



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA EXPRESIÓN DE
PROTEÍNA ARC Y EN LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DONOVAN KEVIN GÁLVEZ MÁRQUEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARTHA LETICIA JIMENEZ PARDO

VOCAL: IGNACIO CAMACHO ARROYO

SECRETARIO: PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA

1er. SUPLENTE: ARIANA ELIZABETH VARGAS CASTILLO

2° SUPLENTE: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PERLA MORENO CASTILLA

SUSTENTANTE :

DONOVAN KEVIN GÁLVEZ MÁRQUEZ

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología de aprendizaje y memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, en el departamento de Neurociencia Cognitiva de la División de Neurociencia del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM. Con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB250870 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN208616.

“La ignorancia es la mejor forma de evadir la realidad, pero el conocimiento es la mejor forma de saber que vives en la ignorancia”

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	7
II. RESUMEN	8
III. INTRODUCCIÓN	
El envejecimiento	9
Condicionamiento Aversivo al Sabor	10
Biomarcadores del envejecimiento	11
Proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad (Arc)	13
Las enzimas desacetilasas de histona y su efecto en la memoria	17
IV. ANTECEDENTES	
El envejecimiento disminuye la expresión de mARN dependiente estimulación por memoria espacial en laberinto acuático de Morris	19
Efecto del envejecimiento en la actividad neuronal y conductual.	20
Efecto de la administración de los inhibidores de las desacetilasas de histona en la plasticidad neuronal en el envejecimiento.	21
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
VI. HIPÓTESIS	23
VII. OBJETIVOS	24
IX. METODOLOGÍA	25
X. RESULTADOS	
Efecto del envejecimiento en la acumulación de la proteína Arc	30
Efecto del envejecimiento en la cantidad de mARN de Arc	38
Efecto del envejecimiento en la actividad conductual	39
Efecto de la administración de los inhibidores de las desacetilasas de histona en el envejecimiento	44
Oligomerización e interacción de la proteína Arc	49
XI. DISCUSIÓN	
Acumulación de la proteína Arc en el envejecimiento	51
El envejecimiento causa disminución de memoria de reconocimiento	53
Acumulación de la proteína por posible oligomerización	55
XII. CONCLUSIÓN	56
XIII. PERSPECTIVAS	57
XIV. REFERENCIAS	58
XV. ANEXOS	
-Anexo I Aprobación de protocolo de manejo de Animales	67

I. ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
Arc	Proteína regulada por actividad asociada a citoesqueleto
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
CA3	Hipocampo CA3
CAS	Condicionamiento Aversivo al Sabor
CI	Corteza insular
CM	Corteza Motora
DAPI	4,6-Diamino-2- fenilindol diclorhidrato
DMSO	Dimetilsulfóxido
E6AP	Ubiquitina proteína asociada a ligasa E6
eEF2	Factor 2 de elongación eucariótico
EGF	Factor de crecimiento epidermal
eIF4AIII	Factor de iniciación eucariótico 4AIII
EIG	Genes de expresión inmediata temprana
EPSP	Potencial post sináptico excitatorio
HAT	Acetiltransferasa de histona
HFS	Estimulación alta frecuencia
HDAC	Desacetilasas de histona
iHDAC	Inhibidor de desacetilasas de histona
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MLP	Memoria a largo plazo
MNK1	Cinasa integradora MAP
NMD	Degradación de mRNA por presencia de mutaciones sin sentido
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
SAHA	Suberoylanilida hidroxámico
WMM	Laberinto Acuático de Morris

