



Universidad de Granada

Programa de Doctorado: PSICOLOGÍA

MECANISMOS CEREBRALES DE LA  
MEMORIA DE RECONOCIMIENTO EN  
RATAS: PAPEL DE LA CORTEZA  
PERIRRINAL

Beatriz Gómez Chacón

Tesis Doctoral

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Beatriz Gómez Chacón  
D.L.: GR 2348-2014  
ISBN: 978-84-9083-392-6





Universidad de Granada  
Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz"

*Tesis Doctoral*

**MECANISMOS CEREBRALES DE LA  
MEMORIA DE RECONOCIMIENTO EN  
RATAS: PAPEL DE LA CORTEZA  
PERIRRINAL**

Beatriz Gómez Chacón

Granada, 2014

Directora: Milagros Gallo Torre



Tesis presentada por **Beatriz Gómez Chacón** para optar al grado de Doctora con Mención Internacional en Psicología por la Universidad de Granada.

Fdo. Beatriz Gómez Chacón.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Beatriz Gómez Chacón", with a long horizontal stroke extending to the right.

Tesis dirigida por la Doctora en Psicología por la Universidad de Granada,  
**Milagros Gallo Torre.**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Milagros Gallo Torre", with a long horizontal stroke extending to the left.

Fdo. Milagros Gallo Torre.

Catedrática de Psicobiología, Universidad de Granada.



La doctoranda **Beatriz Gómez Chacón** y la directora de la tesis **Milagros Gallo Torre**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del la directora de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

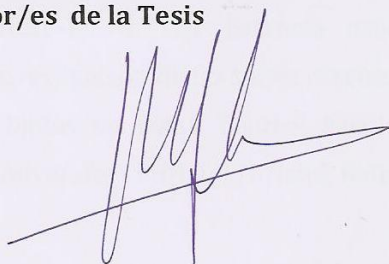
Granada, 23 de OCTUBRE 2014

**Doctorando**

A handwritten signature in blue ink that reads "Beatriz Gómez Chacón". The signature is stylized with a large, looped initial 'B' and a horizontal line crossing through the middle of the name.

Fdo.: Beatriz Gómez Chacón.

**Director/es de la Tesis**

A handwritten signature in blue ink that reads "Milagros Gallo Torre". The signature is highly stylized with a large, looped initial 'M' and a horizontal line crossing through the middle of the name.

Fdo.: Milagros Gallo Torre.





## ***Financiación***

---

Esta Tesis Doctoral es fruto del trabajo de investigación realizado gracias a la financiación recibida para los siguientes proyectos y estancias:

- PSI2008-03933 “Organización dinámica de los circuitos cerebrales implicados en aprendizaje y memoria desde el desarrollo temprano hasta el envejecimiento” (MICINN. España) IP: Milagros Gallo Torre. Beca del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida a Beatriz Gómez Chacón asociada a este proyecto.
- P07-HUM-02763 “Desarrollo, aprendizaje, cerebro y educación” (Proyectos de Excelencia. Junta de Andalucía. España) IP: Milagros Gallo Torre.
- PSI2011-23702 “Memoria de reconocimiento gustativa y visual en ratas. Mecanismos cerebrales y evolución a lo largo de la vida” (MINECO. España) IP: Milagros Gallo Torre.
- EEBB-I-12-03719 Estancia asociada a la beca FPI dirigida al estudio de la señalización neuronal específica durante la consolidación de la memoria inducida por diversas tareas de aprendizajes. Centro: McKnight Brain Institute. University of Florida (Florida, USA).
- EEBB-I-13-07724 Estancia asociada a la beca FPI dedicada a la investigación de las bases cerebrales de la memoria de reconocimiento de objetos en ratas. Centro: Faculty of Medical and Veterinary Sciences. University of Bristol (Bristol, Reino Unido).



*A mis padres*

MECANISMOS CEREBRALES DE LA  
MEMORIA DE RECONOCIMIENTO  
GUSTATIVA EN RATAS: PAPEL DE LA  
CORTEZA PERIRRINAL

---

BRAIN MECHANISMS OF TASTE  
RECOGNITION MEMORY IN RATS:  
ROLE OF THE PERIRHINAL CORTEX

---



## ***Resumen***

---

La presente Tesis Doctoral está orientada a explorar la participación la corteza perirrinal (PRh) y los mecanismos moleculares asociados a la formación de la memoria gustativa segura durante la habituación de la neofobia gustativa en ratas.

A pesar de que la habituación de la neofobia gustativa se suele clasificar como memoria no-declarativa dependiente de un circuito que incluye el área parabraquial, corteza insular y amígdala principalmente, estudios de lesión apoyan la implicación de PRh del mismo modo que ocurre en la memoria de reconocimiento visual empleada frecuentemente como modelo de memoria episódica dependiente del lóbulo temporal medial. Ello pone en tela de juicio la dicotomía anatómico-funcional actualmente aceptada y plantea la existencia de mecanismos compartidos por diversos tipos de memoria. En este sentido, está descrito un cambio en la expresión de c-fos, gen inmediato temprano usado como índice de actividad neural, en PRh asociado a memoria de reconocimiento visual. Ello sugiere la posibilidad de que la zona participe también en los procesos de memoria gustativa segura subyacente a la habituación de la neofobia.

En la primera serie experimental de este trabajo, se evaluó el efecto de lesiones neurotóxicas bilaterales de la amígdala basolateral (BLA) sobre la actividad de PRh después de la exposición a soluciones de vinagre novedosas y familiares, utilizando para ello la cuantificación de la expresión de c-Fos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y lesionado en el

número de células c-Fos positivas cuantificadas después de la exposición a la solución novedosa. Sin embargo, el grupo con lesión en la BLA no mostró evidencia de atenuación de la neofobia y obtuvo un menor número de células c-Fos positivas que el grupo control después de ser expuesto a la solución familiar. Estos resultados apoyan que BLA y PRh sean componentes de un circuito neuronal implicado en la memoria de reconocimiento del sabor seguro y sugiere un papel de PRh en diversas formas de memoria de reconocimiento.

En la segunda serie experimental se analizó la expresión génica en distintas zonas del lóbulo temporal medial durante la neofobia y la atenuación de la neofobia en ratas adultas. Se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) en BLA y PRh pero no en el hipocampo después de beber una solución de sacarina habituada durante 6 días. No se encontraron cambios en el perfil de expresión de GluR2, Homer1 y Narp, indicando que se trata de un efecto selectivo.

La tercera serie experimental investigó el efecto de la edad sobre el patrón de actividad de PRh estableciendo comparaciones entre ratas adultas (5 meses) y envejecidas (24 meses) expuestas diariamente a una solución de vinagre durante 6 días consecutivos. Las ratas envejecidas mostraron una atenuación de la neofobia más lenta que las adultas. Los análisis inmunohistoquímicos en PRh demostraron un patrón opuesto de actividad entre adultas y envejecidas durante la primera, segunda y sexta exposición al sabor. Estos resultados sugieren que el papel de PRh cambia durante el envejecimiento y pueden ayudar a disociar disfunciones inducidas por enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento normal.



## *Resumen*

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran la importancia de PRh para el reconocimiento gustativo apoyando la existencia de mecanismos compartidos en la memoria de reconocimiento independientemente de la modalidad sensorial y abren nuevas posibilidades a la comprensión de sus mecanismos moleculares así como de los cambios asociados a la edad.



## ***Abstract***

---

The present thesis is aimed to explore the participation of the perirhinal cortex (PRh) and the molecular mechanisms related to the formation of the safe taste memory along the habituation of taste neophobia in rats.

In spite of the fact that the habituation of taste neophobia is usually classified as non-declarative memory which is dependent on a neural circuit that includes mainly the parabrachial area, insular cortex and amygdala, lesion studies point to the relevance of PRh as it has been demonstrated in visual recognition memory which is usually considered a model of episodic memory dependent on the temporal lobe areas. This challenges the widely accepted anatomical and functional dichotomy and points to shared mechanisms for different types of memory. Since changes in the expression of c-fos, immediate early gene used a neuronal activity index, has been described in PRh during visual recognition memory, is feasible that the area exhibit changes related to taste memory underlying the habituation of taste neophobia.

In the first experimental series of the present thesis the effect of bilateral neurotoxic lesion of the basolateral amygdala (BLA) on PRh activity was assessed after drinking a novel or familiar vinegar solution by determining c-Fos expression. No differences were found between the control and lesioned group in the number of c-Fos positive cells after exposure to the novel flavor. However, BLA lesioned group showed no evidence of neophobia attenuation and exhibited a lower number of c-Fos positive cells after drinking the familiar solution. These

results support BLA and PRh as components of a neural circuit involved in safe taste memory and suggest a role for PRh in different forms of recognition memory.

In the second experimental series several genes expression during taste neophobia and its habituation was studied in various areas of the temporal lobe in adults rats. Significant differences were found in the expression of NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) in BLA and PRh but not in the hippocampus after drinking a saccharin solution. There were no changes in the expression profile of GluR2, Homer1 and Narp, thus indicating a selective effect.

The third series of experiments studied the effect of aging on the PRh activity pattern by comparing adult (5-month-old) and aged (24-month-old) rats exposed daily to a vinegar solution along 6 consecutive days. Aged rats showed a slower attenuation of neophobia than adult rats. Immunohistochemical analyses of PRh demonstrated an opposite pattern of activity in adult and aged rats as the flavor became familiar. This suggests that the role of the area changes during aging. The results can help to dissociate memory dysfunction induced by neurodegenerative disease and normal aging.

In all, the results reported in this thesis show the relevance of PRh in taste recognition memory, thus indicating that there are shared mechanisms of recognition memory which are independent of the sensory modality, and they contribute to understand its molecular mechanisms and the effect of age.



# Índice

---

<b>FINANCIACIÓN</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	24
<b>1. Concepto de memoria de reconocimiento</b> .....	27
<b>2. Modelos de memoria de reconocimiento en roedores</b> .....	29
2.1 Tarea básica de reconocimiento de objetos.....	30
2.2 Modificaciones de la tarea básica de reconocimiento objetos.....	34
2.3 Reconocimiento de estímulos gustativos.....	36
2.4 Comparación entre tareas de memoria de reconocimiento de objetos y gustativa.....	38
<b>3. Neuroanatomía de la memoria de reconocimiento</b> .....	42
3.1 Vías anatómicas y memoria de reconocimiento de objetos.....	42
3.2 Corteza perirrinal y memoria de reconocimiento de objetos.....	44
3.3 Vías anatómicas y memoria de reconocimiento gustativa.....	47
3.4 Papel de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento de sabores.....	50
3.5 Implicación de la corteza perirrinal en memoria de reconocimiento de objetos y gustativa: una comparación.....	51
<b>4. Mecanismos moleculares de la memoria de reconocimiento     gustativa</b> .....	54
4.1 Teoría de la consolidación, memoria a largo plazo y mecanismos celulares.....	55
4.2 Mecanismos moleculares de la potenciación a largo plazo como modelo de plasticidad sináptica.....	59

4.3 Neurotransmisores y memoria de reconocimiento gustativa.....	62
4.4 Procesos intracelulares y memoria de reconocimiento gustativa.....	64
<b>CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 3: BASOLATERAL AMYGDALA LESIONS ATTENUATE SAFE TASTE MEMORY-RELATED C-FOS EXPRESSION IN THE RAT PERIRHINAL CORTEX.....</b>	<b>74</b>
1. Abstract.....	76
2. Introduction.....	78
3. Material and methods.....	80
4. Results.....	82
5. Discussion.....	87
6. Acknowledgment.....	91
<b>CAPÍTULO 4: TASTE MEMORY-RELATED N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR EXPRESSION IN BASOLATERAL AMYGDALA AND PERIRHINAL CORTEX.....</b>	<b>92</b>
1. Abstract.....	94
2. Introduction.....	96
3. Material and methods.....	98
4. Results.....	101
5. Discussion.....	104
6. Acknowledgment.....	108
<b>CAPÍTULO 5: ALTERED PERIRHINAL CORTEX ACTIVITY PATTERNS DURING RECOGNITION MEMORY IN AGED RATS.....</b>	<b>110</b>
1. Abstract.....	112
2. Introduction.....	114
3. Material and methods.....	115

4. Results.....	120
5. Discussion.....	123
6. Acknowledgment.....	126
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>128</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>136</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>140</b>
<b>PUBLICACIONES RELACIONADAS.....</b>	<b>142</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>144</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>174</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>178</b>





# Capítulo 1

## *Introducción*

---



## **1. Concepto de memoria de reconocimiento**

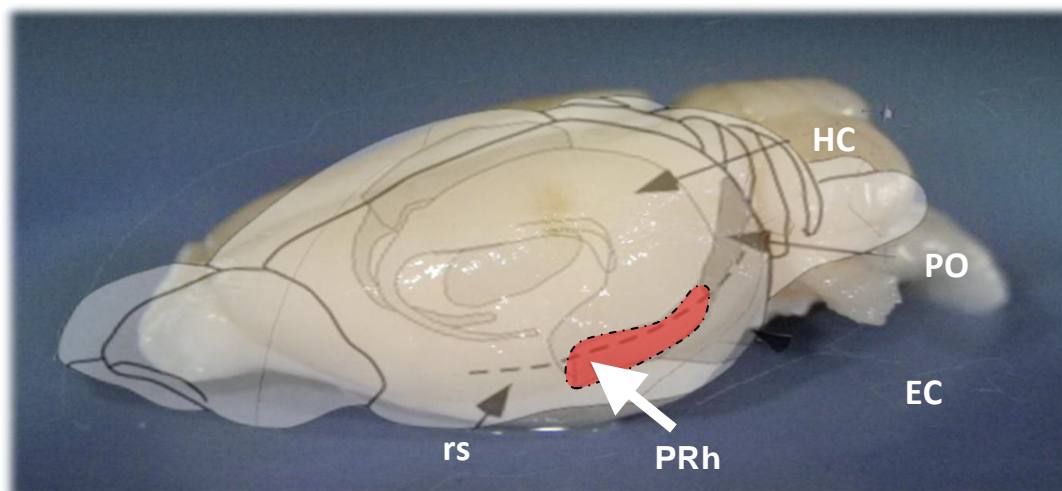
La memoria de reconocimiento se define como la capacidad para identificar un ítem o evento como previamente experimentado. Los estudiosos de la cognición han dedicado una gran atención especialmente a la memoria de reconocimiento visual en humanos, primates y palomas (Ennaceur, 2010). Sin embargo, el interés por la memoria de reconocimiento en roedores es relativamente reciente y sólo en la última década se ha desarrollado una intensa investigación en el campo de las Neurociencias dirigida a estudiar las áreas y circuitos cerebrales responsables.

La interpretación de los resultados obtenidos con las tareas desarrolladas para evaluar este tipo de memoria ha dado lugar a intensas discusiones teóricas sobre el tipo de proceso involucrado. En función de la tarea empleada puede interpretarse que la memoria de reconocimiento está basada bien en la familiaridad, la cual no requiere conciencia en el ser humano, o bien en el recuerdo. Este último implica conciencia en seres humanos, no necesita ensayos repetidos e incluye contenidos de diversas modalidades sensoriales junto a información espacial y temporal. La disociación entre familiaridad y recuerdo involucra la participación de tipos de memoria de distinto orden dentro de las clasificaciones dicotómicas actuales (Squire, 2004). Por una parte, el desarrollo de la familiaridad se refiere a un proceso de habituación que reduce la respuesta ante la novedad de un estímulo y está incluido entre los tipos de aprendizaje no asociativo que dan lugar a memoria no declarativa o implícita. Por otra parte, el recuerdo hace referencia a la denominada memoria episódica, un tipo de memoria declarativa o explícita que permite recuperar información no solo de

## Capítulo 1

los estímulos sino también de detalles del contexto espacial y temporal de una situación vivida personalmente. Únicamente el recuerdo se ha relacionado tradicionalmente con procesos de memoria dependientes de estructuras del lóbulo temporal (Squire, 2004).

El papel del hipocampo en las tareas de memoria de reconocimiento en roedores ha sido objeto de debate (Mumby, 2001; Broadbent et al., 2004; Ainge et al., 2006; Jordanova et al., 2009). Sin embargo, en la actualidad se ha acumulado evidencia que apoya la participación de otras áreas temporales, especialmente la corteza perirrinal (PRh) (Figura 1). Se acepta que las exigencias del procedimiento aplicado para evaluar la memoria de reconocimiento determinan el grado en que PRh y otras áreas temporales están implicadas. Por ello, resulta especialmente interesante revisar los conocimientos actuales acerca de la función de PRh en la memoria de reconocimiento en roedores, haciendo especial hincapié en la comparación de los resultados obtenidos en la modalidad visual y gustativa, con tradiciones de investigación separadas sin que haya existido interacción entre los campos en que se han desarrollado.



**Figura 1.-** Localización anatómica de la corteza perirrinal y regiones relacionadas en el cerebro de la rata. HC: hipocampo, POR: corteza postrrinal, EC: corteza entorrhinal, PRh: corteza perirrinal, rs: surco rhinal.

## **2. Modelos de memoria de reconocimiento en roedores**

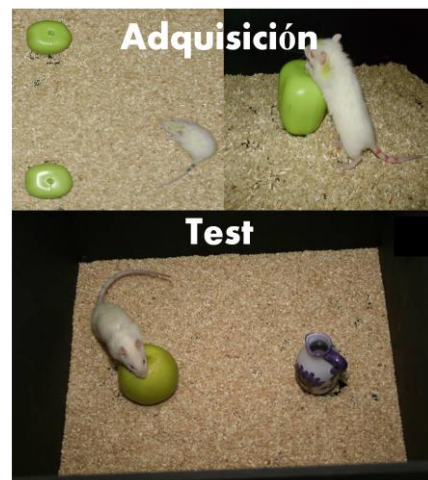
Las tareas aplicadas en roedores para estudiar los mecanismos cerebrales responsables de la memoria de reconocimiento han explorado tradicionalmente el reconocimiento de objetos a través de la modalidad visual. En los últimos años se han introducido modificaciones a la tarea básica visual que implican otras modalidades sensoriales o incluyen reconocimiento de información adicional presente en la situación experimental.

Con respecto al estudio de las respuestas de los roedores ante la novedad y familiaridad de los sabores se trata de un campo de investigación independiente con una larga tradición dentro del ámbito de estudio del efecto de la novedad en aprendizaje. Efectivamente, la presentación de sabores desconocidos desencadena una respuesta neofóbica que desaparece a medida que el sabor se convierte en familiar gracias a un proceso de aprendizaje denominado habituación de la neofobia. Sin embargo, no ha sido hasta el año 2004 cuando la habituación de la neofobia gustativa se ha propuesto como modelo de memoria de reconocimiento gustativa segura (Bermudez-Rattoni, 2004). Dado que la tarea comportamental aplicada adquiere connotaciones críticas cuando se trata de identificar el papel de una zona cerebral en la memoria de reconocimiento a continuación se revisan los procedimientos comportamentales empleados resaltando las variables que pueden resultar críticas a la hora de interpretar los resultados de las intervenciones cerebrales.

## 2.1. Tarea básica de reconocimiento de objetos

La tarea estándar empleada para evaluar memoria de reconocimiento visual en roedores fue propuesta por Ennaceur y Delacour en 1988 (Ennaceur and Delacour, 1988), aprovechando su tendencia innata a pasar mayor tiempo explorando objetos novedosos que familiares. Dado que depende de una respuesta espontánea inducida por la novedad que no requiere entrenamiento previo, se ha denominado en inglés “spontaneous object recognition” (SOR). En ocasiones se utiliza como sinónimo de SOR el término “preferencia por la novedad” (Mumby e tal., 2002).

El procedimiento general se lleva a cabo en un campo abierto cuadrangular e incluye al menos dos sesiones (Figura 2) después de haber familiarizado al animal con el aparato y la habitación en que se encuentra. En la sesión de adquisición se permite al roedor explorar dos objetos idénticos durante un periodo de tiempo. La sesión de prueba se aplica después de un periodo de retención variable según el objeto de estudio. En ésta, uno de los objetos es sustituido por otro desconocido para el animal y se registra el tiempo de exploración tanto del objeto familiar como del novedoso. Si los animales dedican más tiempo a explorar el objeto novedoso que no habían examinado previamente, se puede inferir que recuerdan el objeto familiar.



**Figura 2.-** Procedimiento estándar con objetos de la vida diaria para evaluar la memoria de reconocimiento de objetos espontánea (SOR).

Aunque la tarea es aparentemente sencilla, modificaciones más o menos sutiles en algunos parámetros pueden ser críticas a la hora de determinar su eficacia o la implicación de determinados circuitos cerebrales.

En primer lugar, la tarea está concebida para ser aplicada en un único ensayo. En cualquier caso, es importante que el roedor sea sometido a un único ensayo diario a fin de que el comportamiento exploratorio no se habitúe y la tasa de exploración sólo alcance valores mínimos no utilizables (Burke et al., 2012). Por otra parte, el empleo de sesiones múltiples de adquisición no es recomendable, puesto que presumiblemente podría poner en marcha procesos de aprendizaje y memoria independientes implicando la participación de áreas cerebrales diferentes. Sin embargo, en ocasiones se emplean sesiones de prueba repetidas a distintos intervalos después de la adquisición para evaluar la duración de la retención (Burke et al., 2010). En estos casos se incluye un objeto novedoso diferente en cada prueba, pero el objeto familiar sigue siendo el mismo. En nuestro laboratorio hemos obtenido datos que desaconsejan la exploración del efecto del intervalo de retención en los mismos animales empleando diseños intrasujetos. De hecho, la tarea se facilita al incrementar la familiaridad del objeto conocido y los resultados de intervenciones difieren de los obtenidos empleando diseños entregrupos.

En segundo lugar, la duración del intervalo de retención determina el tipo de proceso involucrado en la tarea. El empleo de intervalos cortos en el rango de segundos y minutos permite explorar las capacidades perceptivas, lo cual puede ser un objetivo en sí mismo (Bartko et al., 2007) o puede emplearse como tarea control para confirmar que el sujeto es capaz de discriminar entre los objetos a



## *Capítulo 1*

recordar. La aplicación de la tarea al estudio de la memoria suele emplear intervalos de retención que oscilan entre varias horas y días.

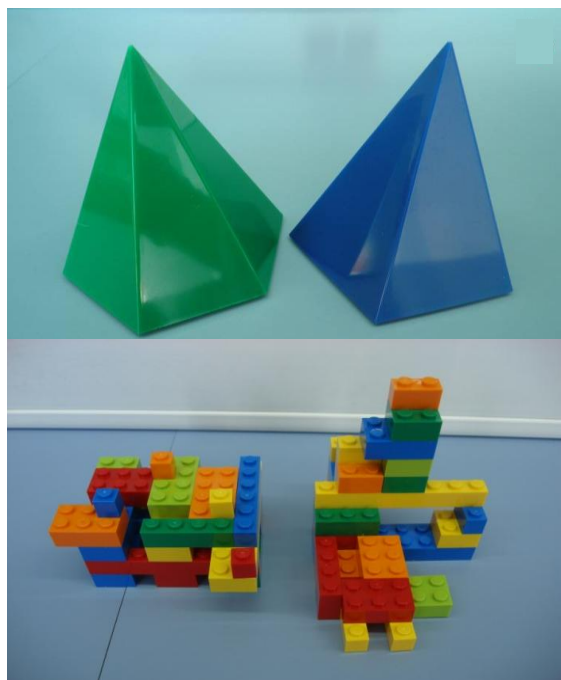
En tercer lugar, en la actualidad se está dedicando especial atención al tratamiento del animal durante el periodo de dilación entre la fase de adquisición y la de prueba. Dado que se trata de una tarea de memoria visual los estímulos visuales extraños a los que el animal está expuesto durante estos periodos pueden inducir efectos de interferencia en la medida en la que compartan rasgos con el objeto a recordar. Esta cuestión suele controlarse cubriendo las jaulas o manteniendo al sujeto en oscuridad, lo que es más complicado cuando se trata de dilaciones largas.

Un cuarto aspecto hace referencia no tanto al procedimiento conductual como al análisis de los resultados obtenidos. Junto al análisis de los tiempos de exploración de cada objeto, frecuentemente se utilizan una serie de transformaciones que permiten poner en relación los tiempos de exploración del objeto familiar versus el novedoso y obtener una tasa única. Aunque dichas transformaciones pueden ser útiles para reducir variabilidad y eliminar efectos producidos por variables extrañas que afecten a la ejecución, su empleo debe ser cuidadoso. A partir de una comparación entre el análisis de los datos directos y tres de las tasas más empleadas, nuestro grupo ha demostrado que la elección de la tasa puede modificar las conclusiones acerca de los efectos de la variable independiente (Gámiz and Gallo, 2012).

Por último, a nuestro entender el tipo de objetos empleados en la tarea SOR es una de las cuestiones de mayor relevancia que, sin embargo, no ha sido

objeto de estudio excepto en aquellas investigaciones dirigidas a explorar las capacidades perceptivas. Se emplea una diversidad de objetos que a menudo no son descritos con precisión en los trabajos publicados y en ocasiones de diversa disponibilidad dependiendo de los países, lo que dificulta la replicación de los resultados y puede conducir a interpretaciones confusas. Los objetos empleados pueden clasificarse en tres categorías: objetos de la vida diaria (Figura 2), formas geométricas tridimensionales (Figura 3, arriba) y objetos compuestos de piezas de Lego (Figura 3 abajo). Aspectos como las diferencias en tamaño, forma y color entre la pareja de objeto novedoso y familiar empleados pueden determinar el tipo de proceso y área cerebral implicado en la tarea. En este sentido, el papel de la similaridad y complejidad de los objetos se ha revelado de especial importancia cuando se trata de explorar el papel de la corteza perirrinal en tareas SOR

(Ennaceur et al., 1997; Eacott et al., 2001; Murray and Richmond, 2001; Norman and Eacott, 2004; Winters et al., 2004; Winters and Busseyk, 2005; Bartko et al., 2010; Brown et al., 2010; Cowell et al., 2010). Resultados similares se han obtenido en nuestro laboratorio al investigar los efectos de la edad en memoria de reconocimiento visual (Gámiz and Gallo, 2012).



