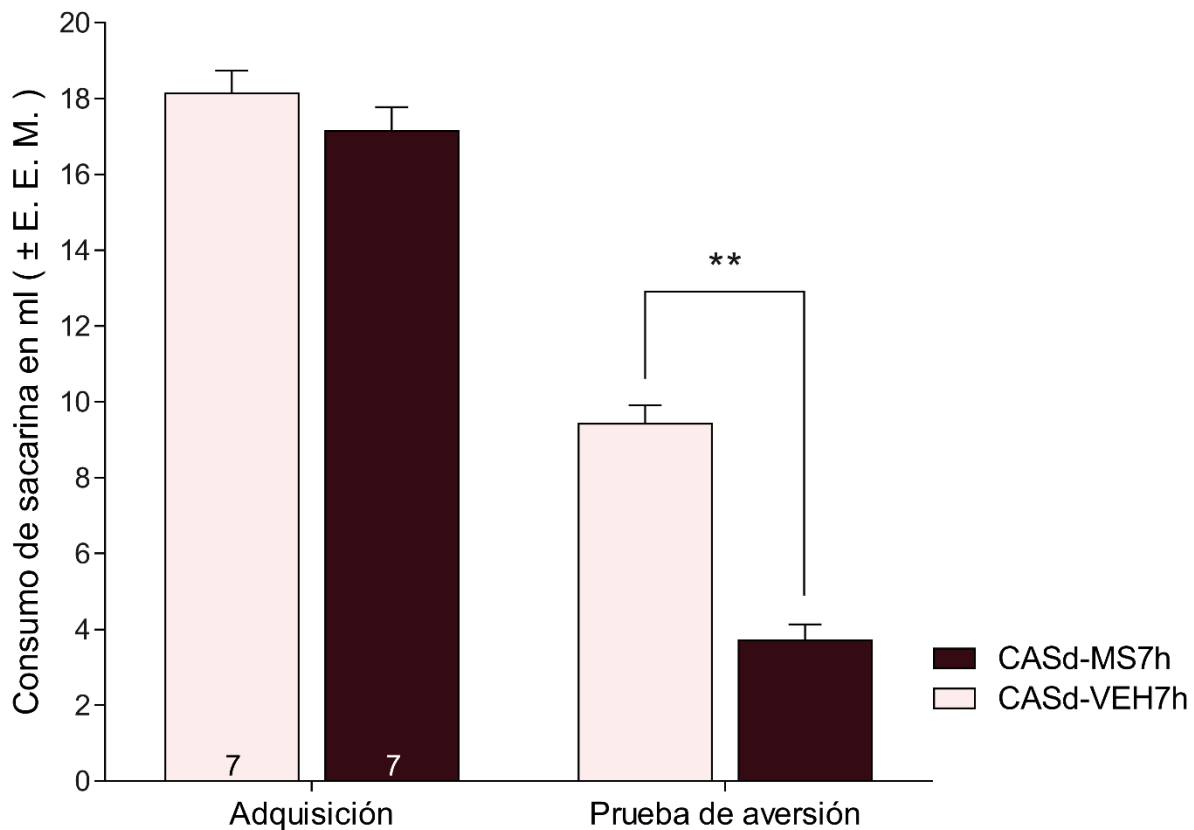
Por su parte la inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I fortalece la memoria de un CAS débil convirtiéndolo en uno fuerte. El ANOVA de dos vías reveló diferencias

significativas para el consumo de sacarina durante la prueba de aversión cuando los animales fueron entrenados en un CAS débil ( $F_{3,29} = 10.87, p < 0.001$ ). El análisis post-hoc de Fisher reveló diferencias significativas entre el grupo CASd-VEH0h y CASd-MS0h, así como entre el grupo CASd-VEH7h y CASd-MS7h ( $p < 0.001$ ) (Figuras 10 y 11), en tanto que los grupos CASd-MS0h y CASd-MS7h no muestran diferencias entre sí. Estos resultados revelan que la inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I fortalece la memoria de un CAS débil convirtiéndolo en uno fuerte.



**Figura 10. La inhibición de histonas deacetilasas de la clase I con MS-275 en la corteza insular fortalece la memoria en un CAS débil.** Los animales recibieron una microinfusión de MS-275 (750 ng/ $\mu$ l, 1 $\mu$ l/min) en la corteza insular y DMSO-salina, como vehículo (1 $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min). \* $< 0.001$ .