II. RESUMEN

El deterioro cognitivo observado en el envejecimiento es un problema de salud pública, en el envejecimiento suceden una gran cantidad de cambios en el sistema nervioso central, la búsqueda de blancos moleculares que ayuden a entender dicha deficiencia ayudará a controlar y detectar la aparición de problemáticas asociadas a la memoria en el envejecimiento. Se ha reportado que en ratas viejas después de la inducción de la memoria por el paradigma de laberinto acuático de Morris (MWM) presentan deficiencia en la memoria, presentando una menor expresión de ARN mensajero (mARN) de Arc y de la proteína *de novo* de Arc observando también que presentan un aumento en la cantidad basal de la proteína Arc, la expresión de la proteína Arc está relacionada con la formación de la memoria y la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP). Se ha encontrado que en ratones viejos está afectada la inducción de la LTP y la memoria de reconocimiento gustativo desde los 10 meses y exacerbándose con la edad. Estos datos apoyan la idea de estudiar la regulación de Arc en el envejecimiento asociado a problemas cognitivos, los resultados obtenidos mostraron que hay un aumento en la cantidad de la proteína basal de Arc en un modelo de ratón la cual se exagera con la edad en diferentes estructuras asociadas a procesos de memoria como corteza insular (CI), corteza motora (CM), hipocampo CA3 (CA3) y amígdala, también observamos un aumento en el cantidad de la proteína Arc en el núcleo relacionada con la regulación negativa de la expresión de receptores participantes en la formación de la memoria. Al realizar la evaluación de la cantidad de mARN de Arc se observa una disminución en el envejecimiento. Se realizó la evaluación de paradigmas que evalúan la memoria, observando un efecto negativo en las tareas de Condicionamiento Aversivo al Sabor (CAS) y MWM en el envejecimiento. Como parte del experimento se observó el efecto que tiene el CAS en la expresión de proteína Arc, observando un aumento en la proteína Arc en la memoria a largo plazo (MLP), con este paradigma y con los datos descritos recientemente donde la administración de inhibidores de las desacetilasas de histona (iHDAC) pueden revertir los efectos negativos en la inducción de la LTP en el envejecimiento y estudios in-vitro donde la administración de iHDAC promueven la expresión de Arc, se realizó la administración de iHDAC en CI durante un paradigma de CAS en ratones envejecidos observado una mejora en el desempeño conductual en la MLP la cual correlaciona con un aumento en el mARN de Arc cuando hay administración de iHDAC. Con base a este resultados podemos concluir los siguientes puntos: (1) El envejecimiento causa un aumento basal en la cantidad de la proteína Arc y una disminución del mARN de Arc (2) Los iHDAC tienen un efecto fundamental en la regulación de expresión de *mARN* de Arc favoreciendo la memoria de reconocimiento por CAS, por lo tanto el aumento en la proteína basal de Arc podría ser uno de los posibles protagonistas causantes de la deficiencia en la memoria en el envejecimiento.

III. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento

El envejecimiento está definido como el proceso biológico en el cual existe una variación molecular y celular, afectando el funcionamiento y aumentando el riesgo de contraer enfermedades, donde se observa una disminución progresiva en la función física y mental (Kirkwood, 2008), el declive en las funciones es afectado principalmente por factores genéticos y ambientales (Steves, Spector, & Jackson, 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido el envejecimiento saludable como el proceso de fomentar y mantener la capacidad funcional, lo cual permite un bienestar en la vejez (World Health Organization, 2015). Con base en la OMS se estima un gran crecimiento en la cantidad de personas con más de 60 años para el 2050 (World Health Organization, 2015) debido al aumento en la esperanza de vida (Christensen, Doblhammer, Rau, & Vaupel, 2009), aumentando el riesgo de padecer una enfermedad asociada al envejecimiento. (Marengoni et al., 2011).

Efecto del envejecimiento en los procesos cognitivos

Durante el envejecimiento se ven afectados una gran cantidad de mecanismos moleculares, aumentando la prevalencia de deficiencia cognitiva, demencia o la enfermedad de Alzheimer en más del 50% de las personas mayores a 85 años en EUA (Hebert, Scherr, Bienias, Bennett, & Evans, 2003). La disminución en los procesos cognitivos está asociada a una deficiencia en el procesamiento de la información, la disminución en la capacidad de memoria de trabajo y en la disminución de memoria a largo plazo (MLP), las cuales son afectadas en el envejecimiento (Park & Reuter-Lorenz, 2009). Con ayuda de técnicas de neuroimagen como la imagenología de resonancia magnética funcional se ha permitido observar el efecto del envejecimiento en la actividad neuronal (Bishop, Lu, & Yankner, 2010), observando una disminución en las funciones cognitivas donde la actividad neuronal es menos localizada en regiones como la corteza frontal (Andrews-Hanna et al., 2007). También se ha observado una disminución en la cantidad de receptores dopaminérgicos, los cuales participan en la modulación y consolidación de la memoria (Li, Lindenberger, & Sikström, 2001). En general en el envejecimiento se afecta el funcionamiento neuronal que se ve reflejado en un deterioro cognitivo, el cual es posible evaluar mediante tareas conductuales en modelos animales, tales como condicionamiento aversivo al sabor (CAS).