**Figura 3.-** Formas geométricas (arriba) y figuras complejas compuestas de piezas Lego (abajo). Modificado de Gámiz and Gallo, 2012.

## **2.2. Modificaciones de la tarea básica de reconocimiento de objetos**

Aunque la tarea SOR típicamente emplea un campo abierto, existen versiones en las que se utiliza un laberinto en Y (Forwood et al., 2005; Winters et al., 2004) o una plataforma elevada (Ennaceur et al., 2009). Una versión más compleja del procedimiento estándar es la desarrollada por Albasser et al. (Albasser et al., 2010). Entre las modificaciones a destacar se incluyen la sustitución del campo abierto cuadrangular por un laberinto que consiste en un corredor estrecho cuyos dos extremos finalizan en un espacio triangular. En cada espacio triangular se pueden colocar dos objetos separados parcialmente por una pared. El procedimiento incluye el reforzamiento de la conducta exploratoria, ya que todos los objetos se sitúan sobre comederos cebados a los que el animal accede desplazándolos. Además requiere una fase de entrenamiento previo para que el animal se desplace por el laberinto y explore las cuatro posibles localizaciones del objeto. El reforzamiento de la conducta exploratoria permite múltiples ensayos con pares de objetos diferentes, evitando los problemas de habituación. De hecho la tarea incluye familiarización con un gran número de pares de objetos de la vida diaria que pueden diferenciarse en cuanto a las características visuales (forma, tamaño, color), textura y olor.

Esta tarea ha sido aplicada a la investigación del papel de las señales visuales frente a las táctiles, alternando luz y oscuridad durante la adquisición y prueba (Albasser et al., 2011b) o realizando todo el entrenamiento en oscuridad (Albasser et al., 2012), y a las olfativas, empleando formas cúbicas con diversos

aromas en vez de los objetos. El objetivo de los creadores de este procedimiento es acentuar las diferencias entre la activación cerebral desencadenada por la detección de la novedad y familiaridad a la vez que se iguala el tiempo de exposición y entrenamiento entre los grupos experimentales y controles. Ello contribuye a una mayor actividad cerebral asociada a la tarea. Aunque no puede descartarse que el empleo de ensayos repetidos y la intervención de procesos de reforzamiento añadidos representen factores extraños que impliquen tipos de memoria no comparables con los implicados en la tarea SOR estándar (Ennaceur et al., 2010) y desencadenen la participación de circuitos cerebrales diferentes de los implicados en la tarea SOR básica, éstos deberían estar igualados en los grupos control y experimental, siendo la exposición al objeto novedoso o familiar lo único que diferiría entre ellos. Además, la tarea incluye también un componente de desplazamiento entre las posiciones del laberinto que, aunque controlado mediante balanceo, implica la activación de circuitos cerebrales involucrados en memoria espacial.

Por otra parte, el papel de la memoria de la localización del objeto se estudia empleando otra modificación de la tarea SOR estándar que fue desarrollada en 1997 (Ennaceur et al., 1997). Denominada en inglés “object location recognition memory” (OLR) emplea el mismo par de objetos en las sesiones de adquisición y prueba pero en ésta última uno de ellos es colocado en una posición novedosa dentro del campo abierto. El recuerdo de la posición familiar del objeto da lugar a mayor tiempo de exploración de aquel que ocupa una posición novedosa. Una descripción precisa de las posiciones empleadas,

## *Capítulo 1*

incluyendo distancias, se echa de menos a menudo, ya que las posiciones elegidas determinan la dificultad de la tarea.

Por último, otras modificaciones de la tarea de reconocimiento de objetos hacen hincapié en la capacidad del animal para recordar la localización de varios objetos presentes simultáneamente en la situación de adquisición o el orden temporal de aparición. En el primer caso, se trata de la tarea denominada “Object-in-place recognition memory” (OPR) que utiliza cuatro objetos dispuestos en las esquinas del campo abierto que cambian de posición durante la prueba. En el segundo caso, la tarea se denomina “temporal order recognition memory” (TOR) y emplea dos sesiones de adquisición previas a una sesión de prueba con una pareja de objetos idénticos de cada sesión, en la que se evalúan capacidades relacionadas con información de presentación de los objetos (recencia, orden, etc,...).

### **2.3. Reconocimiento de estímulos gustativos**

La respuesta neofóbica gustativa consiste en una reducción del consumo de un alimento o solución sávida en comparación con las cantidades ingeridas en ulteriores presentaciones cuando el sabor se convierte en familiar y seguro al no haber sido seguida su ingestión de malestar gastrointestinal. Se trata de una respuesta innata adaptativa que contribuye a la supervivencia al evitar la ingestión de grandes cantidades de una sustancia desconocida potencialmente tóxica.

En el laboratorio el procedimiento empleado para estudiar el efecto de la novedad y familiaridad gustativa requiere la privación de agua de los animales

que disponen de sesiones diarias en las que se presenta el sabor habitualmente diluido en agua. El tipo de estímulo gustativo puede variar desde los principales sabores básicos (dulce, salado, amargo, ácido, glutamato monosódico) hasta una variedad de sabores compuestos que se obtienen diluyendo extractos saborizantes disponibles en el mercado para su empleo en la preparación de alimentos o bebidas. Dado que existen preferencias innatas por determinados sabores, tales como salado y dulce, por ejemplo, frente a amargo y agrio, las cantidades ingeridas de un sabor desconocido dependen del estímulo empleado. Por ello, la reducción en el consumo de un sabor durante la primera presentación en comparación con una línea base previa de consumo de agua, índice de neofobia muy empleado en el pasado, ha sido criticado por poder conducir a conclusiones erróneas, especialmente cuando se utilizan sabores con concentraciones agradables al paladar (Reilly and Bornovalova, 2005; Morón and Gallo, 2007). Hoy se acepta que la demostración de la respuesta neofóbica requiere al menos dos presentaciones en días consecutivos de manera que el consumo se incremente significativamente en la segunda presentación respecto a la primera. Efectivamente, estudios previos han demostrado que basta una presentación para inducir un efecto de familiaridad gustativa evidente no solo en el incremento del consumo sino que también afecta al retraso de aprendizajes posteriores empleando dicho estímulo, como en el caso del fenómeno denominado inhibición latente (Lubow et al., 1989). Ello no es óbice para que dependiendo de diversos factores el proceso de familiarización pueda continuar en sesiones posteriores. La demostración de que el proceso de familiarización ha alcanzado un techo viene dada por la ausencia de diferencias significativas en el

consumo de la solución familiar durante dos sesiones consecutivas. Se han descrito diversos factores, tales como la experiencia previa con otros sabores, la edad (Morón and Gallo, 2007) y cambios en el contexto espacial (Morón et al., 2002) y temporal (Manrique et al., 2004) que pueden modificar el efecto de la novedad gustativa, el número de exposiciones necesarias para completar el proceso de habituación y sus consecuencias en aprendizajes ulteriores.

#### **2.4. Comparación entre tareas de memoria de reconocimiento de objetos y gustativa**

La comparación entre las tareas empleadas para estudiar la memoria de reconocimiento de objetos y la de reconocimiento de sabores seguros en roedores permite identificar tanto características compartidas como aspectos peculiares de cada una de ellas.

Por una parte, en ambos casos basta una sola exposición a los estímulos novedosos para que se conviertan en familiares. Sin embargo la familiaridad se refleja en una disminución de la tasa de exploración en el caso de objetos familiares mientras que induce un incremento del consumo en el caso de sabores familiares cuya ingestión no ha producido consecuencias negativas. Es de suponer que la razón de esta discrepancia radique en la diferente relevancia biológica de los estímulos empleados. Mientras que los objetos empleados no desencadenan respuestas neofóbicas (Ennaceur et al., 2009) y su exploración induce consecuencias neutras para el organismo, las soluciones gustativas producen neofobia y su ingestión induce consecuencias internas relevantes

(Scott, 2011). En el mejor de los casos, la ingestión de la solución gustativa restablece el equilibrio hídrico en animales privados de agua. En el mismo sentido, Ennaceur (Ennaceur, 2010) ha puesto en tela de juicio la validez de la “preferencia por la novedad” como índice de la memoria de reconocimiento, ya que existen casos en que puede hablarse de “preferencia por la familiaridad”, especialmente cuando se trata de estímulos amenazantes, como sería el caso del sabor desconocido. Este autor destaca que el estímulo amenazante atrae la atención sin que exista aproximación física.

Por otra parte, tanto la memoria visual del objeto como la memoria gustativa del sabor incluyen elementos adicionales al estímulo empleado sobre aspectos de la situación en la que se experimentó durante la sesión de familiarización. Ello se pone de manifiesto en tareas modificadas de reconocimiento visual que exploran la memoria del lugar o el contexto en el que se presentó el objeto y el reconocimiento del objeto a través de otras modalidades sensoriales, tales como textura u olor. Del mismo modo, la memoria gustativa segura resulta afectada por cambios de contexto espacial y temporal (Morón et al., 2002; Manrique et al., 2004). Puede aplicarse la misma consideración de Ennaceur (Ennaceur, 2010) sobre la tarea SOR a la tarea de memoria de reconocimiento gustativa segura. La memoria de la sesión de adquisición implica el recuerdo de un episodio en la vida del animal, pero las tareas básicas sólo evalúan un aspecto de ese episodio, es decir, el recuerdo del objeto o del sabor. En conjunto, tanto la adquisición en un único ensayo como el hecho de que la memoria incluya aspectos de la situación que van más allá del estímulo empleado apoyan una visión de la memoria de reconocimiento tanto



## *Capítulo 1*

visual como gustativa como modelo de memoria episódica basada en el recuerdo más allá de la mera familiaridad.

Adicionalmente, existen diferencias procedimentales entre los modelos animales de reconocimiento de objetos y reconocimiento de sabores seguros que son propias de cada modalidad sensorial y ofrecen ventajas en el último caso.

En primer lugar, habitualmente la precisión en la descripción del estímulo resulta ser mayor en los estudios que emplean soluciones gustativas, lo que permite la replicación precisa. Además, la posibilidad de variar la concentración de la solución permite graduar la respuesta de ingestión con precisión.

En segundo lugar, es más fácil eliminar efectos de interferencia durante los periodos de retención en las tareas de memoria de reconocimiento gustativa. Mientras que resulta imposible evitar la exposición a estímulos visuales, salvo manteniendo a los animales en la oscuridad, es sencillo evitar la exposición a sabores en el agua disponible diariamente sin alterar el ciclo de luz-oscuridad y, por consiguiente, los ritmos biológicos.

Por último, los requisitos motores de las tareas de memoria de reconocimiento gustativa son menores de los que implican las tareas de memoria de reconocimiento de objetos, que al menos exigen desplazamiento en el campo abierto. Ello hace que sean aplicables en animales de edad avanzada sin que resulte afectada la respuesta ante la novedad. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que, en ausencia de experiencias aversivas previas con sabores, ratas envejecidas no difieren de adultas jóvenes en la magnitud de la respuesta neofóbica (Morón and Gallo, 2007). Sin embargo, en algunos casos las

ratas envejecidas muestran una reducción en los tiempos de exploración (Gámiz and Gallo, 2012) aunque frecuentemente no se describen diferencias (Burke et al., 2010; 2011; 2012).

En otro orden de cosas, tanto la memoria de reconocimiento visual como la memoria de reconocimiento gustativa y de sabores muestran plasticidad propia del desarrollo y efectos del envejecimiento.

Por una parte, las ratas envejecidas presentan deterioro de la memoria de reconocimiento de objetos a intervalos de retención de 24 h (Burke et al., 2010) e incluso a intervalos más cortos si los objetos empleados son complejos (Gámiz and Gallo, 2012).

Por otra parte, los cambios que el envejecimiento induce en la memoria gustativa presentan un panorama complejo. Mientras que la formación de memorias gustativas aversivas resulta potenciada, ciertos fenómenos de aprendizaje resultan deteriorados (Manrique et al., 2009b) y otros preservados (para una revisión véanse Manrique et al., 2007; Gámiz and Gallo, 2011b). Aunque se ha propuesto un incremento en neofobia gustativa asociado a la edad como explicación de la adquisición de aversiones más intensas en ratas envejecidas, lo cierto es los datos son controvertidos y no confirman definitivamente dicha potenciación de la neofobia. Mientras unos autores informan de neofobia potenciada a edades avanzadas (Collier et al., 2004) la mayoría no encuentran dicho efecto empleando una variedad de sabores (Gallagher and Burwell, 1989; Morón and Gallo, 2007; Manrique et al., 2009b). El estudio de la neofobia gustativa en las últimas etapas de la vida se complica

debido al efecto demostrado de las experiencias previas, especialmente si han sido aversivas (Morón and Gallo, 2007). Aunque el efecto potencial del envejecimiento en la neofobia gustativa es discutible, se ha descrito una mayor dificultad en ratas envejecidas para la formación de memoria de reconocimiento gustativa segura ya que la habituación de la neofobia es más lenta (Pelleymounter and Cullen, 1993).

### **3. Neuroanatomía de la memoria de reconocimiento**

#### **3.1. Vías anatómicas y memoria de reconocimiento visual**

El sistema visual permite identificar objetos discriminando diferencias de iluminación, formas, colores, velocidad de movimiento, direccionalidad y localización. Se ha estudiado fundamentalmente en gatos y primates debido a la similitud tanto de tamaño, agudeza visual y organización con el ojo humano. Actualmente se trabaja también con roedores y aunque tienen una baja resolución espacial es un buen modelo ya que permite trabajar con modelos transgénicos.

El ojo en mamíferos está compuesto por una capa externa protectora constituida por la esclerótica y sobre la cual se insertan los músculos oculares y la córnea. La luz atraviesa la córnea, el cristalino y la pupila se distribuye sobre la capa más interna del ojo, la retina, donde se forma una imagen menor, invertida y de dos dimensiones. La retina es la encargada de recibir la información visual y transduce la imagen gracias a las células fotorreceptoras, cuya información

información es modulada por otras células (horizontales, amacrinas, bipolares y ganglionares). Así, en la retina coexisten dos tipos de células fotorreceptoras: los bastones, responsables de la visión en condiciones de baja intensidad de luz, y un porcentaje muy reducido de conos, encargados de la percepción del color. En ratas se ha detectado dos tipos de conos, uno más abundante y correspondiente a la luz verde y otro menos abundante y sensible a la luz azul (Szel and Pálröhlich, 1992), teniendo por tanto una visión dicromática. Debido a la ausencia de fóvea, la visión del roedor está dedicada a la visión periférica y escotópica siendo muy eficaz a pesar de las limitaciones del tamaño del ojo.

La estimulación de los fotorreceptores se inicia por la absorción de la luz por el pigmento visual que conlleva a cambios conformacionales del pigmento excitado. Esto provoca cambios en la permeabilidad iónica y la formación del potencial que se transmite mediante los neurotransmisor alcanzando otras neuronas retinianas. Los fotorreceptores en la oscuridad se encuentran despolarizados y emiten glutamato, mientras que con iluminación, están hiperpolarizados y dejan de emitir dicho neurotransmisor.

Las aferencias implicadas en la detección de la imagen visual viajan a través de los axones de las células ganglionares que constituye el nervio óptico. En ratas, la mayoría de estas fibras nerviosas cruzan la línea media del cerebro hasta llegar al otro hemisferio (Polyak, 1957). Estas fibras establecen sinapsis en los colículos superiores (intervienen en el control del tamaño de la pupila y el movimiento de los ojos) y en el núcleo geniculado lateral del tálamo, cuyos axones se proyectan al corteza visual primario (Sefton et al., 2004). Adicionalmente, el núcleo supraquiasmático del hipotálamo recibe información

## *Capítulo 1*

difusa de luminosidad que interviene en la sincronización de los ritmos biológicos.

Las eferencias de las cortezas visuales primaria y secundarias se distribuyen a lo largo de dos vías especializadas en el procesamiento de la imagen y de sus características espaciales que están situadas en el lóbulo temporal y parietal respectivamente. Otras áreas del lóbulo temporal medial han sido implicadas en aspectos complejos del procesamiento visual tales como la memoria de reconocimiento. Así, el hipocampo ha sido relacionado con la memoria de la localización de objetos mientras que la corteza perirrinal ha sido identificada como una zona importante para la memoria de reconocimiento del objeto (Kolb et al., 1994; Mumby and Pinel, 1994; Aggleton et al., 1997; Barnes et al., 2000).

### **3.2. Corteza perirrinal y memoria de reconocimiento de objetos**

El hecho de que las tareas de memoria de reconocimiento de objetos en animales surgieran como modelo para estudiar la amnesia humana inducida por daño del lóbulo temporal medial (Winters et al., 2010) ha dirigido la atención de los investigadores desde el principio al papel de diversas áreas, tales como el hipocampo, corteza parahipocampal y perirrinal. En este sentido se ha producido una gran evolución desde los primeros estudios que atribuían un papel central al hipocampo hasta la actualidad en que los resultados obtenidos en roedores han inclinado el interés hacia la corteza perirrinal (Mumby, 2001; Broadbent et al.,

2004). Efectivamente, aunque existe debate sobre la función concreta de la corteza perirrinal, hoy en día está aceptado su papel crucial en los procesos implicados en las tareas de memoria reconocimiento de objetos, dados los hallazgos obtenidos empleando diversas técnicas y aproximaciones.

Existe un gran número de estudios de lesión que interrumpen la memoria de reconocimiento cuando se emplean tareas SOR con objetos fácilmente discriminables en roedores (para una revisión véase Warburton and Brown, 2010). El daño de la corteza perirrinal afecta a la memoria ya que la lesión no interfiere con la ejecución cuando se emplean dilaciones cortas de menos de cinco minutos. Se trata, por otro lado, de un efecto selectivo sobre los procesos de memoria implicados en la tarea SOR, ya que el daño de la zona no altera la ejecución en tareas de memoria espacial, como la tarea OLR. Sin embargo, las tareas de memoria de reconocimiento que requieren integrar una combinación de informaciones sobre el dónde y cuándo se presentó el objeto y la naturaleza del mismo, tales como las tareas OPR y TOR, resultan deterioradas en animales lesionados.

Asimismo, la evidencia con estudios de lesiones apoya una función adicional de la corteza perirrinal en procesos visuales perceptivos complejos, ya que, cuando se emplean objetos complejos que introducen ambigüedad en la discriminación, los déficits de ejecución se presentan incluso con dilaciones cortas (para revisiones del tema véanse Baxter, 2009 y Suzuki, 2009).

Del mismo modo, los estudios farmacológicos (revisados en Brown et al., 2012) confirman la participación de la corteza perirrinal lo que es relevante tanto

## *Capítulo 1*

en la tarea estándar SOR como en las modificaciones OPR y TOR. Aunque se requiere más investigación, los efectos de la inyección en la zona de antagonistas glutamatérgicos, colinérgicos y de canales de calcio dependientes del voltaje tipo-L sugieren la presencia de al menos dos procesos de plasticidad sináptica dissociables en el tiempo que tienen lugar en la corteza perirrinal. Ambos procesos se suceden durante la adquisición y se han propuesto como responsables del almacenamiento de la información requerida en la memoria de reconocimiento de objetos. Asimismo, se están identificando las cascadas intracelulares subyacentes a los procesos de consolidación en la zona.

Por último, el estudio en ratas de la activación neuronal en la corteza perirrinal mediante determinación inmunohistoquímica del gen inmediato temprano *c-fos* o de su producto la proteína *c-Fos* muestran un incremento del número de células marcadas durante la presentación de objetos novedosos frente a familiares. Aggleton y Brown (Aggleton and Brown, 2005) informaron que dicho incremento está relacionado selectivamente con la exposición a objetos, ya que cuando se emplean tareas que dependen de información espacial es el hipocampo el que muestra cambios en la expresión de *c-fos*. Ello es consistente con estudios previos del mismo grupo indicando que estímulos visuales novedosos inducen mayor activación que los familiares en la corteza perirrinal y otras zonas, pero no en el hipocampo (Zhu et al., 1995; 1996; Wan et al., 1999). Asimismo, empleando la tarea SOR compleja desarrollada por Albasser et al. (Albasser et al., 2010) que ha sido descrita previamente, se ha identificado que la mayor actividad *c-Fos* inducida por la presentación de objetos novedosos se restringe selectivamente a la porción caudal de la corteza perirrinal.

Adicionalmente se observa un patrón propio de activación de los subcampos hipocampales ante la novedad del objeto con incrementos de actividad en CA1 y CA3 frente a disminuciones en el giro dentado (Albasser et al., 2010). Según los autores, éste es el primer informe en el que se confirma simultáneamente la capacidad de los animales para discriminar entre los estímulos. De hecho, en estudios previos se han presentado a las ratas estímulos visuales consistentes en fotos (Zhu et al., 1995; Wan et al., 1999) sin pruebas comportamentales de su discriminabilidad.

### **3.3. Vías anatómicas y memoria de reconocimiento gustativa**

El procesamiento de un sabor se inicia en la cavidad orofaríngea con la activación de los receptores gustativos. Estas células receptoras gustativas junto con las células de sostén forman el órgano del gusto: el botón gustativo. Las partículas que componen los alimentos se disuelven con la ayuda de la saliva y alcanza de esta forma la membrana apical de las células receptoras específicas localizadas a lo largo de la lengua, del paladar, la epiglotis, la pared posterior de la orofaringe y la entrada de la laringe.

Estudios de registro de la actividad neuronal de las células gustativas han demostrado que responden a la presencia de distintos estímulos gustativos, aunque cada célula responda con mayor intensidad a un tipo de estímulos (Chandrashekar et al., 2006). Así, los sabores salados y ácidos producen iones, iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) en el primer caso e iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) en el segundo, que



## *Capítulo 1*

atraviesan los canales iónicos de las células receptoras. La entrada de carga positiva dentro de la célula provoca una despolarización y por consiguiente, la liberación de los neurotransmisores. Los  $H^+$  además de entrar directamente en la célula, también pueden bloquear los canales de  $K^+$  o unirse a los receptores facilitando la abertura del canal iónico y la entrada de iones cargados positivamente. Por su parte los sabores dulce, amargo y el glutamato monosódico (umami) actúan a través de receptores de membrana acoplados a proteína G. La unión molécula-receptor provoca a través de la proteína G, la activación de adenilato-ciclasa que produce AMPc a partir de ATP. El aumento de AMPc citosólico activa a la proteína quinasa que fosforila y bloquea a los canales de potasio y permite la apertura de canales de calcio. También los segundos mensajeros median la liberación del ion calcio del retículo endoplasmático conduciendo a la despolarización de la célula y a la liberación de los neurotransmisores.

La información gustativa es recogida por la corda timpánica, una rama del nervio facial (VII par craneal) y los nervios glosofaríngeo (IX) y vago (X) los cuales establecen sinapsis con las células receptoras de las papilas gustativas y convergen en la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NTS), siendo éste el primer relevo sináptico de la información gustativa (Yamamoto, 2006). En roedores, el NTS manda proyecciones al núcleo parabraquial (PBN) situado en el puente (Reilly, 1999) y desde esta región la información gustativa se dirige a la corteza insular gustativa (IC) y a la amígdala (AM) bien directamente mediante proyecciones ipsilaterales monosinápticas y recíprocas, o bien a través de proyecciones sobre la región parvocelular del núcleo ventroposteromedial del

tálamo (VPM) o tálamo gustativo (Morillas et al., 2013). La corteza insular es un área multimodal capaz de integrar varios aspectos de la información, ya que sus neuronas no sólo responden a los sabores, sino también a la temperatura, al tacto, al dolor y al estado de las vísceras. La respuesta organizada por grupos de neuronas en esta corteza, permite procesar e integrar todas las características contenidas en un alimento, y además, compararlas con la información almacenada previamente. Por su parte, AM juega un papel relevante a la hora de procesar el valor hedónico, no sólo de lo que se come, sino de una gran gama de experiencias.