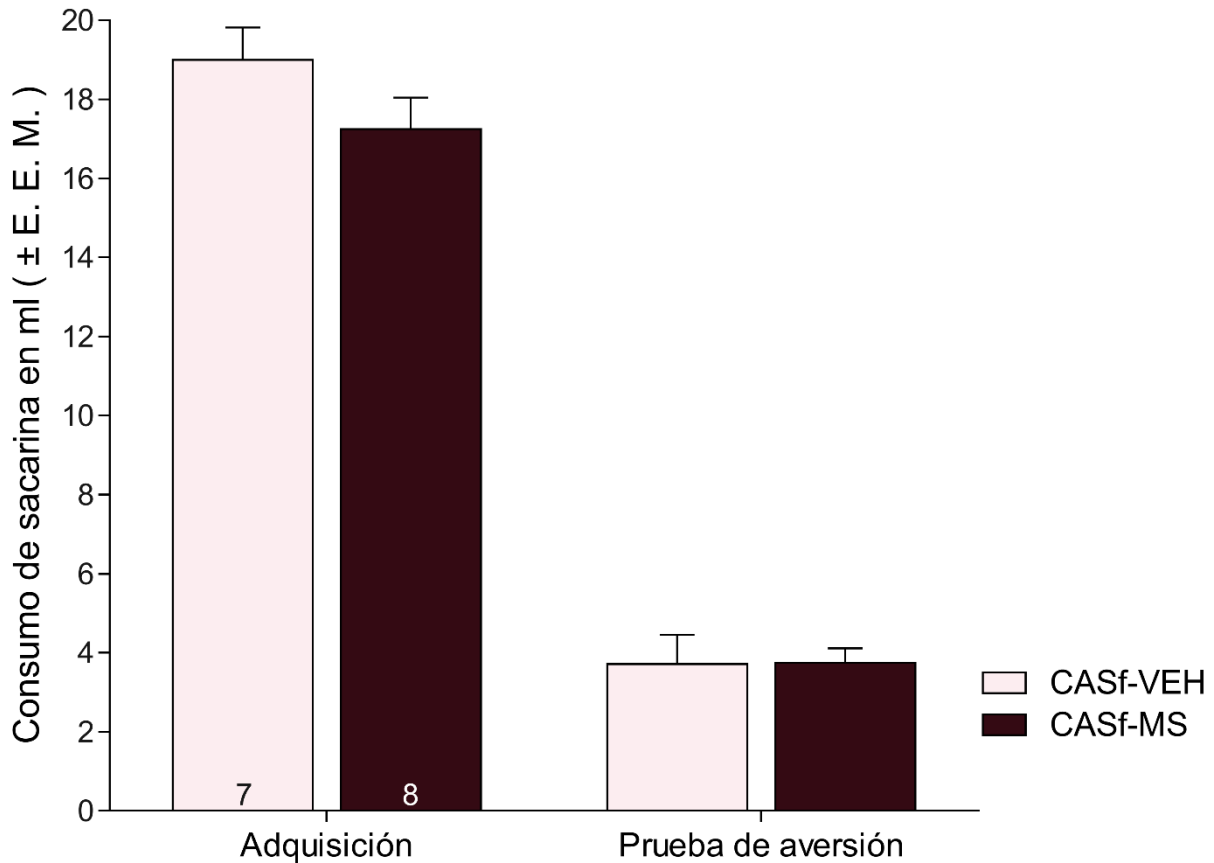


**Figura 11. La inhibición de las deacetilasas de histonas de la clase I con MS-275 en la corteza insular 7 horas post-adquisición fortalece la memoria en un CAS débil.** Los animales recibieron una microinfusión de MS-275 (750 ng/μl, 1μl/min) en la corteza insular y DMSO-salina, como vehículo (1μl; 1 μl/min). \* <

### 2.3 La inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I en la corteza insular no fortalece la memoria en un CAS fuerte

El ANOVA de dos vías no reveló diferencias significativas para el consumo de sacarina durante la prueba de aversión cuando los animales fueron entrenados en un CAS fuerte ( $F_{1, 13} = 2.29, p = 0.15$ ) probablemente debido a un efecto de piso en la expresión de

aversión ante un CAS fuerte. El análisis post-hoc de Fisher no mostró diferencias significativas durante la prueba de aversión entre los grupos CASf-VEH y CASf-MS ( $p = 0.97$ ) (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de la inhibición de deacetilasas de histonas con MS-275 en la corteza insular.** Los animales recibieron una microinfusión de MS-275 (750 ng/ $\mu$ l, 1 $\mu$ l/min) en la corteza insular y DMSO-Salina, como vehículo (1 $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min).