Como ya se ha descrito diversos factores afectan el correcto funcionamiento fisiológico en el envejecimiento, no obstante el declive en las funciones no es proporcional en cada individuo, se plantean teorías las cuales ayudan a comprender la variabilidad asociada a cada individuo permitiendo tener un panorama compensatorio al deterioro y observar una gran variedad asociada a cada individuo en el envejecimiento (Park & Reuter-Lorenz, 2009).

Condicionamiento Aversivo al Sabor

El condicionamiento aversivo al sabor (CAS) es un tipo de aprendizaje asociado a un mecanismo de defensa en contra del envenenamiento a diversos alimentos (Garcia, Hankins, & Rusiniak, 1974). Este tipo de aprendizaje se encuentra altamente conservado en diversas especies, donde se combina el aprendizaje aversivo y la aversión innata a los alimentos: sabor, textura, olor (Bernstein, 1999). El CAS se define como el consumo de un alimento (estímulo condicionado), el cual produce un estímulo aversivo (estímulo incondicionado) la respuesta aversiva estará dada por un condicionamiento clásico (Chambers, 1990).

El estímulo condicionado puede presentarse de diversas formas, entre las que se encuentran la novedad, donde se observa que la exposición a un estímulo gustativo novedoso tendrá un efecto mayor en el aprendizaje comparado con un estímulo familiar, denominado Neofobia (Revusky & Bedarf, 1967). La relación sabor-olor tienen un rol fundamental en la ingestión, observando una mayor aversión cuando el estímulo se ve acompañado de señalización de gusto y olor (Palmerino, Rusiniak, & Garcia, 1980), la composición nutricional también es un componente fundamental en la aversión, el consumo de proteínas causa una mayor aversión, en comparación a los carbohidratos, esto está asociado a la predisposición de proteínas relacionadas con diversas enfermedades, el mayor tiempo de eliminación y metabolización de las proteínas (Midkiff & Bernstein, 1985) El estímulo incondicionado de mayor relevancia en el CAS son aquellos causantes de actividad emética, sin embargo se pueden presentar otro tipo de estímulos como la presencia de alergias (Bernstein, 1999).

El CAS permite evaluar diversos parámetros como la adquisición, consolidación y la extinción de la memoria del estímulo aversivo, en el envejecimiento se observa una disminución en la capacidad de memoria de largo plazo, siendo la extinción de la memoria con mayor rapidez (Misanin et al., 2002).

Paradigma del condicionamiento aversivo al sabor

Experimentalmente el CAS se basa en presentar un sabor novedoso (estímulo condicionado) e inducir un malestar gastrointestinal (estímulo incondicionado), provocando una memoria aversiva al sabor. Durante el protocolo los animales son privados de agua, acompañado de un entrenamiento con acceso a consumo de agua durante un periodo definido, una vez que los animales tienen un consumo estable se expone a un nuevo estímulo condicionado (sacarina 0.3%) denominada adquisición, posteriormente se presenta el estímulo incondicionado mediante la administración intraperitoneal de LiCl (0.4 M) observando un efecto después de 5 minutos de la administración aumentando el peristaltismo, causando diarrea e hiperreactividad. Los

síntomas desaparecen aproximadamente de 5 a 10 horas después de la administración de LiCl. Al día siguiente se realiza la prueba de MLP mediante la exposición del estímulo condicionante y agua. La razón entra la cantidad ingerida de sacarina y total de consumo indica la preferencia por el sabor condicionado, evaluando los días posteriores para observar la extinción del trazo de la memoria (Molero Chamizo, 2007)(Bures, Jan, Bermúdez-Rattoni, Federico, & Yamamoto, Takashi, 1998)

Estructuras cerebrales implicadas en el Condicionamiento Aversivo al Sabor

Diversos estudios en los que se ha lesionado específicamente regiones cerebrales han logrado dilucidar las estructuras cerebrales participante en el CAS, estructuras como corteza insular (CI), amígdala, hipocampo e hipotálamo participan en las diversas etapas de la memoria por CAS (Tabla 1). La corteza insular toma relevancia ya que es una estructura importante en la asociación de reacciones viscerales, en el procesamiento de los sabores y en la formación de la memoria (Foy, MR & Foy, JG, 2009).