Los primeros estudios sobre los sustratos neurales de la memoria de reconocimiento gustativa segura pueden atribuirse a Bures y Buresova, que en la década de 1970 demostraron que diversas intervenciones, incluyendo anestesia general y depresión cortical propagada, interfieren con la atenuación de la neofobia (Bures et al., 1988; Buresova and Bures, 1977). En las décadas posteriores la mayor parte de la investigación se centró en el papel de IC en la codificación de la novedad. Diversos estudios identificaron correlatos corticales de la novedad y familiaridad gustativa en esta zona (para revisiones de los hallazgos durante el siglo XX véase Gallo et al., 1999; Bermudez-Rattoni, 2004). Posteriormente se obtuvieron datos que apoyaban la implicación de AM en la neofobia gustativa (Reilly and Bornovalova, 2005; Figueroa-Guzmán and Reilly, 2008; Lin et al., 2009; 2012) y se han ampliado los conocimientos sobre la función de IC y los mecanismos neuroquímicos relevantes en la consolidación de la memoria gustativa con especial participación del sistema colinérgico (Neseliler et al., 2011) y glutamatérgico. La visión actual propone que la memoria gustativa

segura puede depender de una representación neural del sabor almacenada en varias regiones cerebrales (Pedroza-Llinas et al., 2009). Los resultados apuntan a que la adquisición y consolidación de la memoria de reconocimiento gustativa segura requiera la interacción entre IC (Naor and Dudai, 1996; Ferreira et al., 2002; Gutierrez et al., 2003) y AM (Guzmán-Ramos and Bermúdez-Rattoni, 2011) con otras áreas cerebrales, tales como el núcleo accumbens, hipocampo dorsal, núcleos talámicos (Yamamoto and Ueji, 2011) y la corteza perirrinal (Pedroza-Llinas et al., 2009). Efectivamente, además de IC y AM las tareas de aprendizaje y memoria gustativa parecen implicar la participación de otras estructuras que reciben aferencias gustativas ya sea de una forma directa o indirecta como el núcleo accumbens (Pedroza-Llinás et al., 2009), corteza prefrontal medial (Groenewegen and Uyling, 2000), hipotálamo (Rolls et al., 1986), corteza orbitofrontal (Rolls, 2000; 2004) y corteza perirrinal (De la Cruz et al., 2008).

### **3.4. Papel de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento de sabores**

Los escasos informes publicados hasta la fecha indican la posibilidad de impedir la habituación de la neofobia gustativa mediante la inactivación temporal de la corteza perirrinal aplicando inyecciones locales de anisomicina, inhibidor de la síntesis proteica (De la Cruz et al., 2008). La microinyección bilateral se aplicó después de la ingestión de una solución novedosa de sacarina (0.3%) durante 15 minutos. En una sesión de prueba realizada al día siguiente el grupo sometido a la

inactivación reversible de PRh no mostró incremento en el consumo, comportándose, a diferencia del grupo que recibió inyección de vehículo, como si no hubiera probado antes el sabor. Un resultado similar se obtuvo inactivando el hipocampo dorsal.

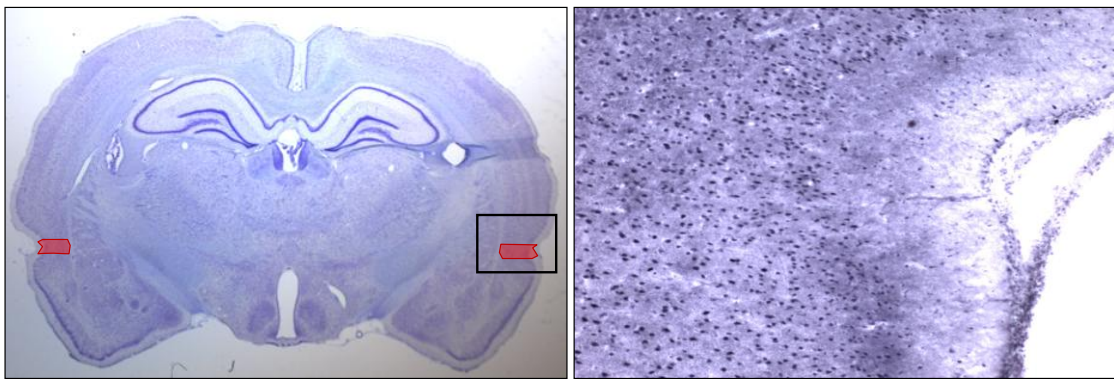
Asimismo, microinyecciones bilaterales de escopolamina, antagonista de los receptores muscarínicos colinérgicos, en PRh impiden la formación de la memoria gustativa segura si se aplican inmediatamente después de la ingestión de una solución novedosa de sacarina (0.5%) (Gutierrez et al., 2004). Estos datos sugieren que la neurotransmisión colinérgica en la corteza perirrinal está implicada en la memoria de reconocimiento gustativo.

### **3.5. Implicación de la corteza perirrinal en memoria de reconocimiento de objetos y gustativa: una comparación**

Una comparación de los efectos de las lesiones, intervenciones farmacológicas y registro de la actividad en la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento en sus modalidades visual y gustativa pone de manifiesto la posibilidad de que existan mecanismos compartidos a pesar de tratarse de tipos de memoria considerados tradicionalmente de distinto rango. La evidencia publicada hasta el momento, a pesar de ser escasa con respecto a la modalidad gustativa, apunta a que en ambos casos la lesión de PRh interfiera con la ejecución de las tareas de memoria de reconocimiento. Aunque existe múltiples informes sobre el efecto de lesiones perirrinales sobre la memoria de reconocimiento de objetos (para una revisión Warburton and Brown, 2010), sólo

## Capítulo 1

se ha publicado un trabajo empleando lesiones reversibles en el caso de la modalidad gustativa (De la Cruz et al., 2008). Del mismo modo, los estudios farmacológicos indican que la neurotransmisión colinérgica en PER es esencial tanto para el reconocimiento de estímulos visuales (Brown et al., 2012; Warburton et al., 2003) como gustativos (Gutierrez et al., 2004). Por último, tanto las tareas de memoria de reconocimiento visual como gustativas inducen activación de c-Fos en la corteza perirrinal (Figura 4).



**Figura 4.-** Izquierda: sección coronal del cerebro de la rata teñida con Violeta de Cresilo (2X) en la que se destaca la corteza perirrinal. Derecha: Microfotografía de la corteza perirrinal (20X) mostrando células activadas durante la memoria de reconocimiento mediante tinción inmunohistoquímica de la proteína c-Fos.

Sin embargo, los resultados sugieren también disociaciones interesantes. De hecho, el déficit inducido por las lesiones de PRh responsable de la incapacidad para ejecutar correctamente las tareas de memoria de reconocimiento parece ser de naturaleza diferente en la modalidad visual y gustativa. En el caso de la memoria de reconocimiento gustativa, la inactivación temporal de PRh después de la sesión de familiarización interrumpe la atenuación de la respuesta neofóbica, haciendo que el animal responda al sabor familiar como si fuera desconocido (De la Cruz et al., 2008). En el caso de la memoria de reconocimiento de objetos se ha propuesto que el déficit consiste en

la imposibilidad de detectar la novedad, de manera que los animales lesionados se comportan durante la prueba como si los dos objetos fueran familiares (Morón and Gallo, 2007). A esta conclusión se ha llegado, empleando un procedimiento *ad hoc* con un laberinto en Y (McTighe et al., 2010), puesto que una revisión de las publicaciones sobre el efecto de lesiones perirrinales en ratas empleando la tarea SOR estándar pone de manifiesto la imposibilidad de obtener conclusiones en este sentido. La razón viene dada por el hecho de que habitualmente se emplean tasas sin informar de los datos brutos sobre el tiempo de exploración de cada objeto en la prueba. Ello impide la comparación con el tiempo de exploración del objeto novedoso durante la sesión de adquisición (Aggleton et al., 1997; Winters et al., 2004; Barker et al., 2007; Mumby et al., 2007). Además, aunque se informe de los tiempos de exploración durante la familiarización, dado que su duración es típicamente mayor que la de la prueba, no se dispone de datos correspondientes a periodos comparables.

Esta discrepancia puede estar relacionada con el hecho de que la respuesta exploratoria ante la novedad del estímulo es opuesta en función de que se trate de un objeto o de un sabor. En el primer caso, el incremento en la respuesta exploratoria se interpreta como índice de la detección de la novedad del estímulo, mientras que en el segundo es la ausencia o reducción de la respuesta de ingestión la que indica que el sabor ha sido detectado como nuevo. Por ello, también es opuesta la respuesta que refleja la detección de familiaridad en la siguiente presentación. Como se ha mencionado antes, ello aboga a favor de la propuesta de Ennaceur (Ennaceur, 2010) de evitar el uso del término “preferencia por la novedad” como sinónimo de memoria de reconocimiento, uso

que está muy extendido en la actualidad. La comparación de los efectos opuestos de intervenciones cerebrales sugiere que puede tratarse de una cuestión que va más allá de discusiones terminológicas y que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

#### **4. Mecanismos moleculares de la memoria de reconocimiento gustativa**

El proceso de atenuación de la neofobia es el reflejo de la formación de una memoria gustativa segura que ha sido propuesto como un tipo de memoria de reconocimiento (Bermudez-Rattoni, 2004). De igual manera que ha sucedido con otros tipos de memoria, el avance en los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares de este tipo de memoria se ha beneficiado de la utilización de modelos de plasticidad sináptica tales como el fenómeno fisiológico de potenciación a largo plazo (LTP) (Bliss and Lomo, 1973) que ha sido relacionado con la consolidación de los recuerdos. La inducción de LTP requiere la participación de receptores de membrana glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) y  $\alpha$ -animo-3-hidroxy-5-methylisoxazolepropionate (AMPA). Ello induce inducen señales intracelulares que se van amplificando a través de las proteínas quinasas y en último extremo activan a los factores de transcripción, modificando por una parte la respuesta de los receptores de membrana y por otra, la expresión génica para inducir plasticidad a largo plazo. El fenómeno LTP ha sido especialmente estudiado en el hipocampo (HC) debido por una parte a la naturaleza accesible del circuito trisináptico de la formación hipocampal que

puede estudiarse tanto in vivo como in vitro y por otra al papel crítico que juegan la formación hipocampal y estructuras relacionadas del lóbulo temporal en diversos tipos de memoria espacial y de reconocimiento visual, clasificadas como memoria declarativa. Así, se acepta que la expresión génica, la síntesis de nuevas proteínas y los cambios morfológicos asociados son necesarios también para el tipo de plasticidad sináptica subyacente a la consolidación de la memoria. Con respecto a la memoria gustativa, en primer lugar se ha descrito LTP mediada por receptores glutamatérgicos en áreas no hipocampales relacionadas tradicionalmente con la formación de la memoria gustativa, tales como la corteza insular (IC) y la amígdala (AM). En segundo lugar, no puede descartarse la participación del hipocampo y áreas temporales tales como la corteza perirhinal en la memoria gustativa como indican estudios previos (Gallo et al., 1999; Manrique et al., 2009). Por ello, el estudio de los mecanismos moleculares de la memoria de reconocimiento gustativa se beneficia de estos planteamientos.

#### **4.1. Teoría de la consolidación, memoria a largo plazo y mecanismos celulares**

La teoría de la consolidación de la memoria, propuesta por Müller y Pilzecker en 1900 (Müller and Pilzecker, 1900), planteaba que los recuerdos inicialmente persisten en un estado lábil y se van estabilizando lentamente a lo largo del tiempo (McGaugh, 2000). La teoría estaba apoyada inicialmente por estudios con seres humanos en los que la adquisición de nueva información interfiere con el recuerdo de aquella aprendida recientemente. Posteriormente, la



## *Capítulo 1*

teoría sirvió para explicar la aparición de amnesia retrógrada como consecuencia del daño cerebral y de la aplicación de electroshock en pacientes, de modo que únicamente resultaban afectados los recuerdos relativamente recientes pero no los antiguos bien consolidados. Como indica McGaugh (2000) en su revisión de la evolución de la teoría a lo largo del siglo XX, la propuesta de Hebb y Gerard en 1949 (Gerard, 1949; Hebb, 1949) acerca de la existencia de dos estados de memoria haciendo referencia a una memoria a corto plazo que da lugar a la memoria a largo plazo fue apoyada inicialmente por la posibilidad de eliminar recuerdos recientes pero no antiguos mediante la inhibición de la síntesis de proteínas en modelos animales. Los presupuestos fundamentales de la teoría se mantienen en vigor hoy en día ya que una variedad de estudios en animales muestran la posibilidad de interferir o favorecer la consolidación de la memoria aplicando tratamientos farmacológicos en un periodo de tiempo posterior al entrenamiento que va desde segundos hasta horas (Izquierdo et al., 2002). La discusión actual radica en el número de etapas dissociables durante el proceso de consolidación y reconsolidación (Sara and Hars, 2006), etapas que parecen estar organizadas en paralelo y no secuencialmente como inicialmente se propuso dada la posibilidad de actuar experimentalmente sobre ellas de forma independiente.

La evolución de la teoría de la consolidación se ha beneficiado de los planteamientos asociados tanto a la hipótesis de los múltiples sistemas de memoria como a la hipótesis que asocia la plasticidad sináptica a la memoria (revisado en Colombo, 2004). Por un lado, la idea de que la memoria no es una facultad unitaria sino que es posible distinguir entre diversos tipos de memoria

disociables surgió a partir de la evidencia clínica con pacientes amnésicos con daño hipocampal que mostraban preservada la capacidad de aprender y retener información, aunque no fueran conscientes de ello. Los estudios de Brenda Milner con el paciente H.M. fueron paradigmáticos en este sentido (Milner, 2005 para una revisión). Hoy en día se acepta que la adquisición, consolidación y recuperación de los recuerdos requiere la orquestación de circuitos neurales que involucran diversas áreas dependiendo del tipo de memoria de que se trate. Aunque existen diversas propuestas, predominan las clasificaciones que distinguen entre memoria dependiente del hipocampo versus memorias no hipocampales (Colombo, 2004; Squire, 2004). Independientemente de la clasificación propuesta a la hora de organizar los tipos de memoria, se acepta que la consolidación de la memoria requiere un complejo entramado de circuitos cerebrales que sufren modificaciones inducidas por la experiencia tanto en serie como en paralelo. Por otra parte, la hipótesis que asocia plasticidad sináptica y memoria se origina en la teoría de Donald Hebb y domina los planteamientos actuales que dirigen el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la memoria. La hipótesis plantea que son las modificaciones en el número y fuerza de determinadas sinapsis en las estructuras que forman los mencionados circuitos las que codifican y almacenan la información. Así, la formación de recuerdos implica cambios en la conectividad de los circuitos de memoria que dependen de las capacidades plásticas de las neuronas. En este sentido Donald Hebb desarrolló una amplia teoría fisiológica para explicar el comportamiento humano, proponiendo el patrón de actividad de grupos de neuronas o "asamblea celular" como unidad funcional. En su teoría el aprendizaje y la memoria se basan

## *Capítulo 1*

en el establecimiento de patrones de actividad en circuitos neuronales. Estos patrones de actividad implican cambios más o menos permanentes en la fuerza de las conexiones, siendo la variable relevante la contigüidad temporal. De esta forma, grupos de neuronas que son activadas consistentemente al mismo tiempo o en una relación temporal determinada se asocian formando un patrón de actividad que tiende a reproducirse cuando una de ellas es activada (Neel, 1977). En la actualidad se están desentrañando los mecanismos moleculares responsables de estos cambios que, en último extremo producen alteraciones en la liberación del neurotransmisor así como cambios funcionales y morfológicos en la estructura de la sinapsis (Izquierdo et al., 2006; Middei et al., 2014). De nuevo, buena parte de la investigación se ha centrado en las propiedades plásticas de las sinapsis glutamatérgicas hipocampales. De hecho, se han relacionado con determinados tipos de memoria modelos de plasticidad sináptica identificados inicialmente en la formación hipocampal tales como el fenómeno fisiológico de potenciación a largo plazo (LTP) (Bliss and Lomo, 1973) o depresión a largo plazo (LTD). El hecho de que parezcan existir mecanismos celulares y moleculares compartidos entre estos fenómenos y procesos de aprendizaje y memoria de muy distinta naturaleza ha permitido grandes avances en la actualidad. Así, los datos apoyan la existencia de mecanismos comunes conservados a través de la evolución por los que la experiencia modula la plasticidad sináptica para almacenar diversas memorias (sensibilización versus memoria espacial) en distintos niveles de organización del sistema nervioso (circuito sensorial versus hipocampo) y distintas especies (*Aplysia* versus ratón)

(Barco et al., 2006). Por ello, la investigación de los procesos implicados en LTP ha resultado crucial para comprender la formación de los circuitos de memoria.

## **4.2. Mecanismos moleculares de la potenciación a largo plazo como modelo de plasticidad sináptica**

La inducción del fenómeno de potenciación a largo plazo, que, en último extremo, conlleva una alteración de la actividad postsináptica y/o presináptica, provocando un incremento de respuesta sináptica específica requiere un incremento de la concentración de calcio dependiente de la activación del receptor glutamatérgico NMDA que a su vez inicia procesos de señalización intracelular calcio-dependientes (Coogan et al., 1999).

Se ha demostrado que los receptores glutamatérgicos, tipo NMDA, son esenciales para la iniciación del fenómeno de LTP. Se trata de receptores que detectan las relaciones entre los inputs que la célula recibe, siendo especialmente sensibles a determinadas condiciones de estimulación, tales como la estimulación de alta frecuencia y la estimulación asociativa en la que un estímulo de menor intensidad o eficacia precede a otro de mayor intensidad o eficacia con unos precisos parámetros temporales. Durante la transmisión sináptica de baja frecuencia el glutamato se une tanto al receptor NMDA como al AMPA. La activación de los receptores AMPA es responsable de la despolarización de la membrana. Los receptores NMDA, aunque son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , poseen un bloqueo voltaje-dependiente por el ión  $\text{Mg}^{2+}$ . Es necesaria la despolarización previa de la membrana para la expulsión del  $\text{Mg}^{2+}$  por repulsión de cargas,

## *Capítulo 1*

permitiendo la entrada de calcio. Así, un estímulo o input puede despolarizar la membrana permitiendo que el input posterior active a los receptores NMDA aunque la despolarización que indujo no haya alcanzado el umbral para producir un potencial de acción.

Las consecuencias de la activación de los receptores NMDA son múltiples pero en cualquier caso incrementan o potencian el efecto que el estímulo inicial induce en la célula. El incremento intracelular de la concentración de calcio produce la activación de quinasas dependientes de calcio (MAPKs, SAPKs, MAPKAKs, p38MAPK,...). Una vez activadas, por una parte fosforilan a los receptores AMPA aumentando así la sensibilidad al glutamato y por otra parte, fosforilan factores de transcripción expresados constitutivamente, tal como AMPc response element binding (CREB). Estos, a su vez, regulan tanto factores de transcripción inducibles, tales como c-Fos, zif268, Arc, etc,...), como genes de respuesta tardía que codifican receptores, sinapsinas y proteínas estructurales que producen cambios funcionales y estructurales en las sinapsis (Lechner et al., 1999).

Así, el mantenimiento y la expresión de LTP requieren la participación de los receptores AMPA. El tráfico postsináptico de los receptores AMPA posee un papel crucial en la regulación de la fuerza sináptica (Anggono and Huganir, 2012; Bassani et al, 2013) así como en la estabilización de LTP. Los receptores AMPA están formados por cuatro subunidades: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, que se combinan formando tetrameros. La subunidad GluR2 es crítica ya que determina las propiedades biofísicas de los receptores AMPA, tales como la cinética (Geiger et al., 1995), la conductancia (Swanson et al., 1997), el bloqueo por poliaminas

endógenas (Bowie et al., 1995) y la permeabilidad al calcio (Burnashev et al., 1992). Esta permeabilidad, es baja cuando los receptores AMPA presentan GluR2. Esto es debido a un proceso de edición del ARNm de esta subunidad que provoca la sustitución de un aminoácido neutro, glutamina, por una arginina cuya carga positiva impide el paso del ión calcio. Cuando se induce LTP se produce una rápida incorporación en la sinapsis de los receptores AMPA carentes de GluR2 y por lo tanto, permeables al calcio. Esta incorporación es transitoria y son reemplazados por los receptores AMPA con GluR2 después de la inducción del LTP (Isaac et al., 2007).

Tanto la migración de los receptores AMPA a la zona sináptica como su retirada, influyen en la eficacia de la sinapsis durante el mantenimiento de LTP (Barry and Ziff, 2002; Song and Huganir, 2002; Kessels and Malinow, 2009). Se ha propuesto que existe un tráfico controlado de estos receptores desde las zonas no sinápticas hasta los sitios de sinápsis (Lynch and Baudry, 1984; Nishimune et al., 1998; Song et al., 1998; Noel et al., 1999; Lüscher et al., 1999; Malinow et al., 2000). Se trata de un proceso basado en la interacción entre proteínas intracelulares con regiones específicas del dominio C-terminal de la subunidad GluR2 (Nishimune et al. 1998). En particular, destaca la interacción entre la proteína de fusión N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) con GluR2, siendo crucial esta unión para la estabilización de los receptores AMPA en la membrana sináptica (Nishimune et al., 1998; Song et al., 1998; Luscher et al., 1999; Noel et al., 1999). NSF es una ATPasa conocida principalmente por el papel que juega en los procesos generales de fusión de membranas (Rothman, 1994; Whiteheart et al., 1994) y de vesículas con neurotransmisores (Schweizer et al., 1998). Sólo

## *Capítulo 1*

recientemente se ha identificado como una pieza clave en la regulación de los receptores AMPA (Osten et al., 1998; Song et al., 1998; Noel et al., 1999) y en la transmisión sináptica mediada por dichos receptores (Nishimune et al., 1998, Song et al., 1998, Noel et al., 1999, Lüscher et al., 1999). De hecho, el papel propuesto para la proteína PKMzeta en el mantenimiento de LTP (Pastalkova et al., 2006) parece estar mediado por su acción persistente sobre la interacción NSF/GluR2 impidiendo la eliminación de los receptores NMDA que contienen GluR2 (Migues et al., 2010). Así, el bloqueo de la interacción entre NSF/GluR2 mediante pep2m impide la persistencia de LTP una hora después de inducirla e invierte el efecto 3 y 5 horas después (Yao et al., 2008).

### **4.3. Neurotransmisores y memoria de reconocimiento gustativa**

Aunque más estudiado en el hipocampo, el fenómeno LTP ha sido descrito en una variedad de áreas cerebrales incluyendo las que forman parte del circuito neural responsable de la memoria gustativa. Así, ha sido descrito en la amígdala (Escobar and Bermudez-Rattoni, 2000; Yasoshima et al., 2005; Sigurdsson et al., 2007) y en la corteza insular (Escobar et al., 1998; Gal-Ben-Ari and Rosenblum, 2012). En IC la adquisición de aversiones gustativas condicionadas induce LTP (Rodríguez-Durán and Escobar, 2014). En este circuito sensorial la transmisión glutamatérgica juega un papel relevante desde los primeros relevos de la información gustativa procedente de la cavidad oral en el tronco cerebral (Bielavska et al., 2000) hasta la corteza gustativa (Gal-Ben-Ari and Rosenblum,

2012) y la amígdala (Touzani et al., 2013). Efectivamente, los receptores NMDA parecen estar implicados tanto en la formación de la memoria gustativa aversiva (Welzl et al., 1990; Aguado et al., 1994; Walker and Scully, 1996; Ferreira et al., 2002) como en el proceso de habituación de la neofobia (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Figueroa- Guzmán et al., 2006; Figueroa-Guzmán and Reilly, 2008) aunque no siempre la implicación de los receptores NMDA con este tipo de memoria es directa (Gutiérrez et al., 2003).

Junto al glutamato, que ha sido el más estudiado, la participación de otros neurotransmisores parece jugar un papel crítico en la memoria gustativa (Gal-Ben-Ari and Rosenblum, 2012). Así, se ha relacionado la respuesta a la novedad del sabor con incrementos en los niveles de acetilcolina en IC (Miranda et al., 2000) mientras que la inactivación del núcleo basal magnocelular, origen de fibras colinérgicas, interfiere con la adquisición de aversiones gustativas condicionadas (Miranda and Bermúdez-Rattoni, 1999). Por otro lado, estudios que han empleado triple marcaje para identificar la activación de interneuronas gabaérgicas en IC han demostrado actividad específica asociada a la presentación de estímulos novedosos en las capas profundas de la corteza insular disgranular (Doron and Rosenblum, 2010).

La coparticipación de otros sistemas de neurotransmisión durante la adquisición, mantenimiento y consolidación de memorias gustativas, ya sean aversivas, apetitivas o seguras, ha sido descrita en otras áreas que forman parte del sistema gustativo. Así, se ha demostrado que la adquisición de preferencias gustativas condicionadas requiere la co-activación de receptores NMDA y



dopaminérgicos (Touzani et al., 2013), en aversión gustativa condicionada y en habituación de la neofobia (David et al., 2014).

#### **4.4. Procesos intracelulares y memoria de reconocimiento gustativa**

De acuerdo con la propuesta de considerar el fenómeno LTP como modelo de los cambios plásticos subyacentes a la memoria, se han identificado una serie de mecanismos moleculares compartidos entre dicho fenómeno y la memoria gustativa.

Entre otras cascadas de acontecimientos intracelulares destaca la mediada por la vía enzimática MAPK/ERK. La actividad del grupo ERK (del inglés “extracelular signal-regulated kinase”) de la familia MAPK (del inglés “mitogen-activated protein kinases”) en IC y AM parece ser necesaria para distintas formas de memoria, incluyendo memoria de reconocimiento gustativa (Adaikkan and Rosenblum, 2012; Gal-Ben-Ari and Rosenblum, 2012; Castillo and Escobar, 2011). Como revisan Adaikkan y Rosenblum (2012), estudios previos demuestran que la memoria de reconocimiento gustativa segura (también denominada “novel-taste learning” por estos autores) induce la fosforilación y activación de diversos miembros de la vía MAPK. Efectivamente, el inicio del proceso de habituación de la neofobia gustativa durante el segundo día de exposición, pero no la presentación de un sabor completamente familiar después de cuatro exposiciones, incrementa la activación de ERK1/II. Otras familias de quinasas cuya activación en el núcleo parabraquial (Krivanek, 1996; 1997; 2001), IC

(Rodríguez-Durán and Escobar, 2014) y AM (Lin et al., 2010; Know and Houpt, 2012) parece ser necesaria para la memoria gustativa, especialmente para la adquisición de aversiones gustativas condicionadas, son  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipid-dependent protein kinase (PKC), cAMP-dependent protein kinase (PKA) y  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CamKII).