## VII. DISCUSIÓN

La memoria puede transitar hacia una fase de mayor estabilidad y permanencia a través del proceso de consolidación (Abraham y Robins, 2005; Dudai, 2012). Este proceso requiere de la inducción de expresión génica y la síntesis de proteínas (Alberini y Kandel, 2015; McGaugh, 2000). En este sentido, una amplia evidencia experimental ha mostrado que la consolidación de la memoria requiere de síntesis de proteínas en el momento del entrenamiento o durante las primeras horas tras la adquisición (Alberini y Kandel, 2015; Bekinschtein et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2011; McGaugh, 2000). Del mismo modo, algunos estudios también han mostrado que la consolidación de la memoria de largo plazo es sensible a la inhibición de la síntesis de ARNm (Alberini y Kandel, 2015; Duvarci, 2008; Da Silva, 2008). En este sentido, Igaz y colaboradores mostraron previamente que se necesitan al menos dos oleadas de transcripción en el hipocampo para establecer una memoria de evitación inhibitoria a largo plazo. La primera alrededor del tiempo de entrenamiento y la segunda entre las 3 y las 6 horas posteriores al mismo (Igaz et al., 2002). Los resultados del presente estudio revelan que la consolidación de la memoria del CAS requiere al menos dos oleadas de transcripción en la CI, una inmediatamente después y otra 7 horas tras la adquisición de esta tarea.

El efecto amnésico del DRB en las dos ventanas temporales observadas en el presente estudio coincide con las encontradas en estudios previos de nuestro laboratorio empleando anisomicina para evaluar el requerimiento de la síntesis de proteínas (Moguel-González et al., 2008; Martínez-Moreno et al., 2011), sugiriendo que durante la formación de la memoria del CAS, las dos ventanas dependientes de la síntesis de

proteínas en la CI dependen, al menos en parte, de nuevo ARNm sintetizado como consecuencia de regulación transcripcional. Estos resultados respaldan la noción de que se requieren rondas recurrentes de eventos de consolidación para la persistencia de la memoria de largo plazo (Martinez-Moreno et al., 2011; Igaz et al., 2002).

Hallazgos previos indican que los tratamientos pueden ser considerados como una nueva fuente de información que se asocia con la memoria activa y se convierte en parte de ella. Cuanto más corto es el intervalo entrenamiento-tratamiento amnésico, más se asocia la codificación posterior con la adquisición (Gisquet-Verrier y Riccio, 2018), en tanto que la mejora en la memoria, disminuye a medida que aumenta el intervalo entrenamiento-tratamiento (Gold y Van Buskirk 1975; McGaugh 1966). Los resultados del presente estudio no muestran diferencias significativas entre un intervalo amplio y uno cercano al tratamiento, disminuyendo así la probabilidad de que el efecto observado se deba a la interferencia mencionada, no obstante, experimentos futuros harán posible explorar sistemáticamente esta posibilidad.

Hay evidencia creciente de que la regulación de la transcripción génica a través de mecanismos epigenéticos, como las modificaciones de histonas y la metilación del ADN juega un papel crucial en la consolidación de la memoria de largo plazo y la plasticidad sináptica asociada a este proceso (Levenson y Sweatt, 2005; Barrett y Wood, 2008). En este sentido, se sabe que los cambios en la acetilación de histonas son cruciales para la consolidación de la memoria del miedo y la plasticidad sináptica en la amígdala lateral (Monsey et al., 2011). Así, la administración de inhibidores de HDAC favorece la acetilación de histonas y en consecuencia mejora la expresión génica neuronal, facilitando la plasticidad sináptica y la formación de la memoria de largo plazo de

diversas tareas conductuales (Bredy y Barad, 2008). Como mencionamos en líneas anteriores, las HDAC y los complejos correpresores asociados pueden funcionar en las neuronas, en parte, como "frenos moleculares". Por lo tanto, la inhibición de HDAC elimina estos "frenos moleculares" permitiendo así la consolidación de la memoria de largo plazo (McQuown y Wood, 2011).