Memoria	Estructura
Detección de sabor	Área postrema, núcleo de tracto solitario amígdala, glosofaríngea, nervio vagal
Neofobia	Hipocampo, glóbulo pálido
Adquisición CAS	Núcleo parabranchial, Tálamo, Glóbulo pálido, amígdala, corteza prefrontal
Fuerza de CAS	Corteza insular, hipocampo, corteza prefrontal
Retención CAS	Núcleo parabranchial, glóbulo pálido, amígdala, Corteza Prefrontal
Extinción de CAS	Hipotálamo, hipocampo, corteza insular, corteza prefrontal

Tabla 1. Estructuras que participan en el Condicionamiento Aversivo al Sabor
(Foy, MR & Foy, JG, 2009)

Biomarcadores del envejecimiento

Los biomarcadores del envejecimiento son aquellos cambios funcionales y de composición corporal que pueden servir como medida de la edad biológica y para predecir la aparición de enfermedades relacionadas con la edad (Vasto et al., 2010). Los biomarcadores deben ayudar a caracterizar el declive biológico y a identificar individuos con alto riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con el envejecimiento. Los principales marcadores son aquellos a nivel molecular, donde se tiene relación directa con el daño a macromoléculas (Kirkwood, 2005) entre los que se encuentran son: la inestabilidad genómica, alteración epigenética, pérdida de proteostasis, desregulación en captación de nutrientes, envejecimiento celular entre otros (López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013).

Alteraciones genómicas

La estabilidad e integridad del ADN es comprometida por factores exógenos (físicos, químicos, agentes biológicos) o factores endógenos (errores en la replicación de ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y la generación de especies reactivas de oxígeno) (Hoeijmakers, 2009). La teoría de la mutación somática postula que las mutaciones y las diversas formas de daño al ADN durante el curso de nuestra vida da lugar a una disminución de las funciones celulares, reduciendo la esperanza de vida del individuo (Szilard, 1959). Se ha observado que la variación entre especies en la tasa de reparación del ADN correlaciona con la esperanza de vida, manteniendo una relación directa entre el aumento de la capacidad de reparación del ADN y la esperanza de vida (Promislow, 1994).

Las alteraciones epigenéticas afectan a una gran cantidad de células en las que se ven comprometidos mecanismos como la metilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de las histonas y el reestructuramiento de la cromatina. Las modificaciones en las Histonas tienen impacto directo en la reparación y estabilidad del genoma, a través de la regulación transcripcional afectando la presencia de moléculas necesarios para un correcto funcionamiento celular (López-Otín et al., 2013). La hipermetilación del ADN y las modificaciones en las histonas están ligados al cambio en la estructura de la cromatina (Maegawa et al., 2010), con ello la pérdida de la heterocromatina y su redistribución, asociados al envejecimiento en ciertos tejidos (Oberdoerffer & Sinclair, 2007), ejemplo una mutante deficiente de la proteína desacetilasa de histona de la familia de sirtuinas SIRT6 resulta en un mayor declive en el envejecimiento (Mostoslavsky et al., 2006).

En resumen las alteraciones en el ADN modificará el correcto funcionamiento celular, siendo evidente en el envejecimiento, donde se observa la acumulación del daño al ADN ocurrido durante el transcurso de la vida.