Estas quinasas fosforilan directa o indirectamente al factor de transcripción CREB (cAMP-response-element binding protein) lo que hace que se una a CRE (cAMP-response-element) que a su vez se liga a CBP (CREB-binding protein) formando un complejo que regula la transcripción de determinados genes tal como c-fos entre otros genes inmediatos tempranos (Adaikkan and Rosenblum, 2012). Por una parte, aunque los datos son escasos, se ha informado de incrementos en la activación de CREB en relación con memoria gustativa en el hipocampo (Yefet et al., 2006), IC y AM (Swank, 2000). Por otra parte, la activación de c-fos asociada a la adquisición de aversiones gustativas condicionadas se ha descrito en IC (Wilkins and Bernstein, 2006; Bernstein and Koh, 2007; Doron and Rosenblum, 2010) y AM (Lamprecht and Dudai, 1996; Yasoshima et al., 2006; Lin et al., 2012).

Mención especial merece la isoforma atípica de PKC denominada PKMzeta que muestra actividad automantenida debido a la carencia de la subunidad reguladora. A diferencia de otras quinasas cuya contribución a la consolidación de la memoria parece limitada a una ventana temporal durante el proceso de estabilización, la actividad persistente de PKMzeta ha sido propuesta como el mecanismo responsable de mantener los cambios sinápticos y los recuerdos a largo plazo de manera permanente (Sacktor, 2011). Aunque recientemente han

## *Capítulo 1*

surgido posturas críticas con este planteamiento (Kwapis and Helmstetter, 2014; Volk et al., 2013), se ha acumulado gran cantidad de evidencia que apoya el papel crítico de PKMzeta en diversas áreas cerebrales para el mantenimiento de LTP y memoria espacial (Pastalkova et al., 2006), así como de diversos tipos de memorias clasificadas tanto como declarativas como no declarativas (Serrano et al., 2008; Cohen et al., 2010; Madroñal et al., 2010; Von Kraus et al., 2010). Del mismo modo, la actividad de PKMzeta en el hipocampo dorsal es necesaria para la memoria de reconocimiento de la localización de un objeto (Hardt et al., 2010) y resulta alterada por la familiaridad del contexto (Moncada and Viola, 2008). Con respecto a la memoria gustativa, la actividad de PKMzeta en IC se ha relacionado repetidamente con el mantenimiento de aversiones gustativas aprendidas (Shema et al., 2007; 2009; 2011) y nuestro grupo ha obtenido datos que apoyan la participación de la actividad de PKMzeta en AM en el mantenimiento de la memoria gustativa durante la adquisición de aversiones aprendidas (Gámiz and Gallo, 2011a).



## **Capítulo 2**

### ***Justificación y Objetivos***

---



Se ha propuesto que los mecanismos celulares y moleculares responsables de la memoria de reconocimiento son compartidos por diversos tipos de memoria y por fenómenos plásticos como la potenciación a largo plazo (Barco et al., 2006). Los escasos datos existentes sobre la memoria de reconocimiento gustativa se centran en áreas que forman parte del circuito sensorial específico, tales como la corteza gustativa insular (IC) y la amígdala (AM), y fundamentalmente emplean aversiones condicionadas al sabor. Estos estudios indican que, además de los procesos implicados en la formación y consolidación de la memoria, parecen existir mecanismos dependientes de la proteína quinasa atípica PKMzeta que subyacen al mantenimiento a largo plazo de la memoria gustativa (Sacktor et al., 2007, 2009, 2011; Gámiz and Gallo, 2011). Dicho mecanismo implica la participación crucial de NSF en la regulación de las subunidades del receptor AMPA tal y como se ha investigado en otras modalidades de memoria. Sin embargo, apenas existe información sobre las claves moleculares de la habituación de la neofobia ni sobre su relación con la neuroanatomía subyacente.

Estudios de lesiones apoyan la participación de la corteza perirrinal (PRh) tanto en la memoria de reconocimiento visual como en la gustativa. Efectivamente, la lesión permanente de PRh interrumpe la memoria de reconocimiento de objetos (Winters et al., 2008; Brown et al., 2010; Kealy and Commins, 2011). En cuanto al papel de PRh en la memoria gustativa, inyecciones de anisomicina, inhibidor de la síntesis de proteína (De la Cruz et al., 2008), o escopolamina, antagonista de los receptores muscarínicos colinérgicos (Gutierrez et al., 2004), interfieren con la habituación de la neofobia.

Sin embargo los únicos estudios inmunohistoquímicos dirigidos a evaluar la actividad de PRh durante la memoria de reconocimiento, mediante la determinación de la expresión de c-fos, han sido realizados en tareas de reconocimiento de objetos. Los datos indican que la actividad de PRh, aumenta durante la presentación del objeto novedoso frente al objeto familiar en una tarea memoria de reconocimiento visual (Aggleton and Brown, 2005; Brown and Bank, 2014). Es de esperar que se produzcan cambios similares en la actividad y en la expresión de diversos genes relacionados con la consolidación de la memoria en PRh durante el procesamiento de sabores en función de su familiaridad.

Por otra parte, la actividad de PRh durante la atenuación de la neofobia en relación con la modalidad gustativa debe depender de aferencias procedentes de dicho circuito sensorial. En efecto, varios estudios han apoyado la implicación de la amígdala basolateral (BLA) en la neofobia gustativa mostrando que lesiones de BLA impiden la formación de la memoria gustativa (Bermudez-Rattoni, 2004). Por tanto, queda por explorar el efecto potencial de la lesión de BLA en la actividad de PRh.

Por último, el envejecimiento representa una oportunidad única de estudiar los efectos que la plasticidad asociada a la edad producen en PRh y como se relacionan con la dificultad en la formación de memorias gustativas seguras durante la habituación de la neofobia a edades avanzadas (Pelleymounter and Cullen, 1993).



Por ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1) Evaluar la actividad de PRh, mediante la determinación inmunohistoquímica de la proteína c-Fos, durante la ingestión bien de un sabor novedoso bien de un sabor familiar. Se hipotetiza que existirán diferencias significativas en la actividad de la zona en función de la familiaridad. Si la habituación de la neofobia al sabor produce en PRh efectos similares a la familiarización con un objeto, entonces es de esperar un incremento en la actividad asociado a la novedad (Capítulo 3).
- 2) Explorar el efecto de la lesión de BLA sobre la actividad de PER asociada a la familiaridad del sabor. Si BLA y PRh forman parte del mismo circuito, entonces la actividad de PRh durante la atenuación de la neofobia al sabor dependerá de la integridad de BLA. Es de esperar, por tanto, que la lesión de BLA interfiera con la habituación de la neofobia y la actividad asociada a la familiaridad del sabor en PRh (Capítulo 3).
- 3) Cuantificar la expresión de NSF y otros genes asociados a la consolidación de la memoria gustativa durante la habituación de la neofobia. Si PKMzeta juega un papel en la habituación de la neofobia similar al descrito en memoria de reconocimiento de objetos y aversiones gustativas, entonces se registrarán

alteraciones en los niveles de expresión de NSF en función de la familiaridad del sabor (Capítulo 4).

- 4) Investigar el efecto del envejecimiento sobre el patrón de actividad de PRh en relación con la familiaridad del sabor. Es de esperar que el envejecimiento altere el proceso de habituación de la neofobia gustativa y ello se relacione con cambios en la actividad de PRh (Capítulo 5).

## Capítulo 3

*Basolateral amygdala lesions  
attenuate safe taste memory-  
related c-fos expression in the rat  
perirhinal cortex*

---



## **ABSTRACT**

---

Previous results indicated that damage and pharmacological inactivation of the basolateral amygdala (BLA) interfere with the attenuation of taste neophobia. A similar disruption of safe taste memories formation induced by the inhibition of protein synthesis in the perirhinal cortex (PRh) has been reported.

Thus, we have assessed the effect of bilateral BLA neurotoxic lesions on PRh activity after novel and familiar taste exposure. Wistar male rats with NMDA lesions of the BLA and SHAM-operated received two consecutive exposures to a 3% cider vinegar solution. Fos-like immunoreactivity (FLI) was examined as a marker of neuronal activity in PRh. As expected the BLA lesioned group showed no evidence of neophobia attenuation. A similar number of PRh Fos-positive cells were found in SHAM and BLA groups exposed to the novel taste solution. However, the BLA-lesioned group exhibited a lower number of Fos stained cells than the SHAM-lesioned group after being exposed to the familiar taste solution. This supports the notion of BLA and PRh as components of a neural circuit involved in safe taste recognition memory and suggests a role of PRh in various forms of recognition memory.



## **1. INTRODUCTION**

Taste neophobia defined as the reluctance to consume unfamiliar tastes is used as a novelty index in rats. When the ingestion of a novel taste solution is not followed by negative consequences it becomes recognized as safe. Safe taste recognition memory leads to increased consumption of familiar tastes (habituation of neophobia) and it retards the acquisition of later aversive memories (latent inhibition).

Distinct neural circuits and underlying molecular mechanisms have been proposed for safe and aversive taste recognition memory (Bermúdez-Rattoni, 2004). Several brain areas seem to be involved in safe taste recognition memory. Previous studies have found that lesions and pharmacological treatments that inhibit protein synthesis or block neurotransmitter receptors impair the attenuation of taste neophobia when applied into the insular cortex (Gutiérrez et al., 2003; 2004; Figueroa-Guzmán et al., 2006), accumbens nucleus (Pedroza-Llinas et al., 2009), hippocampus (De la Cruz et al., 2008) , basolateral amygdala (Figueroa-Guzmán and Reilly, 2008) and perirhinal cortex (Gutiérrez et al., 2004; De la Cruz et al., 2008; Gutierrez and Simon, 2011).

Among these areas the basolateral amygdala (BLA) has been extensively investigated. The results indicate that BLA is required for safe taste memory evidenced either in attenuation of neophobia (Figueroa-Guzmán and Reilly, 2008) or in latent inhibition (Miranda et al., 2003; Traverso et al., 2010). However the BLA specific role in taste processing which is relevant for safe taste recognition memory remains unclear. Although not always found (Lovaglio et al.,

2010), the fact that BLA lesions have been reported to impair taste neophobia (Kiefer and Grijalva, 1980) has prompted explanations of the BLA role in safe and aversive taste memory related with taste novelty detection (Lin et al., 2009; Reilly and Bornovalova, 2005). Accordingly, increased expression of the immediate early gene c-fos as an index of neuronal activity has been reported after consumption of a novel taste solution in BLA (Koh and Bernstein, 2005).

Meanwhile the perirhinal cortex (PRh) has been related with the detection of familiarity (De la Cruz et al., 2008). In agreement with the results supporting the PRh involvement in visual recognition memory (Winters et al., 2008; Brown et al., 2010; Kealy and Commins, 2011) blockade of the perirhinal cholinergic muscarinic receptors by infusion of scopolamine (Gutiérrez et al., 2004; Gutiérrez and Simon, 2011) and inhibition of protein synthesis in the area by anisomycin (De la Cruz et al., 2008) prevents the habituation of taste neophobia. Although changes in the pattern of PRh c-fos expression have been reported after object recognition memory (Zhu et al., 1996; Wan et al., 1999; Aggleton and Brown, 2005; Albasser et al., 2011a; Vanelzakker et al., 2011) to the best of our knowledge no previous work has assessed Fos-like immunoreactivity (FLI) in the area after safe taste recognition memory.

In order to explore the relevance of a potential interaction between BLA and PRh for safe taste memory a behavioural procedure leading to habituation of taste neophobia was applied to rats receiving either BLA neurotoxic lesions or SHAM lesions. FLI in PRh after drinking either a novel or a familiar taste solution was determined. In addition, the primary auditory cortex and dorsal hippocampus were examined as control areas.



## 2. MATERIALS AND METHODS

Twenty male Wistar rats were assigned to two experimental groups: BLA (n=10) and SHAM (n=10). They were housed individually and maintained on a 12/12 hour light-dark cycle with food *ad libitum*.

All the rats were anesthetized (Dolethal: 0,05 ml/100g) and mounted on a stereotaxic apparatus (Stoelting Co.Instruments, Word Dale, IL, USA). Injection needles (30 gauge) connected to 10 µl Hamilton microsyringes were inserted in the BLA at the following coordinates: AP: -3; ML: ±4.8; DV: -8 (Paxinos and Watson, 1998) in order to administer 1µl of either NMDA (BLA group) or vehicle (SHAM group) per hemisphere at a rate of 0.5 µl per min using an injection pump (Harvard, USA).

After a week recovery the water access was restricted to one daily 15 minutes drinking session in their home cages for the next 4 days. On day 5 and 6 water was substituted by a cider vinegar solution (3%) and the amount ingested was recorded.

For immunohistochemical staining half of the animals in each group were deeply anesthetized with pentobarbital (200 mg/Kg) and perfused with 4% formaldehyde 90 min after drinking the novel taste solution on day 5 and half of them after drinking the familiar taste solution on day 6. The brains were removed and postfixed for 48 hours and then transferred to a 30% sucrose solution overnight. Coronal sections were cut at 20µm in a cryostat (Leica, CM1900). Two series of sections were collected for applying Cresyl Violet staining to identify the lesion site and immunohistochemistry for Fos-positive cell counting. After rinsed

*Basolateral amygdala lesions attenuate safe memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex*

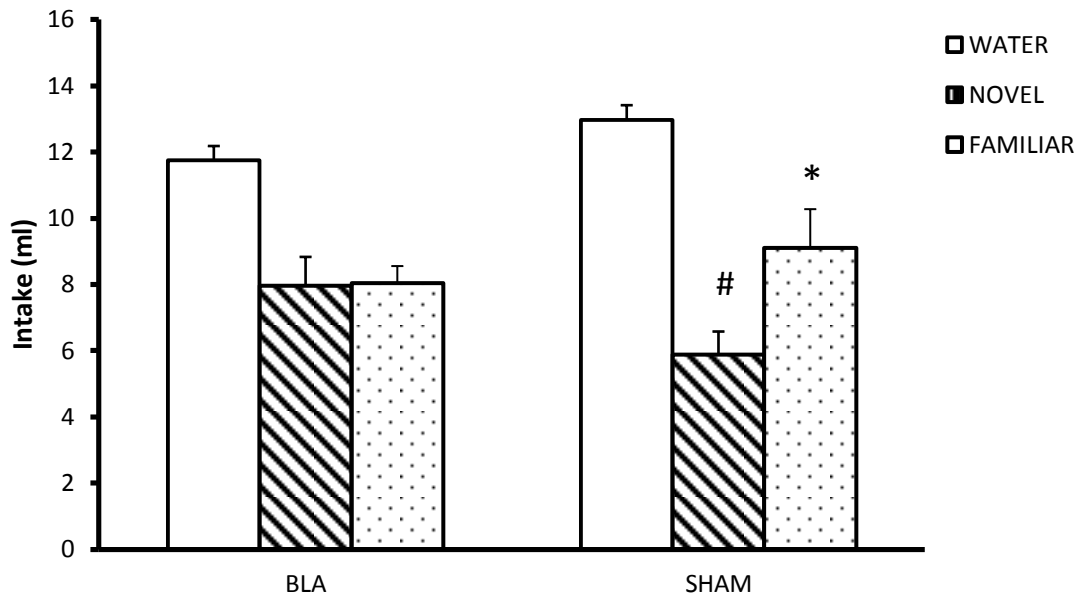
in phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated for 20 minutes with 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to block endogenous peroxidase activity. Afterwards, sections were incubated in 3% normal goat serum for 30 min and 0.4% Triton X-100 in PBS. Slices were transferred to c-Fos primary rabbit polyclonal antibody (1:10000; Santa Cruz Biotechnology) for 48 hours at 4°C. After being rinsed with PBS several times, they were incubated in a secondary antibody containing goat anti-rabbit IgG (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 120 min at room temperature. Sections were rinsed, processed using the ABC kit (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Reaction was visualized using peroxidase substrate kit (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

The Neurolucida system (Neurolucida, MicroBrightField Bioscience, USA) was used to count the number of Fos positive cells using a microscope with a motorized stage interfaced to a computer. This program allowed us to delineate, using an X4 objective, an area covering the medial PRh (mean: 1317763,500  $\mu\text{m}^2$ ) and to count the number of cells identified in this area. FLI was also determined in two additional control areas of a similar extent and located at the same A-P coordinates level: primary auditory cortex (AU1) (mean of 1911636  $\mu\text{m}^2$ ) and dorsal hippocampus (DH), including dentate gyrus as well as CA1, CA2 and CA3 fields (mean of 1511431,062  $\mu\text{m}^2$ ). Counts were taken from 3 consecutive sections. A mean of the two hemispheres per section was estimated. All the procedures were approved by the University of Granada Ethics Committee for Animal Research and were in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

### 3. RESULTS

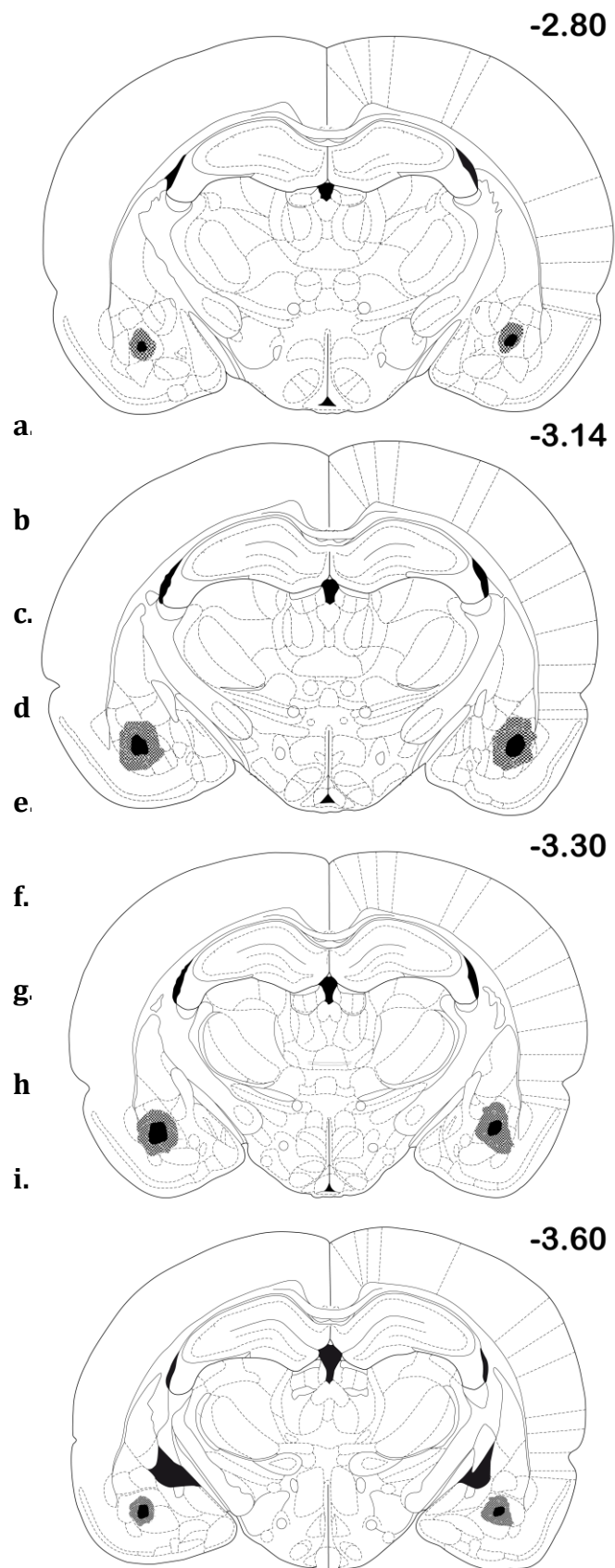
Figure 1 show mean ( $\pm$  SEM) consumption of water during the last baseline session and cider vinegar solution during the first and second exposure session by BLA and SHAM groups. A 2(lesion) x 3 (day) ANOVA analysis yielded a significant interaction lesion x day ( $F [2, 16]=4.92, p<0.05$ ). The analysis of the interaction indicated that the BLA lesioned group drank a higher amount of the unfamiliar cider vinegar solution during the first drinking session ( $F [1, 18]=5.56, p<0.05$ ) while no significant differences were found between the groups in water intake during the baseline or the familiar taste solution consumption on the second exposure. However, the neophobic response to the cider vinegar solution was evident in both groups since a decreased intake in comparison with the water baseline was found both in BLA ( $F [1,9]=10.52, p<0.01$ ) and SHAM ( $F [1,9]=109.90, p<0.01$ ) groups. Nonetheless only the SHAM group exhibited attenuation of neophobia indicated by a significant increase in consumption of the familiar taste solution during the second exposure with respect to the first one ( $F [1, 4]=14.27, p<0.05$ ). Thus, consistent with previous reports the BLA lesioned group exhibited a reduced neophobic response and impaired attenuation of taste neophobia.

*Basolateral amygdala lesions attenuate safe memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex*



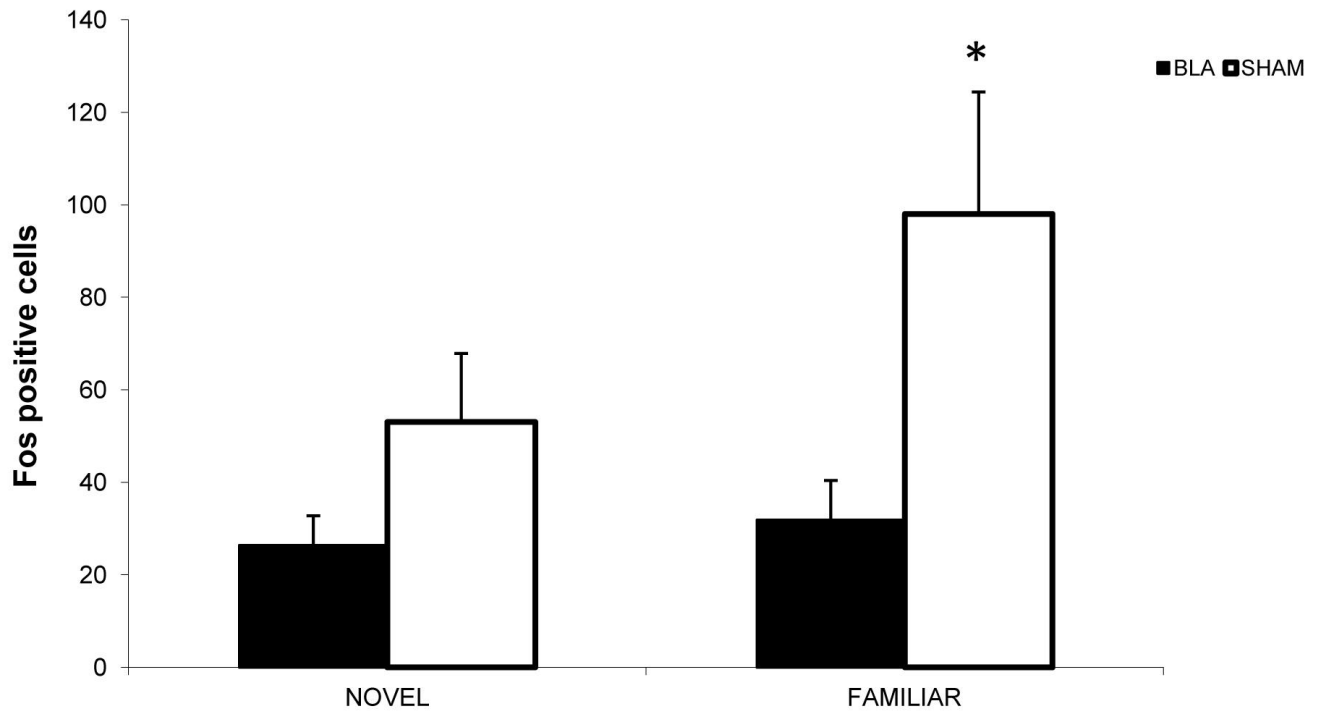
**Figure 1.-** Mean ( $\pm$ SEM) solution intake during the last day of water baseline (empty bars), the first (striped bars) and the second exposure (dotted bars) to the cider vinegar solution. \* Novel versus familiar taste solution intake by the SHAM group ( $p < 0.05$ ); # SHAM versus BLA groups' intake of the novel taste solution ( $p < 0.05$ ).

Histological examination evidenced amygdala damage centred in the basolateral nucleus in all the BLA lesioned subjects. The lesions were placed centrally in BLA sparing the ventral striatum and partially affecting the medial pyriform cortex in two cases (Figure 2). However the pyriform cortex was largely intact even in these cases. Both the perirhinal cortex and the entorhinal were spared.