En concordancia con lo anterior, el presente trabajo muestra que la facilitación de la expresión génica a través de la inhibición de las HDAC de la clase I en la CI fortalece la memoria del CAS, permitiendo que un entrenamiento que normalmente produce una forma débil de esta tarea genere una forma fuerte. Además, cuando los animales fueron entrenados en un protocolo de CAS fuerte, la inhibición de las HDAC de la clase I no fortaleció aún más la memoria del CAS, sugiriendo un probable efecto homeostático protector de la red neuronal, observado como un efecto de techo en el consumo de sacarina durante la prueba de aversión.

En concordancia con nuestros hallazgos, evidencia previa muestra que la administración sistémica de NaB mejoró el aprendizaje del CAS, haciéndolo más resistente a la extinción e incrementó significativamente los niveles de c-Fos y la fosfoacetilación de la histona H3 en la amígdala central (Kwon y Houpt, 2010). Del mismo modo la infusión de NaB en la corteza insular retrasó la extinción de la memoria del CAS sugiriendo que la acetilación de histonas juega un papel importante en la CI durante la formación de la memoria del CAS (Núñez-Jaramillo et al., 2014).

Por otra parte, se ha mostrado que la inhibición de HDAC de la clase I con MS-275, un potente inhibidor de la deacetilación de histonas, facilita el desempeño en una tarea de memoria de reconocimiento de objetos (Hawk et al., 2011). MS-275 inhibe de manera

preferencial a HDAC1 y HDAC2 sobre HDAC3 (Hu et al., 2003), sugiriendo que las dos primeras contribuyen de manera decisiva a la consolidación de la memoria del CAS de acuerdo a los hallazgos del presente trabajo. Entre los mecanismos involucrados en tales acciones se ha postulado la participación de la cascada ERK / MAPK así como de la actividad de la lisina acetiltransferasa en la corteza insular (Swank y Sweatt, 2001).

Se ha mostrado que la sobreexpresión de HDAC2 regula de manera negativa la plasticidad sináptica, así como el aprendizaje y la memoria a través de la represión transcripcional de genes regulados por la actividad neuronal, como *bdnf*, *arc*, *c-fos*, *creb*, *CaMKII* y *pkmz* (Guan et al., 2009). Asimismo, se ha observado que la regulación epigenética de la desmetilación del ADN y la acetilación de histonas de los genes de *reelina* y *bdnf*, podrían subyacer a los mecanismos de la plasticidad sináptica y la retención de la memoria en la corteza prefrontal (Sui et al., 2012). Por su parte, en un estudio previo, Morris y colaboradores, mostraron que la eliminación selectiva de HDAC2 condujo a una aceleración robusta de la extinción en las tareas de miedo condicionado y condicionamiento de aversión al sabor (Morris et al., 2013). En este contexto, en un estudio previo llevado a cabo por Koppel y Timmusk se encontró que la inhibición de HDAC de la clase I promueve una regulación al alza de los niveles de ARNm de BDNF (Koppel y Timmusk, 2013). BDNF es considerado un producto esencial de la síntesis de proteínas que es capaz de regular procesos celulares que subyacen a la cognición y otros comportamientos complejos (Bekinschtein et al., 2007). Además, esta neurotrofina es considerada un factor clave con impacto multipotente en la señalización cerebral y la plasticidad sináptica, esencial para el almacenamiento de la memoria de largo plazo (Kowianski et al., 2017). En este sentido, estudios previos de

nuestro grupo de investigación han demostrado que la infusión de BDNF en la CI es capaz de convertir un CAS débil en uno fuerte (Martinez-Moreno et al., 2016). Por lo tanto, los resultados del presente estudio sugieren que el fortalecimiento de una memoria de aversión al sabor originada por la inhibición de HDAC de la clase I en la CI podría involucrar la regulación positiva de la expresión de BDNF.

En suma, los hallazgos del presente estudio muestran que el almacenamiento de largo plazo de una memoria de aversión al sabor requiere al menos de dos oleadas de síntesis de ARNm y acetilación de histonas en la CI, sugiriendo que la modulación transcripcional y epigenética contribuyen a las funciones relacionadas con la consolidación de la memoria efectuadas por un área neocortical, incluso varias horas después de la adquisición de la memoria.