Alteración proteómica

Una gran cantidad de enfermedades relacionadas al envejecimiento tienen su etimología en la desregulación de la homeostasis de las proteínas (proteostasis)(Powers, Morimoto, Dillin, Kelly, & Balch, 2009), donde la alteración de mecanismos como el correcto plegamiento, síntesis, degradación y transporte de las proteínas están afectados (Hartl, Bracher, & Hayer-Hartl, 2011, Koga, Kaushik, & Cuervo, 2011). El decremento en la regulación de la proteostasis puede estar asociada a enfermedades como fibrosis quística (pérdida de función de proteína) o enfermedades como el Alzheimer, Parkinson o la Enfermedad de Huntington (Función tóxica de las proteínas)(Powers, Morimoto, Dillin, Kelly, & Balch, 2009). Uno de los factores que afecta el funcionamiento de las proteínas es la disminución de actividad de las chaperonas las cuales participan en diversos mecanismos de activación,

plegamiento y estabilidad de las proteínas (Calderwood, Murshid, & Prince, 2009). En modelos de gusanos se ha observado que una sobre expresión de las chaperonas esta ligado a un aumento en la esperanza de vida (Walker & Lithgow, 2003). Otro mecanismo relacionado al control de la proteostasis es la desregulación de los sistemas proteolíticos implicados en el control de la degradación de las proteínas, entre los sistemas que se encuentran afectados a causa del envejecimiento es la autofagia lisosomal y el sistema de ubiquitin-proteosoma (Tomaru et al., 2012). Se ha observado que la activación de la proteína de señalización EGF (Factor de crecimiento epidermal) aumenta la expresión de los sistemas de ubiquitin-proteosoma aumentando la longevidad (Liu, Rogers, Murphy, & Rongo, 2011). De igual forma el aumento de la actividad de inhibidores de ubiquitilasa o activadores del proteosoma aumenta la degradación de proteínas tóxicas disminuyendo los efectos en el envejecimiento (Lee et al., 2010). Por lo tanto la búsqueda de biomarcadores que afectan la proteostasis podrían ayudar a comprender mejor la disminución de funciones fisiológicas en el envejecimiento.

Proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad (Arc)

La capacidad que tiene el cerebro para establecer una memoria y procesar información está establecida por las conexiones que existen entre las neuronas, donde se ha observado que para favorecer cambios en la fuerza sináptica se requiere de la transcripción *de novo* de RNA y de la síntesis de proteínas (Guzowski et al., 2000). En este proceso los genes de expresión inmediata (IEG) son fundamentales debido a su rápida inducción en las neuronas en presencia de un estímulo. Los IEG son inducidos rápidamente en las neuronas en respuesta de una estimulación neuronal, siendo fundamentales para la plasticidad neuronal (Cole, Saffen, Baraban, & Worley, 1989). Se ha demostrado que los IEG tienen diversas funciones participando en la codificación de diversos factores de transcripción, factores de crecimiento, enzimas de señalización, enzimas metabólicas y proteínas estructurales (Lanahan & Worley, 1998). Entre los que se encuentra la proteína regulada por actividad asociada a citoesqueleto (Arc), la cual es indispensable para la formación de la memoria (Lyford et al., 1995a)(Cole et al., 1989).

La proteína Arc fue descrito por primera vez por Lyford y colaboradores en 1995, la secuencia de mensajero de ARN (mARN) contiene aproximadamente 3.2 kb, con un peso molecular de la proteína de Arc de 55kDa (Lyford et al., 1995b). El mARN de Arc es inducido rápidamente mediante un estímulo dependiente de receptores glutamatérgicos (Receptores AMPA) (Lyford et al., 1995b), dependiente de receptores tirosina cinasa (RTK) (Bramham, Worley, Moore, & Guzowski, 2008) y por mecanismos dependientes de dopamina (Fosnaugh, Bhat, Yamagata, Worley, & Baraban, 1995) los cuales desencadenan una cascada de señalización dependiente de la proteína extracelular reguladora de cinasas (ERK) y la proteína cinasa A (PKA) favoreciendo la

transcripción de Arc (Figura 1). El mRNA de Arc es transportado a través del axón hasta las dendritas (Lyford et al., 1995a)(Link et al., 1995), distribuyéndose en las regiones que intervienen en los estímulos sinápticos, donde se traduce la proteína, (O. Steward, Wallace, Lyford, & Worley, 1998), siendo necesaria la síntesis de novo Arc para favorecer la plasticidad sináptica, la estabilización y consolidación de la memoria largo plazo (Guzowski et al., 2000). Arc interactúa con actina, que es fundamental en la formación de micro-filamentos componentes del citoesqueleto indispensables para formación de espinas dendríticas favoreciendo la plasticidad sináptica.