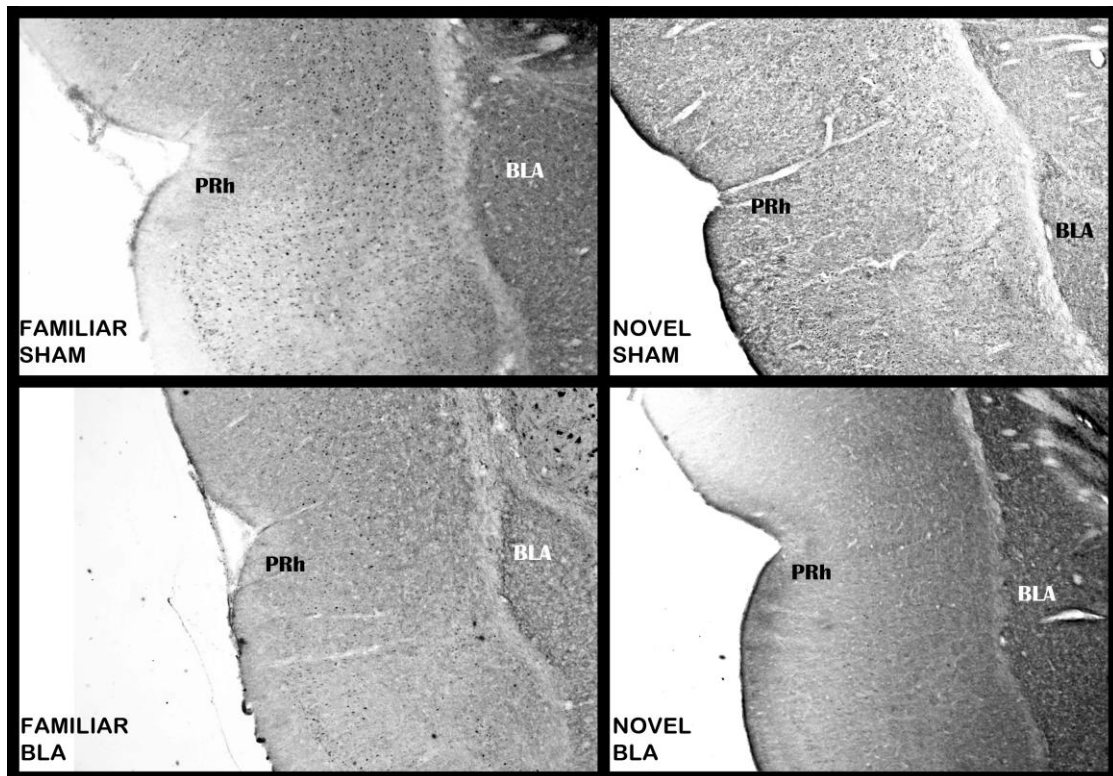


**Figure 2.-** Diagrammatic reconstruction of the amygdala lesion, showing the maximum (gray shaded) and minimum (black) extent of the damage. The numbers indicate the A-P coordinates from bregma according to the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 1998).

In accordance to the behavioural results BLA lesions reduced FLI in PRh (Figure 3). A 2 (lesion) x 2 (familiarity) ANOVA analysis of the number of Fos-positive cells yielded a main significant lesion effect ( $F [1, 12]=11.73, p<0.01$ ), indicating a higher number of stained cells in SHAM than BLA groups. Neither the main effect familiarity ( $F [1, 12]=3.47, p>0.05$ ) nor the interaction ( $F [1,12]=2.13, p>0.1$ ) were significant. The reduced FLI in the lesioned groups is consistent with previous reports (Vann and Albasser, 2009). However, post hoc planned comparisons by one-way ANOVAs showed that the difference was due to decreased c-fos expression in the BLA lesioned group after drinking the familiar cider vinegar solution ( $F [1, 5]=7.43, p<0.05$ ). However, there were no differences related with taste familiarity in the number of stained cells in the SHAM group ( $F [1,5]=2.54, p>0.1$ ). There were no differences between BLA and SHAM groups FLI in the PRh after drinking the novel taste solution. No such differences were evident in the control areas (DH and AU1) examined. Figure 4 displays representative microphotographs showing Fos-positive cells in each of the four experimental conditions.



**Figure 3.-** Mean ( $\pm$ SEM) counts of Fos-positive cells in the perirhinal cortex after drinking the novel and the familiar solution in the BLA (black) and SHAM (white) groups.



**Figure 4.-** Representative photomicrographs showing stained Fos-positive cells within the perirhinal cortex after the consumption of the novel versus the familiar solution in the SHAM and BLA lesioned groups. Abbreviations: basolateral nucleus of the amygdala (BLA) and perirhinal cortex (PRh).

#### **4. DISCUSSION**

Therefore, the results indicate that BLA bilateral lesions reduced FLI induced by the familiar cider vinegar solution in the PRh. This supports the notion that BLA and PRh are interdependent components of a neuronal network involved in safe taste memory. A FLI non-specific increase related with drinking behaviour or taste processing in the PRh can be discarded because there were no differences between the groups after being exposed to the novel taste during the first drinking session.

To our knowledge this is the first report relating immediate early gene expression and taste in the PRh. Previous studies in rats have found increased fos expression in the PRh when presented with novel visual objects (Aggleton and Brown, 2005; Albasser et al., 2011a; Aggleton and Brown, 1999; Zhu et al., 1996). Our results point to an involvement of the medial PRh also in the detection of taste familiarity. This is in accordance with previous studies demonstrating that protein synthesis (De la Cruz et al., 2008) and cholinergic neurotransmission (Gutiérrez et al., 2004; Gutiérrez and Simon, 2011; Tinsley et al., 2011) in the same PRh portion are required for stabilization of safe taste memories. Hence, the present data represents additional evidence to previous research that has established the crucial role of the PRh in object recognition memory (Winters et al., 2008; Brown et al., 2010; Kealy and Commins, 2011) and support an additional involvement of the area in taste recognition memory. Since similar increments of the Arc protein expression are induced by familiar rather than novel taste solutions in the insular cortex (Morin et al., 2011), it is conceivable



that the PRh might contribute to a widespread neural network involved in safe taste memory consolidation.

The approach applied, which combines lesion and FLI assessment used as a neuronal activity marker, has proven to be fruitful in order to delineate interdependent components of neural circuits involved in aversive taste memory (Jenkins et al., 2006; Mungarndee et al., 2008; Clark and Bernstein, 2009). Given the wide anatomical afferent projections relaying highly processed multisensory information to the PRh and its connections with the hippocampus, a similar approach has been used to map neuronal networks involved in spatial working memory (Jenkins et al., 2006). Also, a comparable design has been applied to explore the effect of hippocampal inactivation by anisomycin on the reported taste familiarity-induced Arc increase in the insular cortex (Morin et al., 2011). To this respect a main finding of the present study is the fact that amygdala lesions affect the fos expression in PRh reducing significantly FLI during detection of taste familiarity. This stands by the PRh as being a component of the neural circuit required for safe taste memory. The extensive anatomical reciprocal connections of the perirhinal cortex, the hippocampal formation, the insular cortex and BLA (Kealy and Commins, 2011) might be the substrate underlying its role in recognition memory. In fact, functional efferent projections from to the perirhinal cortex to BLA have been shown by electrophysiological studies (Kealy and Commins, 2011). The perirhinal cortex in turn receives reciprocal connections from BLA.

The fact that BLA lesions interfere with the formation of safe taste memories is consistent with previous results applying permanent lesions or

temporary inactivation of the area. Consistent with previous data the behavioral results obtained in the present experiment do not allow us to clearly dissociate the effect of the lesion either on the neophobic response (Kiefer and Grijalva, 1980; Reilly and Bornovalova, 2005) or the formation of the safe memory trace. Two main findings should be taken into account. First, BLA lesioned rats drank a higher amount of the novel cider vinegar solution than SHAM-lesioned animals, thus evidencing a reduced neophobic response. This is consistent with previous reports showing that BLA lesions affected the neophobic response (Kesner et al., 1992). However, these authors found absence of the neophobic response while the BLA group in the present study reduced their intake in comparison with the water baseline, thus indicating taste neophobia. This discrepancy could be due to the high neophobic response induced by the vinegar solution used in the present study while Kesner et al. applied grape juice (Kesner et al., 1992). Second, the reduced neophobic response cannot explain the absence of the attenuation of neophobia since the neophobic response was evident and there are no reasons for a ceiling effect. In addition, the disruption of the attenuation of neophobia found in BLA group is consistent with ample evidence supporting a role of the area in the formation of the safe taste memory (Miranda et al., 2003; Figueroa-Guzman and Reilly, 2008; Traverso et al., 2010).

Whatever the contribution of BLA lesion-induced deficits in processing taste novelty and familiarity might be, the results indicate that they are interfering with the PRh activity related with safe taste recognition memory. Thereby, the requirement of the BLA functional integrity for both the detection of taste familiarity and FLI in the PRh supports the involvement of medial temporal

lobe mechanisms in this type of memory. It has previously been proposed that different medial temporal lobe networks might be involved in safe and aversive recognition memory (De la Cruz et al., 2008). We have previously shown the hippocampal role in aversive taste memory provided that complex learning tasks are used (Gallo et al., 1999; Manrique et al., 2009). The present results support a distinct mechanism relying on the amygdala and perirhinal cortex for safe taste memory. Since the amygdala is known to be a component of the neural circuits involved in the formation of safe taste memories (Bermudez-Rattoni, 2004) it is conceivable that it might play distinct roles being a component of independent taste memory systems.

## **ACKNOWLEDGMENT**

---

Supported by the research projects HUM 02763 (Junta de Andalucía. Spain), PSIC2008-03933, (MICINN. Spain), PSIC2011- 23702 and PhD fellowships to B. Gómez-Chacón and F. Gámiz (MICINN, Spain).

## Capítulo 4

*Taste memory-related  
N-ethylmaleimide-sensitive factor  
expression in basolateral amygdala  
and perirhinal cortex*

---



## **ABSTRACTS**

---

Previous research has shown basolateral amygdala (BLA) dependent activity changes in the perirhinal cortex (PRh) during the formation of taste memory which might be linked to PKM $\zeta$  role in regulating AMPA receptors trafficking mediated by interactions between GluR2 and N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF). We have found increased expression of NSF gene in BLA and PRh after drinking a familiar saccharin solution. No changes in the expression of GluR2, Homer1 and Narp genes were found. The results suggest the relevance of a potential network in the temporal lobe for taste recognition memory and open new possibilities for understanding the molecular mechanisms.





## 1. INTRODUCTION

Taste neophobia refers to the reluctance to ingest novel tasting edibles. As long as the taste has no negative consequences, a learning process called habituation of neophobia takes place, leading to increased consumption when the taste is recognized as safe. Safe taste memory in the rat has been proposed as a model of recognition memory useful for studies of the molecular substrates of memory (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Consolidation of safe taste memories has been linked to protein synthesis in temporal lobe areas, including the perirhinal cortex (PRh) and hippocampus (HC) (De la Cruz et al., 2008). A relevant role of glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA) has also been previously proposed. Thus, blocking NMDA receptors with MK-801 disrupts safe taste memory formation (Figueroa-Guzmán and Reilly, 2008). Moreover, we have previously reported that BLA lesions disrupt both the attenuation of taste neophobia and familiarity-related changes in PRh activity (Chapter 3). These results suggest the relevance of changes in synaptic efficacy in a temporal network, including BLA and PRh, for the consolidation and maintenance of safe taste memories. Postsynaptic trafficking of AMPA receptors plays a crucial role in regulating synaptic strength and memory (Anggono and Huganir, 2012; Bassani et al., 2013). Thus, the stabilization of long-term potentiation (LTP) and memories involves synaptic addition of GluR2 subunit-containing AMPA receptors (AMPA receptors) from the extrasynaptic pool. Switching from GluR2-lacking AMPARs, inserted in the synapses after LTP induction, to GluR2-containing AMPARs is mediated by interactions between GluR2 and N-ethylmaleimide factor (NSF) (Martin et al., 2006; Yang et al., 2010). Disrupting

NSF-GluR2 interaction by inhibitory peptides in the lateral amygdala impaired long-term fear conditioned memory (Joels and Lamprecht, 2010) and, in the dorsal hippocampus, interfered with long-term contextual fear memory and object-location recognition memory (Migues et al., 2014).

One of the mechanisms proposed for maintaining both LTP in the hippocampus (Sacktor et al., 1993; Sacktor, 2008; 2011; 2012) and a variety of memories (Pastalkova et al., 2006; Shema et al., 2007; Serrano et al., 2008; Shema et al., 2011) relies in an atypical protein kinase termed protein kinase Mzeta (PKM $\zeta$ ). We have found that inhibition of PKM $\zeta$  by an inhibitory peptide (ZIP) in the BLA attenuates conditioned taste aversion suggesting interference with the formation of a safe taste memory (Gámiz and Gallo, 2011). Since it has been demonstrated that PKM $\zeta$  maintains hippocampal LTP (Yao et al., 2008) and amygdala-dependent fear memory (Migues et al., 2010) by regulating GluR2-dependent AMPARs trafficking, it could be proposed that NSF/GluR2 interactions in temporal areas might be involved in safe taste recognition memory.

In the present experiments we investigated both the behavioral performance and the expression profile of NSF and GluR2 genes in BLA, HC and PRh after exposure to a saccharin solution during the first (novel), the second (familiar I) and the sixth presentation (familiar II). In addition expression of the synaptic plasticity related immediate early genes, Homer1 and Narp, was also assessed.

## 2. MATERIALS AND METHOD

Twenty eight naïve male Wistar rats (7 week of age, mean: 275 g) were used. They were housed individually and maintained on a 12-hour light-dark cycle (lights on at 08:00 h). Rats were given food *ad libitum* and water until the experiment started when water access was restricted. Animals were randomly distributed in three experimental groups: 1) rats sacrificed after the initial experience drinking the sodium saccharin solution on day 1 (Novel group, n=7); 2) rats sacrificed after drinking the familiar taste solution on day 2 (Familiar I, n=7); 3) a group of rats control sacrificed after drinking the familiar taste solution on day 6 (Familiar II, n=7) (Table 1). Only the consumption of the Familiar II groups was taken into account for the behavioral analysis.

**Table 1.-** Timeline depicting the experimental procedure (n=number of animals per group, Sac= 0.4% saccharin solution, †= sacrifice 30 min after the drinking period).

Groups	Days	1	2	3	4	5	6
Novel		Sac † n=7 5.21 ± 0.86					
Familiar I		Sac 5.32 ± 1.15	Sac † n=7 18.33 ± 2.44				
Familiar II		Sac 7.21 ± 1.30	Sac 16.53 ± 1.75	Sac 16.23 ± 1.07	Sac 17.34 ± 1.13	Sac 17.96 ± 1.48	Sac † n=7 18.60 ± 1.62

Behavioral testing took place in the home cages. During the acclimation to the deprivation schedule, water intake was recorded for nine days during the morning 20 minutes drinking period. Once the water intake baseline (BL) was

*Taste memory-related N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in basolateral amygdala and perirhinal cortex.*

stabilized, the rats received access to a 0.4% sodium saccharin solution during the next six daily drinking sessions. The rats were sacrificed 30 minutes after the drinking period at different days depending on the group they were assigned, i.e., the first day (Novel), the second day (Familiar I) and the sixth day (Familiar II) (Table 1). All the procedures were approved by the University of Granada Ethics Committee for Animal Research and were in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

Following the behavioral testing, animals from each group were anesthetized with isoflurane and sacrificed by decapitation. The brain was removed quickly and the PRh, HC and BLA were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissues were stored at -80°C until used.

Total RNA was extracted from samples by homogenization using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocols. Total cDNA was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA). Reverse transcription was performed using 200 ng of total RNA from each sample. A solution-phase assay carried out in 96- and 384-well microplates (Applied Biosystems).

Gene expression was measured by quantitative PCR (qPCR) using Taqman gene expression assays. OpenArray® Real-Time PCR plate format 18(3x) x 48 was used. The gene expression assays included GluR2/Gria2 (Glutamate receptor 2) [Rn00568514\_m1], Homer1 (homer protein homolog 1) [Rn00581785\_m1], Narp/NPTX 2 (Neuronal pentraxin-2) and NSF (N-ethylmaleimide-sensitive) [Rn00572694\_m1]. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase)

[Rn01775763\_g1] and ACTB (Actin, beta) [Rn00667869\_m1] were used as endogenous controls. The OpenArray®AccuFill system was used for loading the sample into OpenArray® plates. The samples were analyzed by Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) using TaqMan® Gene Expression assays and OpenArray™ NT Cyclor (Applied Biosystems). PCR products are measured as the fluorescence signal after each cycle with the OpenArray® Real-Time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems, version 1.0.4). The Delta-Delta Comparative Threshold ( $\Delta\Delta Ct$ ) method was used to quantify the fold change between the samples (Livak and Schmittgen, 2001). The threshold-cycle (Ct) value of each target gene was normalized by subtraction of the Ct value from average of two housekeeping genes (beta-actin and GAPDH) as internal control ( $\Delta Ct = Ct_{Target} - Ct_{Control}$  genes). It was further normalized with the control group for obtaining the fold change (RQ). Threshold of 2.0 and maxCt of 35.

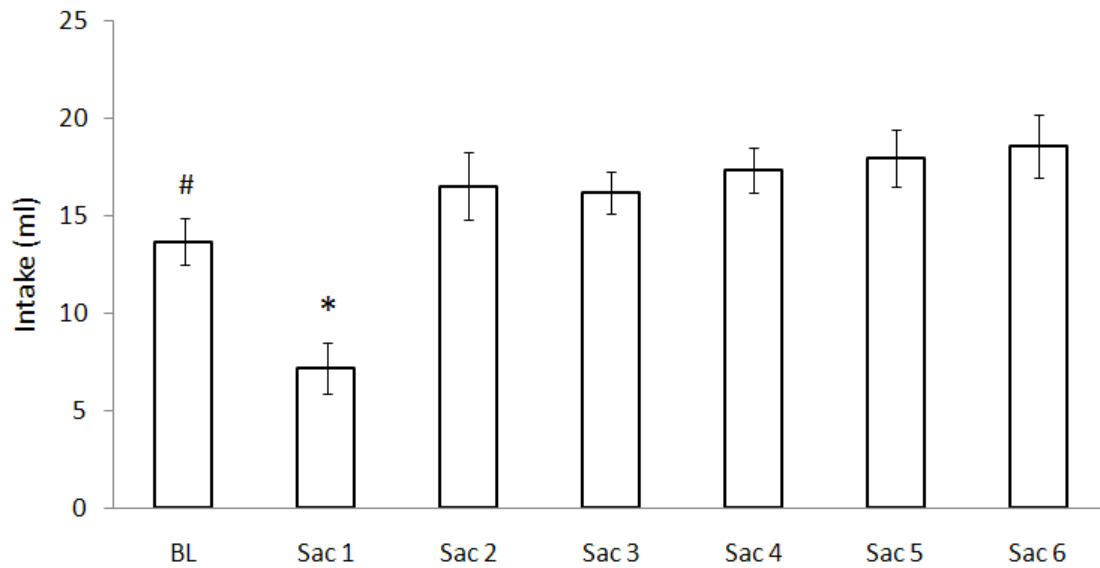
Repeated measures analyses of variance (ANOVAs) were used to analyze the consumption along the drinking sessions for animals that completed all sessions (i.e. Familiar II group). One way ANOVAs were performed to compare consumption of the different groups. Expression data analyses were performed using DataAssist™ software (Applied Biosystems, version 3.01). Relative Quantification (RQ) values (relative levels of RNA expression) were calculated using the comparative Ct method with endogenous controls to normalize the data. Extreme values ranging more than two standard deviations were removed from the sample as that might create artificial baseline levels of gene expression. Before analysis, the data were tested for distribution and found to be normally distributed. Repeated measures analyses of variance (ANOVAs) were used to

compare each gene expression in each brain zone. Post-hoc Fisher LSD test comparisons between the groups were used. Differences were considered as statistically significant at  $p < .05$ .

### **3. RESULTS**

Figure 1 shows mean ( $\pm$  SEM) consumption of water during the last baseline session and saccharin solution during the sixth exposure sessions. As mentioned above the statistical analyses across all sessions are based on the data of Familiar II groups since they were sacrificed after the end of the six daily saccharin solution drinking sessions. ANOVA for individual days indicated that the groups did not differ in water intake during the last baseline day ( $F(2,18) = 0.18$ ;  $p > .05$ ) nor in saccharin consumption on days 1 ( $F(2,18) = 0.99$ ,  $p > .05$ ) and 2 ( $F(1,12) = 0.36$ ;  $p > .05$ ). Mean ( $\pm$  SEM) saccharin intake by all the groups is shown in Table 1.

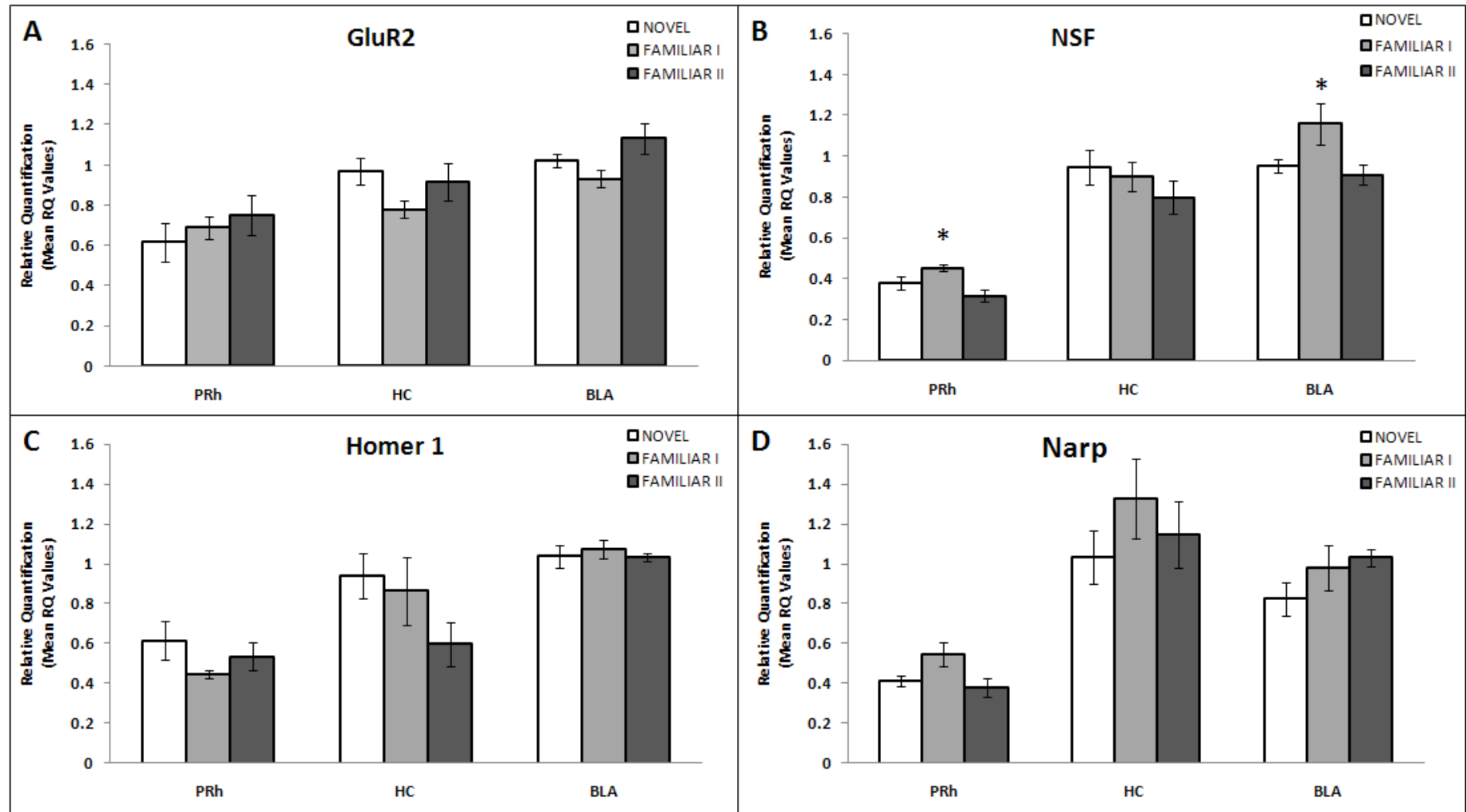
The neophobic response to the saccharin solution was evident as a significant ( $F(1,6) = 9.82$ ,  $p < .05$ ) decrease intake of saccharin solution on day 1 in comparison with the last baseline. A repeated measures ANOVA, performed on data from rats in Familiar II group (days 1-6), found a significant main effect of days,  $F(5, 30) = 9.73$ ,  $p < .001$ . Post hoc comparisons by Fisher LSD test revealed that intake on day 1 was significantly lower than on day 2, 3, 4, 5 and 6 ( $p > .05$ ), indicating the attenuation of neophobia.



**Figure 1.** - Mean ( $\pm$ SEM) intake during the last day of water baseline (BL) and the six saccharin solution (Sac) exposures. \* vs Sac 2,3,4, 5 and 6 ( $p < 0.05$ ); # vs Sac 1 ( $p < 0.05$ ).

Figure 2 shows the fold change values for the genes GluR2 (Fig. 2a), NSF (Fig. 2b), Homer1 (Fig. 2c) and Narp (Fig. 2d) in PRh, HC and BLA. Repeated measure ANOVAs revealed significant main effect of taste familiarity in the expression of NSF in PRh ( $F(2,14) = 7.34$ ;  $p < .05$ ) and BLA ( $F(2,14) = 3.81$ ;  $p < .05$ ). Fisher post-hoc analyses yielded significant up-regulation after the second taste exposure (Familiar I) compared with the sixth exposure (Familiar II) ( $p < .05$ ). A similar tendency was evident when establishing comparisons with the first taste presentation both in BLA ( $p < .062$ ) and PRh ( $p < .075$ ). No significant differences were found in HC. Likewise, there were no significant differences in any brain area regarding GluR2, Homer1 and Narp ( $ps > .05$ ).