## IX. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación demuestran que:

- La consolidación de la memoria de aversión al sabor requiere de síntesis de ARNm inmediatamente después, así como en una ventana temporal de 7 horas, tras la adquisición del CAS.
- La inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I en la corteza insular facilita la consolidación de la memoria permitiendo que un CAS débil se convierta en uno fuerte.
- La consolidación de la memoria de un CAS fuerte no es mejorada tras la inhibición de las histonas deacetilasas de la clase I en la corteza insular debido a un efecto de piso en la expresión de aversión.



## X. REFERENCIAS

- Abraham, W. C., & Robins, A. (2005). Memory retention—the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends in neurosciences*, 28(2), 73-78.
- Atkinson, R.C., Shiffrin, R.M. (1968). Human Memory: A proposed system and its control processes. En Spence, K.W., & Spence, J.T. *The psychology of learning and motivation*. Vol. 2. (pp. 89–195). New York: Academic Press.
- Alberini, C. M., & Kandel, E. R. (2015). The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a021741.
- Bahari-Javan, S., Maddalena, A., Kerimoglu, C., Wittnam, J., Held, T., Bähr, M., and Sananbenesi, F. (2012). HDAC1 regulates fear extinction in mice. *The Journal of Neuroscience*, 32(15), 5062-5073.
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., and Si, K. (2004). The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning- induced synaptic growth. *Neuron*, 44: 49–57.
- Barrett, R. M., & Wood, M. A. (2008). Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learning & Memory*, 15(7), 460-467.
- Bear, M. F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13453-13459.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261-277. Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman,

- G., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2010). Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotoxicity research*, 18(3-4), 377-385.
- Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5379-5382.
  - Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned aversion. *Brain Research*, 54:165–170.
  - Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5: 209–217.
  - Bermúdez-Rattoni, F., Ramírez-Lugo, L., Gutiérrez, R., & Miranda, M. I. (2004). Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cellular and molecular neurobiology*, 24(1), 25-36.
  - Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 12(5), 447-449.
  - Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiology of learning and memory*, 109, 207-216.
  - Berstein, I. (1991). Flavor Aversion en T.V. Getchell, R.L. Doty, L.M. Bartoshuk y J.B. Snow, Jr. (Eds). *Smell and Taste in Health and Disease*. Raaven Press: USA

- Bertrand, D., Yannick, S., Mathilde, B., Frederic, L., Nadine, R., and Guillaume, F. (2009). Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 29(8), 1654-1662.
- Bredy, T. W., & Barad, M. (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learning & Memory*, 15(1), 39-45.
- Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., & Winrow, C. J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1–11 in the rat brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, 31(1), 47-58.
- Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind*. Oxford University Press.
- Carey, N., & La Thangue, N. B. (2006). Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Current opinion in pharmacology*, 6(4), 369-375.
- Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM. (2011). A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469: 491–497.
- Clement, JQ and Wilkinson, MF. (2000). Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *Journal of molecular biology*, 299(5), 1179-1191.
- Cortés-Mendoza, J, Díaz de León-Guerrero, S, Pedraza-Alva, G y Pérez-Martínez, L. (2013). Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(6), 359-369.

- Da Silva, W. C., Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus*, 18(1), 29-39.
- Davis, HP y Squire, LR. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin*, 96(3), 518.
- Dash, P. K., Zhao, J., Orsi, S. A., Zhang, M., & Moore, A. N. (2009). Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. *Neuroscience letters*, 460(2), 103-107.
- Domjan, M. (1985). Cue-consequence Specificity and Long-delay Learning Revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443(1), 54-66.
- Dudai, Y., y Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*. 44: 93–100.
- Dudai, Y. (2012). The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience*, 35, 227-247.
- Duvarci, S., Nader, K., & LeDoux, J. E. (2008). De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learning & Memory*, 15(10), 747-755.
- Emptage, N. J., & Carew, T. J. (1993). Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science*, 262(5131), 253-256.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Mungenast, A., Tsai, L.-H., (2010). Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 605-617.

- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 119.
- Garcia-Osta, A., Tsokas, P., Pollonini, G., Landau, E. M., Blitzer, R., & Alberini, C. M. (2006). MuSK expressed in the brain mediates cholinergic responses, synaptic plasticity, and memory formation. *Journal of Neuroscience*, 26(30), 7919-7932.
- Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermudez-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443(1), 8-21.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. y Koelling, R. (1955). Conditioned aversion to saccharine resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122: 157-158.
- Garcia, J. y Koelling, Y. (1966). Relation of cue to consequence in avoiding learning. *Psychonomic Science*, 4: 123-124.
- Gluck, M., Mercado, E., & Myers, C. (2008). *Learning and Memory: From Brain to Behavior*. New York: Worth.
- Gräff, J., & Tsai, L. H. (2013b). The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 311-330.
- Gräff, J., & Tsai, L. H. (2013a). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature reviews neuroscience*, 14, 97-111.
- Gisquet-Verrier, P., & Riccio, D. C. (2018). Memory integration: An alternative to the consolidation/reconsolidation hypothesis. *Progress in neurobiology*.

- Gold, P. E., & Van Buskirk, R. B. (1975). Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behavioral biology*, 13(2), 145-153.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., T...Kandel, E.R. (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*, 111(4), 483-93.
- Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., ... & Bradner, J. E. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, 459(7243), 55.
- Gupta, S., Kim, S. Y., Artis, S., Molfese, D. L., Schumacher, A., Sweatt, J. D., ... & Lubin, F. D. (2010). Histone methylation regulates memory formation. *Journal of Neuroscience*, 30(10), 3589-3599.
- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86-104.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N., (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 10, 32-42.
- Hagen, H., & Manahan-Vaughan, D. (2013). Differentiation in the protein synthesis-dependency of persistent synaptic plasticity in mossy fiber and associational/commissural CA3 synapses in vivo. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 10.

- Hawk, J. D., Florian, C., & Abel, T. (2011). Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learning & Memory*, 18(6), 367-370.
- Hu, E., Dul, E., Sung, C.M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., de los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J., Winkler, J., Jaye, M. (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 720-728.
- Igaz, L.M., Vianna, M.R., Medina, J.H., & Izquierdo I. (2002). Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6781–6789.
- Inoue, S., Mai, A., Dyer, M. J., & Cohen, G. M. (2006). Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand–induced apoptosis. *Cancer research*, 66(13), 6785-6792.
- Ionita-Laza, I., Lange, C., & Laird, N. M. (2009). Estimating the number of unseen variants in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5008-5013.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., e Souza, T. M., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635.
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*. 293(5532), 1074-80.

- Jiang, Y., Langley, B., Lubin, F. D., Renthall, W., Wood, M. A., Yasui, D. H., ... & Beckel-Mitchener, A. C. (2008). Epigenetics in the nervous system. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 11753-11759.
- Kandel, ER, Schwartz, JH y Jessell, TM. (2000). *Principles of neural science* (New York: McGraw-Hill, Health Professions Division).
- Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., Qian, X., Mills, E., Berghs, SC., Carey, N., Finn, PW., Collins, LS., Tumber, A., Ritchie, JW., Jensen, PB., Lichenstein, HS., Sehested, M. (2008). Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochemical Journal*, 409(2), 581-589.
- Kiefer, S. W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443(1), 100-109.
- Koppel, I., & Timmusk, T. (2013). Differential regulation of Bdnf expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Neuropharmacology*, 75, 106-115.
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2017). BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and molecular neurobiology*, 1-15.
- Kwon, B., & Houpt, T. A. (2010). Phospho-acetylation of histone H3 in the amygdala after acute lithium chloride. *Brain research*, 1333, 36-47.
- LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behavioural brain research*, 58(1), 69-79.



- Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 108.
- Levenson, J., O'Riordan, K., Brown, k, Trinh, M., Molfese, D., & Sweatt, D. (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 40545-40559.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews*, 84(1), 87-136.
- Martínez-Moreno, A. (2013). Efecto de la inhibición de la transcripción en la amígdala sobre la consolidación de la memoria de un entrenamiento incrementado. (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2011). Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5.
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2016). Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory. *Behavioural Brain Research*, 297, 1-4.
- McGaugh, J. L., Introini-Collison, I. B., Nagahara, A. H., Cahill, L., Brioni, J. D., & Castellano, C. (1991). Involvement of the amygdaloid complex in neuro-modulatory influences on memory storage. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14(4), 425-431.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(3742), 1351-1358.