*Taste memory-related N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in basolateral amygdala and perirhinal cortex.*



**Figure 2.** Fold Change values for the genes *GluR2* (Fig.2A), *NSF* (Fig.2B), *Homer1*(Fig.2C) and *Narp* (Fig. 2D) in PRh, HC, and BLA of Novel, Familiar I and Familiar II groups. \* vs Familiar II group ( $p < 0.05$ ).



#### **4. DISCUSSION**

It has been previously reported that NSF-GluR2 interaction in the dorsal hippocampus is required for a type of visual recognition memory including object-location information (Migues et al., 2014). To the best of our knowledge in the present study we show for the first time changes of NSF expression in BLA and PRh related with taste recognition memory. NSF expression in both areas is up-regulated when a safe taste becomes familiar after the second presentation in comparison with a later phase after six taste exposures leading to a well consolidated memory trace.

In accordance to a definition of the neophobic response to a novel taste, taking into account not only decreased consumption during the first encounter but also later increases upon subsequent exposures (Reilly and Bornolova, 2005), our behavioral results confirm neophobia to the saccharin solution since the rats drank a lower amount during the first exposure than during the previous water session and the subsequent saccharin presentation. Thus, attenuation of taste neophobia required only one exposure because there were no differences between the amounts drank along the subsequent five presentations. This is consistent with previous reports that applied a similar sodium saccharin concentration and number of taste expositions (Lin et al., 2012). The added sessions may have allowed long-term consolidation of taste memory.

Regarding the gene expression profiles the main finding merits discussion. NSF expression significantly increased during the second in comparison with the sixth taste presentation. Such an increase cannot be attributed to overall motor,

*Taste memory-related N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in basolateral amygdala and perirhinal cortex.*

sensory, or motivational effects associated with drinking the taste solution since there were no intake differences between the second and sixth drinking session. The fact that the significant increase in NSF expression takes place by the second taste exposure suggests a role of NSF in the consolidation of the safe taste memory since NSF expression decreases significantly by the sixth exposure in spite of the maintenance of the taste memory. A similar tendency for NSF to be up-regulated on the second day relative to the initial presentation of the novel saccharin solution suggests that an increase in NSF is not involved in the initial acquisition of the safe taste memory. This interpretation is consistent with the results reported by Joels and Lamprecht (2010) showing that NSF-GluR2 interaction was necessary during fear memory consolidation but not acquisition, retrieval or maintenance.

The selective regional distribution of the increased NSF expression in BLA and PRh, but not HC, supports the relevance of an amygdalar-perirhinal network in the formation of safe taste memories. Whilst the anatomical circuits that subserve the formation of aversive taste memories have been extensively investigated, especially the interaction between the insular cortex and the amygdala in the acquisition of conditioned taste aversion (Yamamoto et al., 2007; Gal-Ben-Ari and Rosenblum, 2012), the scarce data on brain areas involved in the attenuation of taste neophobia point to a crucial role of a network formed by BLA and PRh (Chapter 3). Extensive anatomical and electrophysiological evidence indicates reciprocal functional connections of the PRh, BLA and HC among other taste related areas which might be the substrate underlying its role in safe taste memory (Kealy and Commins, 2011). The fact that no changes of NSF expression

in HC have been found in the present study was expected. Although protein synthesis in the dorsal hippocampus has been reported to be involved in the formation of safe taste memories (De la Cruz et al., 2008), we have previously found no changes in dorsal hippocampus c-fos expression during attenuation of taste neophobia (Chapter 3). In turn, there is ample evidence supporting a selective hippocampal role in visual recognition memory in tasks that require the animal to remember the spatial location of the objects (Winters et al., 2008). Accordingly, disruption of NSF-GluR2 interaction in dorsal hippocampus by infusing the interference peptide pep2m impaired maintenance of object location recognition memory (Migues et al., 2014).

Since the proposed action mechanism of NSF for regulating AMPA trafficking lies in binding the AMPA receptor subunit GluR2 thus stabilizing postsynaptic transmission, the absence of changes in the pattern of GluR2 expression found in our study can be explained by the fact that this process is thought to involve mobilization of GluR2 subunits from extra-synaptic pools not requiring synthesis *de novo* during the temporal window (30 min) examined (Yang et al., 2010; Anggono and Huganir, 2012). Also the lack of changes in the expression of the immediate early genes Homer1 and Narp does not allow us to discard a potential involvement in taste memory formation unnoticed due to regional/temporal differences in consolidation. While Homer1 has been related with glutamatergic neurotransmission in the gustatory cortex (Gal-Ben-Ari and Rosenblum, 2012), a modest increase of Narp staining in the dentate gyrus has been found during object-location recognition memory (Soulé et al., 2008). However, no previous work has reported a specific relationship between

*Taste memory-related N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in basolateral amygdala and perirhinal cortex.*

expression changes of these immediate early genes and taste memory. Together, the results suggest that, at least for the regions examined, Homer1 and Narp may not be involved in taste memory and prompt further research on the molecular basis of safe taste memory. Therefore, our data are consistent with the lack of results on this issue and prompt further research on the molecular basis of safe taste memory.

In all, our results suggest a role for NSF in long-term storage of safe taste memory which can be connected with the proposed role of PKM $\zeta$  on maintaining LTP (Sacktor et al., 1993; Sacktor, 2008; 2011; 2012) and memory (Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2008; Shema et al., 2007; 2011; but see also Kwapis and Helmstetter, 2014). PKM $\zeta$  role in memory seems to be connected with the regulation of GluR2-dependent AMPARs trafficking (Yao et al., 2008; Miguez et al., 2010). Our results showing attenuation of conditioned taste aversion by ZIP (Gámiz and Gallo, 2011) and increase in NSF expression during formation of the safe taste memory adds to previous data to link both mechanisms in the BLA. Furthermore, a similar pattern of NSF expression in PRh breaks new ground for research on the brain mechanisms of recognition memory.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

---

This research was supported by grant PSI2011-23702 (MINECO. Spain) and FPI fellowship to B. Gómez-Chacón (MINECO. Spain).



## **Capítulo 5**

***Altered perirhinal cortex activity  
patterns during recognition  
memory in aged rats***

---





## **ABSTRACT**

---

Perirhinal cortex (PRh) pathology and chemosensory identification dysfunction are early signs of Alzheimer's disease. We have assessed the impact of normal aging on PRh activity during flavor recognition memory using c-Fos immunoreactivity as a marker for neuronal activity. Adult (5-month-old) and aged (24-month-old) Wistar male rats were exposed to a vinegar solution on a daily basis for a period of six days. Behavioral assessment indicated that aged rats showed slower attenuation of neophobia. Regarding c-Fos immunoreactivity, an opposite pattern of PRh activity was found in adult and aged groups drinking the flavor solution during the first (Novel), second (Familiar I) or sixth (Familiar II) exposure as the flavor became familiar. Whilst adult rats exhibited a higher number of PRh c-Fos-positive neurons during the presentation of the novel flavor than during the second and sixth presentation, in aged rats the number of PRh c-Fos-positive neurons was higher during the presentation of the familiar flavor in the last session than in the first and second. The results suggest that the role of the area changes during aging and can help to dissociate PRh dysfunctions induced by neurodegenerative diseases and normal aging.



## **1. INTRODUCTION**

The perirhinal cortex (PRh) is one of the most heavily damaged cortical areas in Alzheimer's disease (AD) and the cortical focus for disease onset (Van Hoesen et al., 2000). Impaired recognition of previously encountered stimuli is one of the earlier signs of AD. Among them, preclinical odorant identification deficits precede other sensory modalities of recognition memory impairment (Aliani et al., 2013). Given the fact that a similar dysfunction often appears in healthy aging, animal research might help to dissociate age and disease related changes in PRh function. However, most of the research has been centered on visual recognition memory, indicating impairment in aged rats at 24 h retention intervals and even at shorter intervals provided that complex objects are used (Burke et al., 2010; Gámiz and Gallo, 2012). In fact, it has been suggested that visual recognition memory impairments in aged rats could be linked to PRh dysfunction (Burke et al., 2010).

Flavor recognition memory refers to the ability to assess the familiarity of a previously ingested flavor that was not followed by negative consequences (Bermúdez-Rattoni, 2004). As the flavor is classified as safe consumption increases, thus showing attenuation of neophobia. Although not always found (Manrique et al., 2009), it has been previously reported in rats that aging selectively induces a lower rate of neophobia attenuation (Misanin et al., 1985; Gallagher and Burwell, 1989; Morón and Gallo, 2007) whilst the neophobic response is not affected (Morón et al., 2002). It could be proposed that this impairment is also related to PRh dysfunction at advanced age since the blocking of protein synthesis (De la Cruz et al., 2008) and cholinergic neurotransmission

(Gutiérrez et al., 2004) of the PRh impairs stabilization of taste memories. Accordingly, we have previously found PRh Fos activity changes associated with flavor familiarity which are dependent on the amygdala integrity (Chapter 3).

In order to explore the effect of aging on PRh activity during flavor recognition memory we have assessed both the attenuation of the neophobic reaction to a vinegar solution during drinking sessions over a period of 6 days and the PRh c-Fos activity in adult and aged animals during the first (novel), the second (familiar I) and the sixth presentation (familiar II). Assessment of c-Fos activity in the auditory cortex was used as a control area.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

Twenty one adult (5-month-old) and 24 aged (24-month-old) male Wistar rats were used. They had been previously subjected to an object recognition memory task not involving exposure to flavors in a different experiment. They were housed individually and maintained on a 12-hour light-dark cycle (lights on from 8 AM to 8 PM). All the experimental procedures were performed during the light cycle at the same time each morning in the home cage. Rats were given *ad libitum* food and water until the experiment started when water access was restricted.

All the subjects in each group (Adult vs. Aged) received the same behavioral treatment in order to assess flavor neophobia and its attenuation. Consumption (ml) was recorded after each session. In addition, the animals were

Capítulo 5

randomly assigned to the following groups according to the experimental day in which they were sacrificed for the immunohistochemical procedure: Adult (n=7) and Aged (n=8) rats were sacrificed after drinking the novel flavor solution on day 1 (Novel); Adult (n=7) and Aged (n=8) rats were sacrificed after drinking the familiar flavor solution on day 2 (Familiar I); Adult (n=7) and Aged (n=8) rats were sacrificed after drinking the familiar flavor solution on day 6 (Familiar II) (Table1). Only the consumption of the latter groups (Adult and Aged Familiar II) was taken into account for the behavioral analysis. All the procedures were approved by the University of Granada Ethics Committee for Animal Research and were in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

For five days water intake was recorded in the morning 15 minutes drinking period during the acclimation to the deprivation schedule. Once the water intake baseline (BL) was stabilized, both adult and aged rats belonging to Familiar II group received access to a 3% cider vinegar solution during the daily drinking session along 6 consecutive days (Table 1).

**Table 1.-** Timeline depicting the experimental procedure (n=number of animals per group, VIN= 3% vinegar solution, †=sacrifice 90 min after the drinkind period).

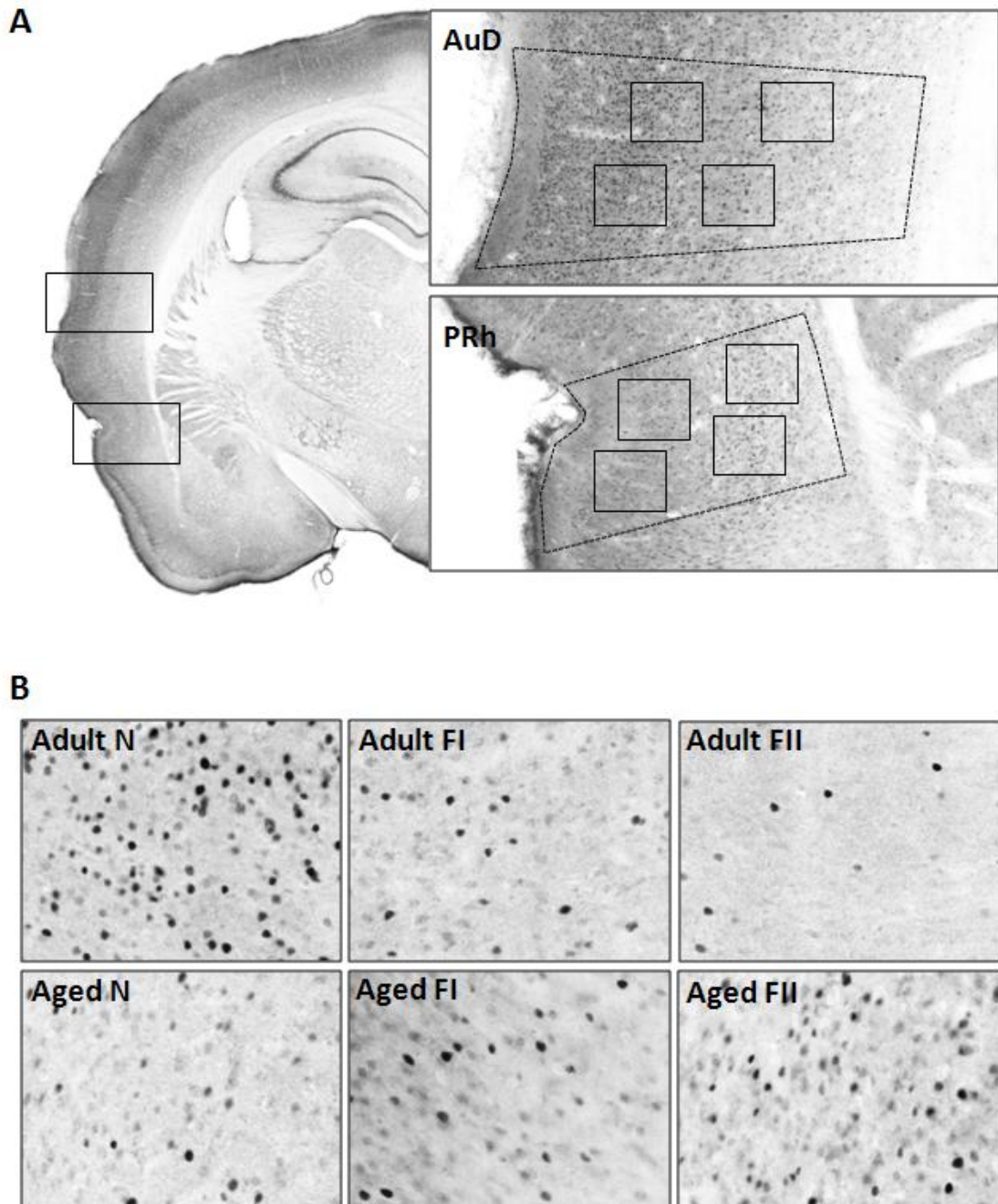
		<b>Days</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Groups</b>								
<b>Novel</b>	Adult (n=7)	VIN†						
	Aged (n=8)							
<b>Familiar I</b>	Adult (n=7)	VIN	VIN†					
	Aged (n=8)							
<b>Familiar II</b>	Adult (n=7)	VIN	VIN	VIN	VIN	VIN	VIN	VIN†
	Aged (n=8)							

For the immunohistochemical procedure, all the animals were subjected to the behavioral procedure described above but they were sacrificed at different time points depending on the c-Fos immunohistochemical group they were assigned (Table 1). They were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 4% formaldehyde 90 min after drinking the vinegar solution during the first (Novel), the second (Familiar I) and the sixth day (Familiar II). The brains were removed and placed in 4% formaldehyde solution for 4 hours before being transferred to 30% sucrose solution until they sank for cryoprotection. Coronal sections were cut at 20 $\mu$ m in a cryostat (Leica CM1900).

Tissue sections were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4), incubated for 15 minutes with 3% hydrogen peroxide, rinsed again, and incubated in a solution of 3% normal goat serum and 0.4% Triton X-100 in PBS for 30 min. Slices were transferred to c-fos primary antibody (1:10000; Calbiochem) for 48 hours at 4°C. After being rinsed with PBS, they were incubated in a secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit IgG, 1:500; Calbiochem) for 120 min at room temperature. Primary and secondary antibody solutions were mixed in a solution of 2% normal goat serum, 0.4% Triton x-100 and PBS. The sections were rinsed, processed using the ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and the reaction was visualized using peroxidase substrate kit (DAB) (vector laboratories, Burlingame, CA). Finally, they were rinsed, mounted on gelatine-subbed slides, rehydrated with ethanol and xylenes and cover-slipped.

## *Capítulo 5*

In order to quantify c-Fos positive cells, four digital images of the section in PRh and dorsal auditory cortex (AuD) per hemisphere were captured in each brain using a light microscope (Olympus BX41) at x40 magnification (Figure 1a). PRh and AuD were identified at -3.00 mm relative to bregma according to Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 2009). The number of Fos-positive cells were counted using software Image J (National Institute of Mental Health). Threshold objects having area (300-3600) and circularity (0,10-1,00) values matching those of c-Fos positive nuclei were automatically counted for each image. Mean values were calculated for each brain area.



**Figure 1.-** A) Representative coronal section of the rat brain showing the sampled regions: dorsal secondary auditory cortex (AuD) and perirhinal cortex (PRh). Each square represents the four images per hemisphere taken (magnification x40). B) Representative photomicrographs showing stained Fos-positive cells within the perirhinal cortex of the adult and aged groups. Adult-N: adult novel group; Adult-FI: adult familiar I group; Adult-FII: adult familiar II group; Aged-N: aged novel group; Aged-FI: aged familiar I group; Aged-FII: aged familiar II group.

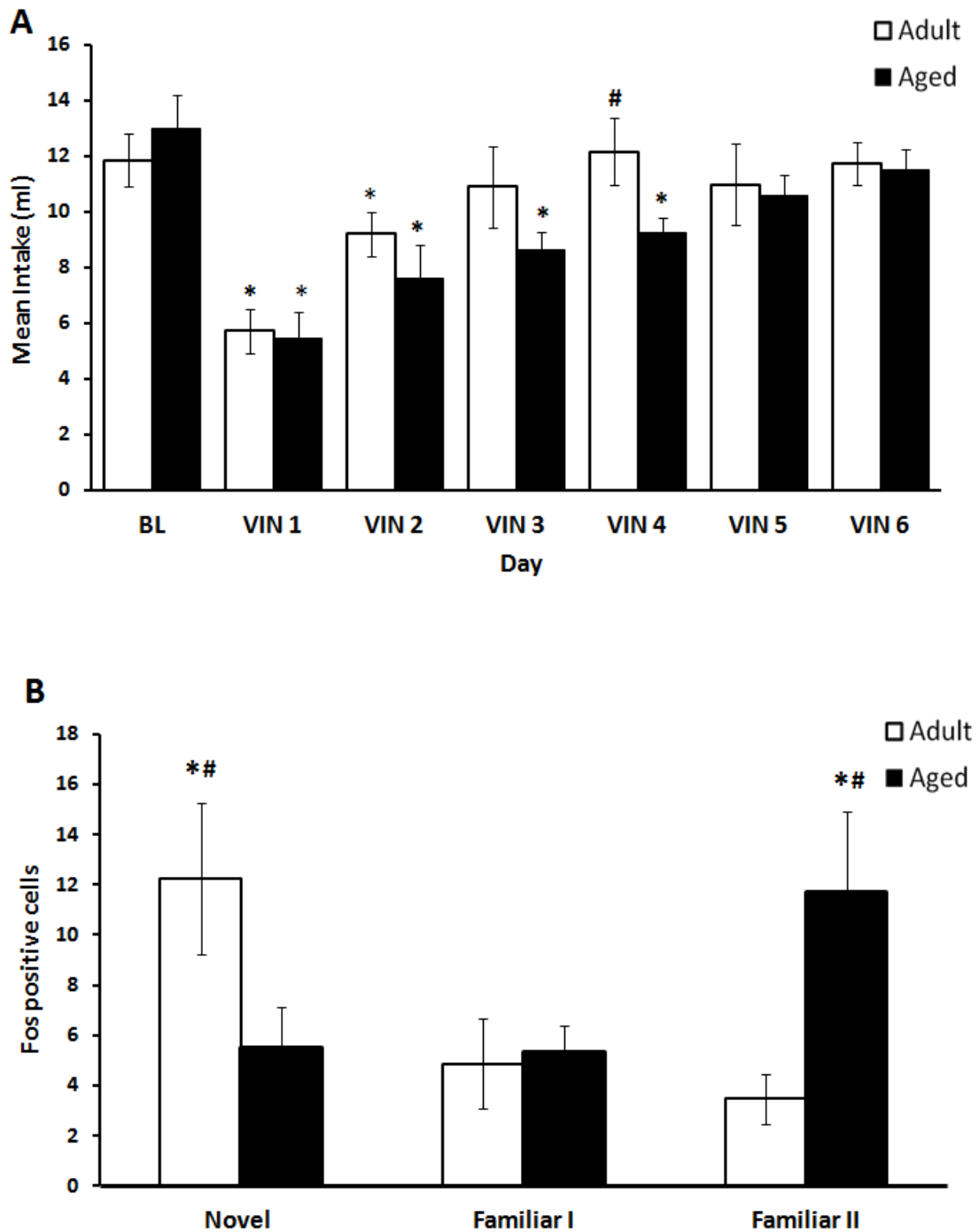


### 3. RESULTS

Figure 2a shows the mean ( $\pm$  SEM) intake of vinegar solution by adult and aged groups. As mentioned above the statistical analyses are based on the data of Familiar II groups since they were sacrificed after the end of the behavioral procedure. The groups did not differ in water intake during the last baseline day [F (1,12) = 0.20;  $p > .66$ ]. A 2 x 6 (age x day) mixed ANOVA analysis of the amount ingested by the different groups during the vinegar sessions revealed a significant effect of the within-subject factor days [F(5,65) = 14.20;  $p < .001$ ] but no effect of the between-groups factor age, [F(1,13) = 2.13;  $p > .16$ ] or the interaction age x day [F(5,65) = 0.95;  $p > .45$ ]. This indicated habituation of neophobia in both age groups. Nevertheless further planned comparisons suggested slower habituation of flavor neophobia in the older group. Whilst adult rats drank lesser amounts of vinegar in the first ( $p < .001$ ) and second ( $p < .05$ ) sessions compared with the last drinking session, aged rats drank significantly less in the first ( $p < .001$ ), second ( $p < .001$ ), third ( $p < .05$ ) and fourth ( $p < .05$ ) sessions compared with the last session so that they did not show attenuation of neophobia until the fifth session. In addition the aged group drank a significantly lower amount of vinegar solution than the adult group during the drinking session of the fourth exposure day ( $p < .05$ ).

Mean ( $\pm$  SEM) PRh Fos-positive cells of both age groups during the vinegar drinking sessions is shown in Figure 2b. A 2 x 3 (age x familiarity) ANOVA analysis indicated a significant effect of the interaction of both between-groups factors [F(2,36)=6.53;  $p < .01$ ] but no effect of the main factors age [F(1,36) = 0.15;  $p > .69$ ] and familiarity [F(2,36) = 1.78;  $p > .18$ ]. Analyses of the interaction by

Fisher LSD tests showed a higher number of Fos-positive cells in the adult than the aged group during the first exposure (Day 1) to the novel vinegar solution ( $p < .05$ ). However, a higher number of Fos-positive cells was evident in the aged group compared with the adult group during exposure to a familiar vinegar solution after six exposures ( $p < .01$ ). These differences are not significant in the second flavor exposure day. Thus, adult and aged groups exhibited an opposite pattern of PRh activity depending on flavor familiarity. This opposite pattern in different age groups was confirmed by separated post hoc analyses of the factor familiarity. In aged groups, the number of Fos-positive cells was higher after receiving six exposures to the vinegar solution than after drinking the novel solution ( $p < .05$ ) and the solution exposed twice ( $p < .05$ ). Regarding the adult groups, the number of Fos positive cells was significantly higher in the group drinking the novel vinegar solution than in the groups exposed twice ( $p < .05$ ) and six times ( $p < .01$ ). Figure 1b shows representative brain sections microphotographs of the different groups showing Fos positive cells in PRh. A similar 2 x 3 (age x familiarity) ANOVA analysis of Fos-positive cells in AuD showed no significant effect of the main factors age [ $F(1,36) = 0.12$ ;  $p > .72$ ] and familiarity [ $F(2,36) = 1.40$ ;  $p > .25$ ], nor the interaction between both factors [ $F(2,36) = 1.42$ ;  $p > .25$ ].



**Figure 2.-** A) Mean ( $\pm$ SEM) intake in adult and aged groups during the last day of water baseline (BL) and the six cider vinegar solution (VIN) exposures. \* vs VIN 6 ( $p < 0.05$ ); # adult vs aged groups ( $p < 0.05$ ). B) Mean ( $\pm$ SEM) number of c-Fos positive cells in the perirhinal cortex of adult and aged groups after drinking the novel (day 1) or familiar (day 2 and day 6) vinegar flavor solution. \* vs Days; # adult vs aged groups ( $ps < 0.05$ ).

#### **4. DISCUSSION**

To the best of our knowledge this is the first study aimed at exploring the impact of aging in PRh function using flavor recognition memory. Two main findings are reported.

First, both age groups show a similar performance in the behavioral test. Consistent with previous data (Morón and Gallo, 2007; Manrique et al., 2009) aged rats exhibited attenuation of flavor neophobia although the results suggested that it was slower in aged rats. While adult rats exhibited a complete attenuation of flavor neophobia in the third exposure, aged rats did not show it until the fifth session, being the differences between the consumption of both age groups evident in the fourth exposure. The fact that there were no age-dependent differences in the amount ingested of the novel flavor during the first sessions does not support an increased neophobic response in aged rats. However, such explanation cannot be completely discarded since the full demonstration of the neophobic response to a novel taste requires taking into account not only decreased consumption during the first encounter but also later increases upon subsequent exposures. Whatever the explanation our results are generally consistent with previous findings on the impact of aging on taste neophobia (Gámiz and Gallo, 2011b; 2012) and its habituation since research on this issue has yielded controversial results (Pelleymounter and Cullen, 1993; Morón and Gallo, 2007; Manrique et al., 2009).

The most relevant finding is that the PRh activity changes depending on flavor familiarity, as indicated by significant differences in c-Fos positive cells

depending on the flavor being novel or familiar. Although there has been some controversy about the brain areas involved in object recognition memory (Mishkin, 1978; Zola-Morgan, 1982; Broadbent et al., 2004), the PRh is widely accepted as the key brain area (Ennaceur and Aggleton, 1997; Burke et al., 2010). Therefore, the results could be interpreted as supporting the PRh involvement in stimulus recognition memory of various sensory modalities.

Remarkably, in spite of a similar behavioral performance, different PRh activity patterns are evident in both adult and old groups. Whilst adult rats exhibited a higher number of c-Fos positive cells after exposure to the novel than to the familiar flavor, familiarity increases the number of c-Fos positive cells in aged rats. The different patterns of PRh activity in adult and aged animals cannot be attributed to differences in flavor intake since the groups did not differ in consumption during the sessions previous to the sacrifice. In addition, the opposite pattern in the number of c-Fos positive cells in adult and aged rats cannot be due to age-induced morphological cell changes affecting cell size because the results indicate reduced as well as increased c-Fos positive cells number in aged brains depending on familiarity. Rather, an effect based in increased cell size during aging would yield changes of the pattern in the same direction. Also, changes induced by aging in the sensory processing modifying the salience of the flavor are not feasible. Finally, even though a decreased olfactory sensitivity has been associated with aging, old rats have been reported to discriminate as readily as younger adult rats between odours (Brushfield et al., 2008) and flavors conventionally used in flavor learning tasks (Renteria et al., 2008). Rather the opposite activity pattern along the sessions suggests a different

role of the area depending on the age. Thus, PRh might be involved in processing novelty in adult rats but familiarity in aged rats. It is conceivable that aging might induce a reorganization of the brain circuit involved in recognition memory and that this can take place relatively early during the aging process. Accordingly, Dardou et al. (Dardou et al., 2010) have reported an altered pattern of activation induced by aversive olfactory memory changes in senescent rats. Also, different strategies and age-specific activation patterns have been found in humans being the performance in memory tasks similar (Reuter-Lorenz and Lustig, 2005). Otherwise, the increase in PRh activity associated with memory of the familiar stimuli in the aged group could be interpreted as a compensatory change contributing to improve memory. A similar explanation has been proposed for the overactivation reported in the aged human brain during memory tasks (Reuter-Lorenz and Lustig, 2005). In addition, the possibility that the reduced PRh activity found in aged rats during exposure to a novel stimulus is a consequence of previous experience cannot be ruled out. A similar decrease in the number of PRh c-Fos positive cells during exposure to a novel object is induced in young/adult mice by environmental enrichment (Leger et al., 2012). Although the old rats used in the present study had no previous experience with flavor/taste memory procedures, they had been trained in object recognition memory tasks.

In all, these findings point to the value of using learning and memory tasks for understanding the impact of normal aging on PRh function. It can therefore contribute to dissociate normal and pathological changes at advanced ages which might be of clinical relevance.

## **Acknowledgements**

---

Supported by the research project PSIC2011-23702 (MINECO.Spain) and FPI fellowship to B. Gómez-Chacón (MINECO. Spain).





# **Discusión General**

---



En conjunto los resultados presentados en esta tesis doctoral aportan información relevante para mejorar la comprensión del papel que la corteza perirrinal (PRh) juega en la memoria de reconocimiento gustativa. Para ello se ha empleado una tarea de habituación de la neofobia gustativa en ratas que permite explorar las respuestas comportamentales y neurobiológicas asociadas al procesamiento de estímulos novedosos y su modificación a medida que dichos estímulos se convierten en familiares. De especial relevancia es la aproximación aplicada que combina el nivel de análisis comportamental con los niveles de análisis del Sistema Nervioso sistémico y molecular, además de incluir una perspectiva de desarrollo. Este tipo de aproximación permite abordar el estudio de las complejas redes neuronales y los acontecimientos moleculares subyacentes a la consolidación de la memoria (Izquierdo et al., 2006).

En el tercer capítulo se evaluó el efecto de lesiones neurotóxicas bilaterales de la amígdala basolateral (BLA) sobre la actividad de PRh después de la exposición a una solución de vinagre novedosa y familiar, utilizando para ello la cuantificación de la expresión de c-Fos. Los principales hallazgos encontrados en este capítulo son dos. Por una parte, la lesión de la amígdala basolateral interrumpe la habituación de la neofobia, y por otra parte, dichas lesiones anularon la activación diferencial en PRh inducida por la familiaridad del sabor.

En el capítulo cuarto se investigó la expresión génica en el hipocampo (HC), BLA y PRh durante la neofobia y la atenuación de la neofobia en ratas adultas. Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión del gen NSF tanto en BLA como el PRh, pero no en el HC. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al gen Homer1 y Narp en ninguna de las zonas estudiadas.

El quinto capítulo, se dedicó al estudio del efecto de la edad sobre el patrón de actividad de PRh comparando ratas adultas y envejecidas expuestas a una solución novedosa durante 6 días. Se encontraron cambios en el patrón de activación de PRh inducidos por el envejecimiento, siendo este patrón durante la habituación de la neofobia opuesta a la observada en ratas adultas.

En conjunto, los hallazgos obtenidos permiten relacionar por primera vez alteraciones en la expresión génica en PRh y la memoria de reconocimiento gustativa así como el efecto del envejecimiento.

Efectivamente, la familiaridad del sabor modifica la expresión en PRh del gen NSF y del gen inmediato temprano c-fos, pero no de Homer1 y Narp. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos con inhibición de la síntesis de proteínas (De la Cruz et al., 2008) y de la neurotransmisión colinérgica (Gutiérrez et al., 2004; Gutiérrez and Simon, 2011; Tinsley et al., 2011) en la misma región de PRh. Dichos resultados indican que la integridad funcional de la zona es necesaria para la consolidación de la memoria gustativa en tareas de habituación de la neofobia. Además, estos resultados apoyan la existencia de mecanismos biológicos comunes a distintos tipos de memoria de reconocimiento, ya que estudios previos han mostrado alteraciones en la expresión de c-fos durante tareas de memoria de reconocimiento visual en ratas (Zhu et al., 1996; Aggleton and Brown, 1999; Aggleton and Brown, 2005; Albasser et al., 2011a).

Es de destacar el incremento en la expresión de NSF asociado a la formación de la memoria gustativa segura. Este hallazgo confirma la relevancia de la interacción NSF-GluR2 en memoria de reconocimiento independientemente de la

### *Discusión general*

modalidad sensorial ya que parece ser necesaria también para la memoria de reconocimiento visual (Migues et al., 2014). Puede proponerse que el papel de NSF en memoria de reconocimiento esté relacionado con la función propuesta para PKMzeta en el mantenimiento de LTP (Sacktor et al., 1993; Sacktor, 2008; 2011; 2012) y de la memoria de reconocimiento de objeto-lugar (Hardt et al., 2010). Ello es congruente con el hecho de que PKMzeta ejerza su función regulando el tráfico de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA (Yao et al., 2008; Migues et al., 2010). Si se tienen en cuenta los resultados previos con inhibición de PKMzeta mediante inyecciones intracerebrales del péptido inhibidor ZIP en BLA (Gámiz and Gallo, 2011a) junto con el incremento en la expresión de NSF tanto en BLA como en PRh (resultados del capítulo cuarto) puede sugerirse un mecanismo molecular común a lo largo del circuito implicado en la formación de la memoria gustativa.

El hecho de que el envejecimiento modifique la función de PRh como indica la inversión del patrón de actividad con respecto al adulto sugiere que la memoria de reconocimiento gustativa representa un buen modelo para explorar los cambios cognitivos asociados a la edad avanzada.

Estudios previos se han centrado en tareas de memoria de reconocimiento visual mostrando deterioro en la retención a las 24 horas por parte de las ratas envejecidas (Burke et al., 2010; Gámiz and Gallo, 2012). Dicho deterioro se ha asociado a disfunción de PRh a edades avanzadas (Burke et al., 2010). Sin embargo, la memoria de reconocimiento de sabores puede ser una mejor elección para aplicar en individuos envejecidos frente a las tareas cognitivas habitualmente empleadas que se basan en la modalidad visual. A pesar de que el envejecimiento

no está asociado a cambios significativos en la sensibilidad gustativa que afecten a los estímulos habitualmente empleados en el laboratorio (Gámiz and Gallo, 2011b), los déficits en la identificación de olores son los signos más tempranos de la enfermedad de Alzheimer (Aliani et al., 2013). A su vez, PRh representa la primera zona en la que pueden detectarse los daños celulares asociados a la enfermedad y la que muestra mayor degeneración. Ello ha planteado cuestiones acerca del papel de la mayor susceptibilidad de PRh en la etiología y desarrollo de trastornos neurodegenerativos asociados a la edad (Van Hoesen et al., 2000). Investigaciones preclínicas en roedores representan una excelente oportunidad para establecer disociaciones entre los efectos del envejecimiento normal y patológico. Los hallazgos contenidos en esta tesis abren nuevas posibilidades en este sentido.

Por su parte, es bien reconocido el papel del HC en memoria de reconocimiento visual cuando se trata de recordar la localización del objeto y el incremento en la expresión de c-fos asociado a la novedad del objeto (Soulé et al., 2008; Winters et al., 2008). Para estas tareas parece ser necesaria la interacción NSF-GluR2 ya que su interferencia mediante el péptido pep2m deteriora el mantenimiento de la memoria de reconocimiento objeto-lugar (Migues et al., 2014). En la misma dirección la evidencia indica que el HC no forma parte del circuito implicado en la adquisición de aversiones gustativas salvo cuando las claves contextuales adquieren relevancia en la tarea empleada (Gallo et al., 1999; Manrique et al., 2009). Sin embargo, se ha informado de la necesidad de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal para la habituación de la neofobia gustativa (De la Cruz et al., 2008). Los resultados expuestos en esta tesis doctoral no

## *Discusión general*

muestran cambios en la expresión génica tanto de c-fos como de NSF en el HC en relación con la familiaridad del sabor y son consistentes en experimentos que emplean técnicas diferentes (inmunohistoquímica en Capítulos 3 y 5 y Taqman Gene Expression Assay en el capítulo 4).

Finalmente, en el tercer y cuarto capítulos se pone de manifiesto la relevancia de la interacción entre BLA y PRh para la formación de la memoria del sabor familiar. Por una parte, los resultados del tercer capítulo demuestran que la integridad de BLA es necesaria para que se produzca la habituación de la neofobia y los cambios en actividad de PRh asociados. La estrategia que combina técnicas de lesión e inmunohistoquímicas como instrumento para detectar la actividad neural es especialmente fructífera a la hora de delinear componentes interdependientes de los circuitos neurales implicados en una determinada función. Empleando una estrategia similar se han identificado interacciones cruciales entre BLA e IC para la formación de aversiones gustativas (Clark and Bernstein, 2009) y entre BLA e HC para la consolidación de memoria aversivas adquiridas en tareas de evitación (Blank et al., 2014). Con respecto a la memoria de reconocimiento gustativa se ha descrito previamente que la inhibición de la síntesis de proteínas en el HC interfiere con el incremento en la expresión del gen inmediato temprano Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated) en IC asociada a los sabores familiares (Morin et al., 2011). Por otra parte, los resultados del siguiente capítulo confirman la existencia de un circuito relevante para la habituación de la neofobia del que forman parte BLA y PRh e indican un patrón similar de expresión del gen NSF en ambas zonas.





# **Conclusiones**

---



## *Conclusiones*

1. Tanto la habituación de la neofobia como la actividad de Fos en la corteza perirrinal relacionada con el reconocimiento del sabor familiar requieren la integridad de la amígdala basolateral.
2. La memoria de reconocimiento gustativo modifica la expresión de NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) en la amígdala basolateral y en la corteza perirrinal, aumentándose cuando el sabor seguro se vuelve familiar. El efecto aparece, después de la segunda presentación en comparación con la sexta presentación del sabor una vez que la memoria gustativa segura se ha consolidado.
3. El envejecimiento está asociado con un déficit en memoria de reconocimiento gustativo e induce un patrón de actividad en la corteza perirrinal opuesto al observado en adultos durante la habituación de la neofobia gustativa.
4. La corteza perirrinal y la amígdala basolateral son componentes de un circuito neuronal relevante para la memoria de reconocimiento gustativa.
5. El papel del Factor de N-etilmaleimida-sensible en el almacenamiento a largo plazo de la memoria de reconocimiento gustativa segura puede ser

relacionado con la función propuesta de PKM $\zeta$  en el mantenimiento del potencial a largo plazo y la memoria.

6. Los cambios inducidos por el envejecimiento en los patrones de memoria de reconocimiento gustativa y en la actividad de la corteza perirrinal se proponen como marcadores tempranos de deterioro cognitiva pudiendo ayudar a disociar entre disfunciones de la corteza perirrinal inducidas por enfermedades neurodegenerativas y por el envejecimiento normal.

## **Conclusions**

---

1. Both the habituation of taste neophobia and the perirhinal Fos activity related with recognition of taste familiarity depend on the integrity of the basolateral amygdala.
2. Taste recognition memory modifies N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in basolateral amygdala and perirhinal cortex, being up-regulated when a safe taste becomes familiar after the second presentation in comparison with a later phase after six taste exposures leading to a well consolidated memory trace.
3. Aging is associated with deficits of flavor recognition memory and induces a pattern of perirhinal cortex activity during habituation of flavor neophobia opposite to that seen in adulthood.
4. The perirhinal cortex and the basolateral amygdala are components of a neural circuit relevant for safe taste recognition memory.
5. A role for N-ethylmaleimide-sensitive in long-term storage of safe taste memory can be connected with the proposed function of PKM $\zeta$  on maintaining long-term potentiation and memory.

6. Changes induced by aging in taste recognition memory and perirhinal cortex activity patterns are proposed as early markers of cognitive dysfunction and they can help to dissociate perirhinal cortex dysfunctions induced by neurodegenerative diseases and normal aging.

## Publicaciones relacionadas

---

- Gómez-Chacón B and Gallo M. “Memoria de reconocimiento visual y gustativa: comparación entre procesos y mecanismos”. En: F. Gámiz, M. Gallo & F. Vives (eds.) *Encuentros en Neurociencias Vol II*, 2013, 2, 123-147. Ediciones Ciber, S.C.: Granada (Spain). ISBN: 978-84-96876-87-7.
- Gómez-Chacón B, Gámiz F and Gallo M. “Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex.” *Behav Brain Res.*, 2012, 230(2):418-22. *Indice de impacto JRC (2012): 3,327 (Behavioral Sciences 13/49) Tercil: 1 Cuartil: 2*
- Gómez-Chacón B, Morillas E and Gallo M. “Altered perirhinal cortex activity patterns during recognition memory in aged rats”. *En revisión*
- Gómez-Chacón B, Gámiz F, Foster TC and Gallo M. “Taste memory-related N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in basolateral amygdala and perirhinal cortex”. *Enviado*
- Gómez-Chacón B, Gamiz F and Gallo M. “Amygdala-perirhinal cortex interaction involved in the attenuation of taste neophobia.” *Chemical Senses*, 2012, 37(3) P19 (Meeting Abstract). *Indice de impacto JRC (2012):3.222 (Food Science & Technology 11/124) Tercil:1 Cuartil:1*
- Gómez-Chacón B, Gámiz F, Martínez-Escudero L and Gallo M. “Dorsal hippocampal and perirhinal neurotoxic lesions and taste intake suppression induced by context aversion learning in rats.” *Chemical Senses* 2011, 36 (1): E83 (Meeting Abstract). *Indice de impacto JRC (2011): 2.599 (Food Science & Technology 16/128) Tercil:1 Cuartil:1*
- Gómez-Chacón B, Gámiz F, Morillas E and Gallo M. Delayed attenuation of taste neophobia induced by perirhinal cortex lesions and aging in rats. *Chemical Senses*, 2014, 39(1) 96-97 (Meeting Abstract). *Indice de impacto JRC (2013):3.278 (Food Science & Technology 9/123) Tercil: 1 Cuartil: 1*





# **Bibliografía**

---



## *Bibliografía*

- Adaikkan C, Rosenblum K. The role of protein phosphorylation in the gustatory cortex and amygdala during taste learning. *Exp Neurobiol.* 2012; 21: 37-51.
- Aggleton JP, Brown MW. Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B.* 2005; 58: 218-33.
- Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci.* 1999; 19: 1142-8.
- Aggleton JP, Keen S, Warburton EC, Bussey TJ. Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res Bull.* 1997; 43: 279-87.
- Aggleton JP, Keen S, Warburton EC, Bussey TJ. Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res Bull.* 1997; 43: 279-287
- Aguado L, San Antonio A, Pérez L, Del Valle R, Gómez J. Effects of the NMDA-receptor antagonist ketamine on favor memory: conditioned aversion, latent inhibition and habituation of neophobia. *Behav Neural Biol.* 1994; 61: 271.
- Ainge JA, Heron-Maxwell C, Theofilas P, Wright P, de Hoz L, Wood ER. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behav Brain Res.* 2006; 167: 183-95.
- Albasser MM, Amin E, Iordanova MD, Brown MW, Pearce JM, Aggleton JP. Perirhinal cortex lesions uncover subsidiary systems in the rat for the detection of novel and familiar objects. *Eur J Neurosci.* 2011a; 34: 331-42.

- Albasser MM, Amin E, Iordanova MD, Brown MW, Pearce JM, Aggleton JP. Separate but interacting recognition memory systems for different senses: the role of the rat perirhinal cortex. *Learn Mem.* 2011b; 18: 435-43.
- Albasser MM, Olarte-Sánchez CM, Amin E, Horne MR, Newton MJ, Warburton EC, Aggleton JP. The Neural Basis of Non visual Object Recognition Memory in the Rat. *Behav Neurosci.* 2012; 127: 70-85.
- Albasser MM, Poirier GL, Aggleton JP. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. Familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *Eur J Neurosci.* 2010; 31: 134-47.
- Aliani M, Udenigwe CC, Girgih AT, Pownall TL, Bugera JL, Eskin MN. Aroma and taste perceptions with Alzheimer disease and stroke. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53: 760-9.
- Anggono V, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2012; 22:461-69.
- Barco A, Bailey CH, Kandel ER. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem.* 2006; 97:1520-33.
- Barker GR, Bird F, Alexander V, Warburton EC. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci.* 2007; 27: 2948-57.
- Barnes SJ, Floresco SB, Kornecook TJ, Pineda JP. Reversible lesions of the rhinal cortex produce delayed non-matching-to-sample deficits in rats. *NeuroReport.* 2000; 11: 351-54.

## *Bibliografía*

- Barry MF, Ziff EB. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12: 279–86.
- Bartko SJ, Cowell RA, Winters BD, Bussey TJ, Saksida LM. Heightened susceptibility to interference in an animal model of amnesia: impairment in encoding, storage, retrieval--or all three? *Neuropsychologia.* 2010; 48: 2987-97.
- Bartko SJ, Winters BD, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Perceptual functions of perirhinal cortex in rats: Zero-delay object recognition and simultaneous oddity discriminations. *J Neurosci.* 2007; 27: 2548–59.
- Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci.* 2013; 70:4411-30.
- Baxter MG. Involvement of medial temporal lobe structures in memory and perception. *Neuron.* 2009; 61:667-77.
- Bermudez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5: 209–17.
- Bermúdez-Rattoni F, Núñez-Jaramillo L, Balderas I. Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chem. Senses.* 2005; Suppl 1:i156-7.
- Bernstein IL, Koh MT. Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses.* 2007;32: 99-103.
- Bielavska E, Miksik I, Krivanek J. Glutamate in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion. *Brain Res.* 2000; 887: 413-7.

- Blank M, Dornelles AS, Werenicz A, Velho LA, Pinto DF, Fedi AC, Schröder N, Roesler R. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;111:1-8.
- Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973; 232: 331-56.
- Bowie D, Mayer ML. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron.* 1995; 15: 453-62.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS.* 2004; 101: 14515-20.
- Brown MW, Barker GR, Aggleton JP, Warburton EC. What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia.* 2012; 50: 3122-40.
- Brown MW, Warburton EC, Aggleton JP. Recognition memory: material, processes, and substrates. *Hippocampus.* 2010; 20: 1228-44.
- Brushfield AM, Luu TT, Callahan BD, Gilbert PE. A comparison of discrimination and reversal learning for olfactory and visual stimuli in aged rats. *Behav Neurosci.* 2008; 122: 54-62.
- Bures J, Buresova O, Krivanek J. *Brain and Behavior: Paradigms for research in neural mechanisms.* John Wiley and Sons. 1988: 236-7.

## *Bibliografia*

- Buresova O, Bures J. The effect of anesthesia on acquisition and extinction of conditioned taste aversion. *Behav Biol.* 1977; 20: 41-50.
- Burke SN, Ryan L, Barnes CA. Characterizing cognitive aging of recognition memory and related processes in animal models and in humans. *Front Aging Neurosci.* 2012; 4:15.
- Burke SN, Wallace JL, Hartzell AL, Nematollahi S, Plange K, Barnes CA. Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus. *Behav Neurosci.* 2011; 125: 836-47.
- Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci.* 2010; 124: 559-73.
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron.* 1992; 8: 189-98.
- Castillo DV, Escobar ML. A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behav Brain Res.* 2011; 217: 248-52.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature.* 2006; 444: 288-94.
- Clark EW, Bernstein IL. Establishing aversive, but not safe, taste memories requires lateralized pontine-cortical connections. *Behav Brain Res.* 2009; 197: 356-63.

- Cohen H, Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Zohar J. Mapping the brain pathways of traumatic memory: inactivation of protein kinase M zeta in different brain regions disrupts traumatic memory processes and attenuates traumatic stress responses in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2010; 20 :253-71.
- Collier TJ, Greene JG, Felten DL, Stevens SY, Collier KS. Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging.* 2004; 25: 209-21.
- Colombo PJ. Learning-induced activation of transcription factors among multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 82: 268-77.
- Coogan AN, O'Neill LA, O'Connor JJ. The P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1beta on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience.* 1999; 93: 57-69.
- Cowell RA, Bussey TJ, Saksida LM. Components of recognition memory: dissociable cognitive processes or just differences in representational complexity? *Hippocampus.* 2010; 20: 1245-62.
- Dardou D, Datiche F, Cattarelli M. Does the olfactory cue activate the same brain network during aging in the rat after taste potentiated odor aversion retrieval?. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 93: 137-50.
- David O, Barrera I, Chinnakkaruppan A, Kaphzan H, Nakazawa T, Yamamoto T, Rosenblum K. Dopamine-induced tyrosine phosphorylation of NR2B



## *Bibliografia*

- (Tyr1472) is essential for ERK1/2 activation and processing of novel taste information. *Front Mol Neurosci.* 2014; 7: 66.
- De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermudez-Rattoni F. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci.* 2008; 28: 1377-81.
- Doron G, Rosenblum K. c-Fos expression is elevated in GABAergic interneurons of the gustatory cortex following novel taste learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 94: 21-9.
- Eacott MJ, Machin PE, Gaffan EA. Elemental and configural visual discrimination learning following lesions to perirhinal cortex in the rat. *Behav Brain Res.* 2001; 124: 55-70.
- Ennaceur A, Aggleton JP. The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res.* 1997; 88: 181-93.
- Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988; 31: 47-59.
- Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL. Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty and to an object recognition task in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res.* 2009; 197:417-34.
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesion in the cingulate cortices, the

medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res.* 1997; 113: 509-19.

Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 2010; 215:244-54.

Escobar ML, Alcocer I, Chao V. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* 1998; 812: 246-51.

Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 2000; 852: 208-12.

Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez R. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci.* 2002; 16: 1139–45.

Ferreira G, Gutiérrez R, De La Cruz V, Bermúdez-Rattoni F. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci.* 2002; 16: 1139-45.

Figuroa-Guzman Y, Kuo JS, Reilly S. NMDA receptor antagonist MK-801 infused into the insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Res.* 2006; 1114: 183–6.

Figuroa-Guzmán Y, Kuo JS, Reilly S. NMDA receptor antagonist MK-801 infused into the insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Res.* 2006; 1114: 183-6.

## *Bibliografía*

Figuroa-Guzman Y, Reilly S. NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Res.* 2008; 1210: 200–3.

Figuroa-Guzmán Y, Reilly S. NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Res.* 2008; 1210: 200-3.

Forwood SE, Winters BD, Bussey TJ. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus.* 2005; 15:347-55.

Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K. Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Front Behav Neurosci.* 2012; 5: 87.

Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K. Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Front Behav Neurosci.* 2012; 5: 87.