- McGaugh, J.L. (2000). Memory: a century of consolidation. *Science*, 287: 248–251.
- McQuown, S. C., & Wood, M. A. (2011). HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis. *Neurobiology of learning and memory*, 96(1), 27-34.
- Medina, J.H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., and Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural brain research*, 192(1), 61-69.
- Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of learning and memory*, 90(3), 584-587.
- Monsey, M. S., Ota, K. T., Akingbade, I. F., Hong, E. S., & Schafe, G. E. (2011). Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PloS one*, 6(5), e19958.
- Morris, M. J., Mahgoub, M., Na, E. S., Pranav, H., & Monteggia, L. M. (2013). Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *Journal of Neuroscience*, 33(15), 6401-6411.
- Nestler, E. J., Hope, B. T., & Widnell, K. L. (1993). Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*, 11(6), 995-1006.
- Núñez-Jaramillo, L., Reyes-López, J., & Miranda, M. I. (2014). Sodium butyrate into the insular cortex during conditioned taste-aversion acquisition delays aversive taste memory extinction. *NeuroReport*, 25(6), 386-390.
- Nguyen, P.V., Abel, T y Kandel, E.R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*, 265: 1104–1107.

- Paxinos, G and Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates (Amsterdam; Boston: Elsevier).
- Pedreira, M. E., Dimant, B., & Maldonado, H. (1996). Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(3), 611-617.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & Memory*, 6(6), 600-607.
- Rodriguez-Duran, L.F., Castillo, D.V., Moguel-Gonzalez, M., and Escobar, M. L.(2011).Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of learning and memory*, 95(4), 519-526.
- Roozendaal, B. (2002). Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78, 578 – 595.
- Roozendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S. M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D.P., Wood, M. A. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *The Journal of Neuroscience*, 30(14), 5037-5046.
- Rosenblum, K, Meiri, N y Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral and neural biology*, 59(1), 49-56.

- Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., & Nakanishi, O. (1999). A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4592-4597.
- Stafford, J. M., Raybuck, J. D., Ryabinin, A. E., & Lattal, K. M. (2012). Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biological psychiatry*, 72(1), 25-33.
- Sternberg, R.J. (2012). *Cognitive psychology*. (6th ed.). USA: Cengage/Wadsworth.
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K., & Wood, M. A. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), 9447-9452.
- Suganuma, T., & Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annual Review of Biochemistry* 80, 473-499.
- Sui, L., Wang, Y., Ju, L. H., & Chen, M. (2012). Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiology of learning and memory*, 97(4), 425-440.
- Swank, M. W., & Sweatt, J. D. (2001). Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *Journal of Neuroscience*, 21(10), 3383-3391.
- Sweatt, J.D. (2009). Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biological Psychiatry*, 65, 191-197.

- Taubenfeld, S. M., Wiig, K. A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2001). Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  and  $\delta$  co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *Journal of Neuroscience*, 21(1), 84-91.
- Torres-García, M E. (2012). Efecto de la inhibición de la transcripción en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado. (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.
- Travers, S. P. (1993). Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract. Mechanisms of taste transduction (Simon SA, Roper SD, eds), 339-394.
- Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E. C., Brunetti, M., Renzoni, D., &Steinkühler, C. (2004). Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15064-15069.
- Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., &Laroche, S. (2014). The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 122, pp. 89-129). Academic Press.
- Witt, M., & Reutter, K. (1996). Embryonic and early fetal development of human taste buds: a transmission electron microscopical study. *The Anatomical Record*:

An Official Publication of the American Association of Anatomists, 246(4), 507-523.

- Witt, M., & Reutter, K. (1998). Innervation of developing human taste buds. An immunohistochemical study. *Histochemistry and cell biology*, 109(3), 281-291.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Azuma, S., Bai, W. Z., & Wakisaka, S. (1992). C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride. *Neuroreport*, 3(12), 1049-1052.
- Yasoshima, Y., Morimoto, T., & Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain research*, 869(1-2), 15-24.

## **ANEXO**

El anexo corresponde al artículo que conjunta los hallazgos del presente proyecto de investigación, el cual ha sido publicado en la revista Behavioural Brain Research. Rodríguez-Blanco, L. A., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2019). Consolidation of an aversive taste memory requires two rounds of transcriptional and epigenetic regulation in the insular cortex. Behavioural brain research.