Gallagher M, Burwell RD. Relationship of age-related decline across several behavioral domains. *Neurobiol Aging.* 1989; 10: 691-708.

Gallo M, Ballesteros MA, Molero A, Morón I. Taste aversion learning as a tool for the study of hippocampal and non-hippocampal brain memory circuits regulating diet selection. *Nutr Neurosci.* 1999; 2: 277–302.

Gámiz F, Gallo M. Intra-amygdala ZIP injections impair the memory of learned active avoidance responses and attenuate conditioned taste-aversion acquisition in rats. *Learn Mem.* 2011a; 18:529-33.

- Gámiz F, Gallo M. Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity. *Learn Mem.* 2012; 19: 444-8.
- Gámiz F, Gallo M. Taste learning and memory: a window on the study of brain aging. *Front Syst Neurosci.* 2011b; 5: 91-7.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* 1995; 15: 193-204.
- Gerard RW. Physiology and psychiatry. *Amer J Psychiat.* 1949; 105: 161-73.
- Groenewegen HJ, Uylings HB. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res.* 2000; 126: 3-28.
- Gutierrez R, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem.* 2004; 11: 95-101.
- Gutierrez R, Rodriguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Nunez-Jaramillo L, Bermudez-Rattoni F. Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem.* 2003; 80: 323-31.
- Gutierrez R, Simon SA. Chemosensory processing in the taste – reward pathway. *Flavour Fragr J.* 2011; 26: 231-8.
- Guzmán-Ramos K, Bermúdez-Rattoni F. Post-Learning Molecular Reactivation Underlies Taste Memory Consolidation. *Front Syst Neurosci.* 2011; 5: 79.

## *Bibliografia*

- Hardt O, Miguez PV, Hastings M, Wong J, Nader K. PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus. *Hippocampus*. 2010; 20: 691-5.
- Hebb DO. *Organization of behavior*. New York: Wiley. 1949.
- Iordanova MD, Burnett DJ, Aggleton JP, Good M, Honey RC. The role of the hippocampus in mnemonic integration and retrieval: complementary evidence from lesion and inactivation studies. *Eur J Neurosci* . 2009; 30: 2177-89.
- Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007;54: 859-71.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006; 29: 496-505.
- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22: 269-87.
- Jenkins TA, Amin E, Brown MW, Aggleton JP. Changes in immediate early gene expression in the rat brain after unilateral lesions of the hippocampus. *Neuroscience*. 2006; 137: 747-59.
- Joels G, Lamprecht R. Interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluR2 is essential for fear memory formation in lateral amygdala. *J Neurosci*. 2010; 30: 15981-6.

- Kealy J, Commins S. The rat perirhinal cortex: a review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol.* 2011; 93: 522–48.
- Kesner RP, Berman RF, Tardif R. Place and taste aversion learning: role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala. *Brain Res Bull.* 1992; 29: 345–53.
- Kessels HW, Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron.* 2009; 61: 340–50.
- Kiefer SW, Grijalva CV. Taste reactivity in rats following lesions of the zona incerta or amygdala. *Physiol Behav.* 1980; 25: 549–54.
- Koh MT, Bernstein IL. Mapping conditioned taste aversion associations using CFos reveals a dynamic role for insular cortex. *Behav Neurosci.* 2005; 119: 388–98.
- Kolb B, Buhrmann K, McDonald R, Sutherland RJ. Dissociation of the medial prefrontal, posterior parietal, and posterior temporal cortex for spatial navigation and recognition memory in the rat. *Cereb Cortex.* 1994; 6: 664–80.
- Krivanek J. Conditioned taste aversion and Ca/calmodulin-dependent kinase II in the parabrachial nucleus of rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2001; 76: 46-56.
- Krivanek J. Conditioned taste aversion and protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1996; 65: 154-62.
- Krivanek J. Protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion induced by amphetamine. *Neurosci Lett.* 1997; 236: 17-20.

## *Bibliografia*

Kwapis JL, Helmstetter FJ. Does PKM(zeta) maintain memory? *Brain Res Bull.* 2014; 105: 36-45.

Kwon B, Houpt TA. Mitogen-activated protein kinase in the amygdala plays a critical role in lithium chloride-induced taste aversion learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2012; 97: 132-9.

Lamprecht R, Dudai Y. Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem.* 1996; 3: 31-41.

Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation-remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem.* 1999; 6: 77-87.

Leger M, Quiedeville A, Paizanis E, Natkunarajah S, Freret T, Boulouard M, Schumann-Bard P. Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One.* 2012; 7: e48043.

Lin JY, Roman C, Arthurs J, Reilly S. Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain Res.* 2012; 1448: 82-8.

Lin JY, Roman C, Arthurs J, Reilly S. Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain Res.* 2012; 1448: 82-8.

Lin JY, Roman C, St Andre J, Reilly S. Taste, olfactory and trigeminal neophobia in rats with forebrain lesions. *Brain Res.* 2009; 1251: 195–203.

Lin PY, Wang SP, Tai MY, Tsai YF. Differential involvement of medial prefrontal cortex and basolateral amygdala extracellular signal-regulated kinase in

- extinction of conditioned taste aversion is dependent on different intervals of extinction following conditioning. *Neuroscience*. 2010;171:125-33.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8.
- Lovaglio J, Lin JY, Roman C, Reilly S. Basolateral amygdala and morphine induced taste avoidance in the rat. *Physiol Behav*. 2010; 99: 419–23.
- Lubow, R.E. *Latent Inhibition and Conditioned Attention Theory*. Cambridge: Cambridge University Press: 1989.
- Lüscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*. 1999; 24: 649-58.
- Lynch G, Baudry M. The biochemistry of memory: A new and specific hypothesis. *Science*. 1984; 224: 1057-63.
- Madroñal N, Gruart A, Sacktor TC, Delgado-García JM. PKMzeta inhibition reverses learning-induced increases in hippocampal synaptic strength and memory during trace eyeblink conditioning. *PLoS One*. 2010;5:e10400.
- Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol*. 2000; 10: 352-7.
- Manrique T, Gámiz F, Morón I, Ballesteros MA, Gallo M. Peculiar modulation of taste aversion learning by the time of day in developing rats. *Dev Psychobiol*. 2009a ; 51:147-57.



## *Bibliografía*

- Manrique T, Molero A, Ballesteros MA, Moron I, Gallo M, Fenton A A. Time of day-dependent latent inhibition of conditioned taste aversions in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 82: 77–80.
- Manrique T, Moron I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Fenton AA, Gallo M. Hippocampus, aging, and segregating memories. *Hippocampus.* 2009b ; 19: 57–65.
- Manrique T, Morón I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Gallo M. Hippocampus, ageing, and taste memories. *Chem Senses.* 2007; 32: 111-7.
- Martin HG, Henley JM, Meyer G. Novel putative targets of N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF) and alpha/beta soluble NSF attachment proteins (SNAPs) include the Pak-binding nucleotide exchange factor betaPIX. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 1203-15.
- McGaugh JL. Memory: A century of consolidation. *Science.* 2000; 287: 248-51.
- McTighe SM, Cowell RA, Winters BD, Bussey TJ, Saksida LM. Paradoxical false memory for objects after brain damage. *Science.* 2010; 330: 1408-10.
- Middei S, Ammassari-Teule M, Marie H. Synaptic plasticity under learning challenge. *Neurobiol Learn Mem.* 2014, in press.
- Migues PV, Hardt O, Finnie P, Wang YW, Nader K. The maintenance of long-term memory in the hippocampus depends on the interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2. *Hippocampus.* 2014; 00: 1–8

Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 2010; 13: 630-4.

Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 2010; 13: 630-4.

Milner B. The medial temporal-lobe amnesic syndrome. *Psychiatr Clin North Am.* 2005; 28: 599-611.

Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 6478-82.

Miranda MI, LaLumiere RT, Buen TV, Bermudez-Rattoni F, McGaugh JL. Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 2605–10.

Miranda MI, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res.* 2000; 882: 230-5.

Misanin JR, Blatt LA, Hinderlitter CF. Age dependency in neophobia: its influence on taste-aversion learning and the flavor-preexposure effects in rats. *Anim Learn Behav.* 1985; 13: 69-76.

Mishkin M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nat.* 1978; 273: 297-8.

## *Bibliografía*

Moncada D, Viola H. PKMzeta inactivation induces spatial familiarity. *Learn Mem.* 2008;15: 810-4.

Morillas E, Gámiz F, Gallo M. Neuroanatomía funcional de la memoria de reconocimiento visual y gustativas. En: F Gámiz, M Gallo, F Vives, Eds. *Encuentros en Neurociencias. Vol II.* Granada: Ediciones Ciber; 2013. pp. 151-80.

Morin JP, Quiroz C, Mendoza-Viveros L, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one. *Learn Mem.* 2011; 18: 610–6.

Morón I, Ballesteros MA, Cándido A, Gallo M. Taste aversion learning and aging: a comparison with the effect of dorsal hippocampal lesions in rats. *Physiol Res.* 2002; 51 Suppl 1: S21-7.

Morón I, Gallo M. Effect of previous taste experiences on taste neophobia in young-adult and aged rats. *Physiol Behav.* 2007; 90: 308-17.

Morón I, Manrique T, Molero A, Ballesteros M A, Gallo M, Fenton A. The contextual modulation of conditioned taste aversions by the physical environment and time of day is similar. *Learn Mem.* 2002; 9: 218–23.

Müller GE, Pizecker A. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband* (Experimental contributions to the science of memory). 1900; 1: 1-300.

- Mumby DG, Gaskin S, Gleen MJ, Schramek TE, Lehmann H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places and contexts. *Learn Mem.* 2002; 9: 49-57.
- Mumby DG, Pinel JPJ. Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. *Behav Neurosci.* 1994; 108: 11-8.
- Mumby DG, Piterkin P, Lecluse V, Lehmann H. Perirhinal cortex damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Behav Brain Res.* 2007; 185: 82-7.
- Mumby DG. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res.* 2001; 127: 159-81.
- Mungarndee SS, Lundy Jr RF, Norgren R. Expression of Fos during sham sucrose intake in rats with central gustatory lesions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295: R751-63.
- Murray EA, Richmond BJ. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11:188-93.
- Naor C, Dudai Y. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res.* 1996; 79: 61-7.
- Neel A. *Theories of psychology: a handbook.* Schenkman Publishing Co., Cambridge,MA. Ornstein, R. 1986. *Multimind.* Houghton Mifflin Co., Boston.

*Bibliografia*

Neseliler S, Narayanan D, Fortis-Santiago Y, Katz DB, Birren SJ. Genetically induced cholinergic hyper-innervation enhances taste learning. *Front Syst Neurosci.* 2011; 5: 97.

Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron.* 1998; 21: 87-97.

Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM. Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron.* 1999; 23: 365-76.

Norman G, Eacott MJ. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behav Brain Res.* 2004; 148: 79-91.

Osten P, Srivastava S, Inman GJ, Vilim FS, Khatri L, Lee LM, States BA, Einheber S, Milner TA, Hanson PI, Ziff EB. The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron.* 1998; 21: 99-110.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science.* 2006; 313: 1141-44.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science.* 2006; 313: 1141-4.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 1998.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2009.

Pedroza-Llinas R, Ramirez-Lugo L, Guzman-Ramos K, Zavala-Vega S, Bermudez Rattoni F. Safe taste memory consolidation is disrupted by a protein synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92: 45–52.

Pelleymounter MA, Cullen MJ. Effects of idebenone on information processing in aged Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 46: 415-21.

Polyak, S. The Vertebrate Visual System. Chicago: Univ. Chicago Press; 1957.

Reilly S, Bornovalova MA. Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29: 1067–88.

Reilly S. The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res Bull.* 1999; 48: 239–54.

Renteria AF, Silbaugh BC, Tolentino JC, Gilbert PE. Age-related changes in conditioned flavor preference in rats. *Behav Brain Res.* 2008; 188: 56-61.

Reuter-Lorenz PA, Lustig C. Brain aging: reorganizing discoveries about the aging mind. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15: 245-51.

Rodríguez-Durán LF, Escobar ML. NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex

## *Bibliografía*

induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity. *Behav Brain Res.* 2014; 266: 58-62.

Rodríguez-Durán LF, Escobar ML. NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity. *Behav Brain Res.* 2014; 266: 58-62.

Rolls ET, Murzi E, Yaxley S, Thorpe SJ, Simpson SJ. Sensory-specific satiety: food-specific reduction in responsiveness of ventral forebrain neurons after feeding in the monkey. *Brain Res.* 1986; 368: 79-86.

Rolls ET. Convergence of sensory systems in the orbitofrontal cortex in primates and brain design for emotion. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004; 281: 1212-25.

Rolls ET. The Orbitofrontal Cortex and Reward. *Cereb Cortex.* 2000; 10: 284-94.

Rothman JE. Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1994; 29: 81-96.

Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E. Persistent activation of the  $\zeta$  isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 8342-6.

Sacktor TC. How does PKM $\zeta$  maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12: 9-15.

Sacktor TC. Memory maintenance by PKM $\zeta$ --an evolutionary perspective. *Mol Brain.* 2012; 5:31.

- Sacktor TC. PKM  $\zeta$ , LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res.* 2008; 169: 27-40.
- Sara SJ, Hars B. In memory of consolidation. *Learn Mem.* 2006;13: 515-21.
- Schweizer FE, Dresbach T, DeBello WM, O'Connor V, Augustine GJ, Betz H. Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science.* 1998; 279: 1203-6.
- Scott T. R. Learning through the taste system. *Front. Syst. Neurosci.* 2011; 5: 87.
- Sefton SJ, Dreher B, Harvey A. Visual system. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System.* 3. Burlington, MA, USA: Academic Press; 2004. pp. 1083–141.
- Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JCP, Sacktor TC, Fenton AA. PKM $\zeta$  Maintains Spatial, Instrumental, and Classically Conditioned Long-Term Memories. *PLoS Biol.* 2008; 6(12) e318: 2698-706.
- Shema R, Haramati S, Ron S, Hazvi S, Chen A, Sacktor TC, Dudai Y. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science.* 2011; 331: 1207-10.
- Shema R, Haramati S, Ron S, Hazvi S, Chen A, Sacktor TC, Dudai Y. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science.* 2011;331: 1207-10.
- Shema R, Hazvi S, Sacktor TC, Dudai Y. Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex. *Learn Mem.* 2009; 16: 122-8.



## *Bibliografia*

- Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid Erasure of Long-Term Memory Associations in the Cortex by an Inhibitor of PKM $\zeta$ . *Science*. 2007; 317: 951-3.
- Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*. 2007; 317:951-3.
- Sigurdsson T, Doyère V, Cain CK, LeDoux JE. Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology*. 2007;52: 215-27.
- Song DK, Choe B, Bae JH, Park WK, Han IS, Ho WK, Earm YE. Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron. *Brain Res*. 1998; 799: 176-9.
- Song I, Huganir RL. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 2002; 25: 578-88.
- Soulé J, Penke Z, Kanhema T, Alme MN, Laroche S, Bramham CR. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast*. 2008; 2008: 269097.
- Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* . 2004; 82:171-7.
- Suzuki WA. Perception and the medial temporal lobe: evaluating the current evidence. *Neuron* . 2009; 61:657-66.

- Swank MW. Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning. *Neuroreport*. 2000; 11:1625-30.
- Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci*. 1997; 17: 58-69.
- Szél A, Röhlich P. Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res*. 1992;55: 47-52.
- Tinsley CJ, Fontaine-Palmer NS, Vincent M, Endean EP, Aggleton JP, Brown MW, et al. Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex. *Learn Mem*. 2011; 18: 484–92.
- Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. Glucose-conditioned flavor preference learning requires co-activation of NMDA and dopamine D1-like receptors within the amygdala. *Neurobiol Learn Mem*. 2013; 106: 95-101.
- Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. Glucose-conditioned flavor preference learning requires co-activation of NMDA and dopamine D1-like receptors within the amygdala. *Neurobiol Learn Mem*. 2013;106: 95-101.
- Traverso LM, Quintero E, Vargas JP, De la Casa LG, Lopez JC. Taste memory trace disruption by AP5 administration in basolateral amygdala. *Neuroreport*. 2010; 21: 99–103.

## *Bibliografia*

- Van Hoesen GW, Augustinack JC, Dierking J, Redman SJ, Thangavel R. The parahippocampal gyrus in Alzheimer's disease. Clinical and preclinical neuroanatomical correlates. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 911: 254-74.
- Vanelzakker MB, Zoladz PR, Thompson VM, Park CR, Halonen JD, Spencer RL, et al. Influence of pre-training predator stress on the expression of c-fos Mrna in the hippocampus, amygdala, and striatum following long-term spatial memory retrieval. *Front Behav Neurosci.* 2011; 5: 30.
- Vann SD, Albasser MM. Hippocampal, retrosplenial, and prefrontal hypoactivity in a model of diencephalic amnesia: evidence towards an interdependent subcortical-cortical memory network. *Hippocampus.* 2009; 19:1090–102.
- Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Huganir RL. PKM-z is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature.* 2013; 493: 420–3
- Von Kraus LM, Sacktor TC, Francis JT. Erasing sensorimotor memories via PKMzeta inhibition. *PLoS One.* 2010;5: e11125.
- Walker ML, Scully VM. Disruption of the acquisition of a conditioned taste aversion by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Z Psychol.* 1996; 204: 305–13.
- Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci.* 1999; 19: 1142–8.

Warburton EC, Brown MW. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia*. 2010; 48: 2262-72.

Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR, Aggleton JP, Bashir ZI, Brown MW. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron*. 2003; 38: 987-96.

Welzl H, Alessandri B, Bättig K. The formation of a new gustatory memory trace is prevented by the non-competitive NMDA antagonist ketamine in rats. *Psychobiol*. 1990; 18: 43-7.

Whiteheart SW, Rossnagel K, Buhrow SA, Brunner M, Jaenicke R, Rothman JE. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J Cell Biol*. 1994; 126: 945-54.

Wilkins EE, Bernstein IL. Conditioning method determines patterns of c-fos expression following novel taste-illness pairing. *Behav Brain Res*. 2006; 169: 93-7.

Winters BD, Bussey TJ. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci*. 2005; 25: 52-61.

Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on

## *Bibliografia*

- tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci.* 2004; 24: 5901-8.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Implications of animal object memory research for human amnesia. *Neuropsychologia.* 2010; 48: 2251-61.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32: 1055–70.
- Yamamoto T, Ueji K. Brain mechanisms of flavor learning. *Front Syst Neurosci.* 2011; 5: 76.
- Yamamoto T, Yasoshima Y. Electrophysiological Representation of Taste Memory. In: *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging* (Bermúdez-Rattoni F, ed), Chapter 6. 2007; Boca Raton (FL): CRC Press.
- Yamamoto T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol.* 2006; 69: 243-55.
- Yang Y, Wang XB, Zhou Q. Perisynaptic GluR2-lacking AMPA receptors control the reversibility of synaptic and spines modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 11999-2004.
- Yao Y, Kelly MT, Sajikumar S, Serrano P, Tian D, Bergold PJ, Frey JU, Sacktor TC. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. *J Neurosci.* 2008; 28: 7820-7.

- Yao Y, Kelly MT, Sajikumar S, Serrano P, Tian D, Bergold PJ, Frey JU, Sacktor TC. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. *J Neurosci.* 2008; 28: 7820-7.
- Yasoshima Y, Scott TR, Yamamoto T. Memory-dependent c-Fos expression in the nucleus accumbens and extended amygdala following the expression of a conditioned taste aversive in the rat. *Neuroscience.* 2006;141: 35-45.
- Yasoshima Y, Yamamoto T, Kobayashi K. Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion. *Chem Senses.* 2005;30 Suppl 1:i158-9.
- Yefet K, Merhav M, Kuulmann-Vander S, Elkobi A, Belelovsky K, Jacobson-Pick S, Meiri N, Rosenblum K. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci.* 2006;24: 1434-42.
- Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience.* 1995; 69: 821-9.
- Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW. Mapping visual recognition memory through expression of the immediate early gene c-fos. *Neuroreport.* 1996; 7: 1871-5.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Mishkin M. The neuroanatomy of amnesia: amygdala-hippocampus versus temporal stem. *Science.* 1982; 218: 1337-9.

## **Índice de abreviaturas**

---

**ACTB:** Beta-actin

**AD:** "Alzheimer's disease"

**AM:** Amígdala

**AMPA:** Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

**AMPc:** 3', 5'-adenosinmonofosfato AMPc

**Arc:** "activity-regulated cytoskeleton-associated"

**ATP:** Adenosín trifosfato

**AU1:** "Primary auditory cortex"

**AuD:** "Dorsal auditory cortex"

**BL:** Baseline

**BLA:** "Basolateral Amygdala"

**cDNA:** ADN complementario

**DH:** "Dorsal hippocampus"

**FLI:** "Fos-like immunoreactivity"

**g:** Gramos

**GADPH:** "Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase"

**H<sup>+</sup>:** Iones hidrógeno

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: "Hydrogen peroxide"

**HC**: Hipocampo

**i.p.**: Intra-peritoneal (inyección)

**IC**: "Insular Cortex"

**IEGs**: "Immediate early gene"

**K<sup>+</sup>**: Iones potasio

**LTP**: "Long-term potentiation"

**MAPKAKs**: "MAPK-activated protein kinases"

**MAPKs**: "Mitogen-Activated Protein Kinases"

**mg/Kg**: Miligramos/kilogramos

**Mg<sup>2+</sup>**: Iones magnesio

**ml**: Mililitros

**Na<sup>+</sup>**: Iones sodio

**Narp**: "Neuronal activity-regulated pentraxin"

**ng**: Nanogramos

**NMDA**: N-metil-D-aspartato

**NSF**: "N-ethylmaleimide-sensitive factor"

**NTS**: Núcleo del tracto solitario



*Índice de abreviaturas*

**OLR:** “Object location recognition memory”

**OPR:** “Object-in-place recognition memory”

**p38MAPK:** “P38 mitogen-activated protein kinases”

**PBN:** Núcleo parabraquial

**PBS:** “Phosphate-buffered saline”

**PCR:** “Polymerase Chain Reaction”

**pep2m:** Peptido inhibidor del tráfico de los receptores AMPA

**PKM $\zeta$ :** Proteína Quinasa M $\zeta$

**PRh:** Corteza Perirrinal

**RQ:** “Relative Quantification values”

**RT-qPCR:** “Real-Time quantitative PCR”

**SAPKs:** “Stress-activated protein kinases”

**SEM:** “Standard error of the mean”

**SOR:** “Spontaneous Object Recognition”

**TOR:** “Temporal order recognition memory”

**VPM:** Núcleo ventroposteromedial del tálamo

**ZIP:** Péptido sintético inhibidor de PKM $\zeta$

**$\mu$ l;  $\mu$ m<sup>2</sup>:** Microlitros; Micras cuadradas



# Índice de figuras y tablas

---

## CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Localización anatómica de la corteza perirrinal y regiones relacionadas en el cerebro de la rata.....28
- Figura 2.** Procedimiento estándar con objetos de la vida diaria para evaluar la memoria de reconocimiento de objetos espontánea (SOR).....30
- Figura 3.** Formas geométricas y figuras complejas compuestas de piezas Lego. Modificado de Gámiz and Gallo, 2012.....33
- Figura 4.** Sección coronal del cerebro de la rata teñida con Violeta de Cresilo (2X) en la que se destaca la corteza perirrinal. Microfotografía de la corteza perirrinal (20X) mostrando células activadas durante la memoria de reconocimiento mediante tinción inmunohistoquímica de la proteína c-Fos.....52

## CAPÍTULO 3

- Figure 1.** Mean ( $\pm$ SEM) solution intake during the last day of water baseline, the first and the second exposure to the cider vinegar solution.....83
- Figure 2.** Diagramatic reconstruction of the amygdala lesion, showing the maximum and minimum extent of the damage. The numbers indicate the A-P

coordinates from bregma according to the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 1998).....84

**Figure 3.** Mean ( $\pm$ SEM) counts of Fos-positive cells in the perirhinal cortex after drinking the novel and the familiar solution in the BLA and SHAM groups.....86

**Figure 4.** Representative photomicrographs showing stained Fos-positive cells within the perirhinal cortex after the consumption of the novel versus the familiar solution in the SHAM and BLA lesioned groups.....86

#### **CAPÍTULO 4**

**Table 1.** Timeline depicting the experimental procedure.....98

**Figure 1.** Mean ( $\pm$ SEM) intake during the last day of water baseline and the six saccharin solution exposures.....102

**Figure 2.** Fold Change values for the genes GluR2 (A), NSF (B), Homer1(C) and Narp (D) in PRh, HC, and BLA of Novel, Familiar I and Familiar II groups.....103

#### **CAPÍTULO 5**

**Table 1.** Timeline depicting the experimental procedure.....116

**Figure 1.** A) Representative coronal section of the rat brain showing the sampled regions: dorsal secondary auditory cortex and perirhinal cortex. Each square represents the four images per hemisphere taken (magnification x40).

B) Representative photomicrographs showing stained Fos-positive cells within the perirhinal cortex of the adult and aged groups.....117

**Figure 2.** A) Mean ( $\pm$ SEM) intake in adult and aged groups during the last day of water baseline and the six cider vinegar solution exposures. B) Mean ( $\pm$ SEM) number of c-Fos positive cells in the perirhinal cortex of adult and aged groups after drinking the novel (day 1) or familiar (day 2 and day 6) vinegar flavor solution.....122