Traducción de Arc

La traducción de Arc es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis sináptica, donde el proceso de la traducción se encuentra regulado principalmente por la degradación de mRNA por presencia de mutaciones sin sentido denominada NMD, este mecanismo se encuentra colocalizada con el factor de iniciación eucariótico 4AIII (eIF4AIII) (Giorgi et al., 2007) indispensable para la formación del complejo ribosomal para la traducción, eIF4AIII es dependiente de su fosforilación, aumentando la traducción cuando se encuentra fosforilado, la fosforilación es realizada por la cinasa integradora MAP (MNK1) dependiente de la activación de ERK(Richter & Sonenberg, 2005). Otro factor que modula la síntesis de proteína en el proceso de elongación es el factor 2 de elongación Eucariótico (eEF2), donde la fosforilación favorece la traducción de Arc (Belelovsky, Elkobi, Kaphzan, Nairn, & Rosenblum, 2005). Se ha reportado que la modulación de la traducción de Arc está relacionada con la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP)(Yilmaz-Rastoder, Miyamae, Braun, & Thiels, 2011), también la regulación de la traducción de la proteína Arc está asociada a la activación de receptores NMDA.(Bloomer, VanDongen, & VanDongen, 2008). Por lo tanto la regulación de la traducción establecerá el estado que presentan las neuronas, regulando mecanismos de plasticidad neuronal mediante la inducción de la LTP y la formación memoria.

Degradación de proteína Arc

La principal forma de degradación de la proteína Arc se realiza mediante la ubiquitina asociada a ligasa E6 (E6AP) codificada por el gen Ube3A, encargada de marcar a la proteína para su posterior degradación, se ha observado que hay un aumento en los niveles de la proteína Arc en neuronas knock-out del gen Ube3A (Kühnle, Mothes, Matentzoglou, & Scheffner, 2013). Un aumento en la cantidad de la proteína Arc causa una disminución en la capacidad cognitiva esto debido a la relación entre la actividad de Ube3A y la expresión de receptores AMPA, donde la pérdida de función de Ube3A causa un reducción en los receptores AMPA a causa de la sobre expresión en la proteína Arc, la cual regula el tránsito de los receptores AMPA (Greer et al, 2013).

Función de Arc

Múltiples funciones están asociadas a la expresión *de novo* Arc entre las que se encuentra la plasticidad sináptica mediada por la interacción de la proteína Arc con actina la cual es fundamental en la formación de micro-filamentos componentes del citoesqueleto indispensables para formación de espinas dendríticas favoreciendo la plasticidad sináptica, la consolidación y el mantenimiento de la memoria (Guzowski et al., 2000), por lo tanto resulta de gran importancia para la MLP.

Se ha determinado en diversas actividades conductuales la participación de la proteína Arc en la MLP en pruebas como Laberinto Acuático de Morris (MWM), el condicionamiento al miedo mediante contexto visual y auditivo, reconocimiento de objeto y el CAS (Plath et al., 2006). La proteína Arc participa activamente en los procesos de modificación estructural favoreciendo la densidad postsináptica (Bourne & Harris, 2008) y el alargamiento de espinas dendríticas postsinápticas (Lyford et al., 1995a). La regulación de la actividad de depresión o excitación sináptica es dependiente de la expresión de Arc, en donde se ha observado que la rápida expresión de la proteína Arc interactúa con la maquinaria endocítica como dinamina y endofilina favoreciendo la internalización de receptores AMPA del tipo glutamato, mediando negativamente la plasticidad sináptica (Chowdhury et al., 2006) (Diering, Gustina, & Haganir, 2014).

Relación de Arc con diversas patologías

Se ha observado que el aumento o disminución de la expresión de Arc está asociada a diversas patologías, tal es el caso de la depresión en donde tratamientos antidepresivos causan un aumento en la regulación positiva del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) incrementando la transcripción del mRNA de Arc, observando una regulación positiva de Arc causando la inducción de la LTP (Molteni, Calabrese, Mancini, Racagni, & Riva, 2008). La adicción a diferentes drogas es también dependiente BDNF y la fosforilación de ERK favoreciendo la expresión de la proteína Arc e incrementando la densidad de espinas dendríticas (Pandey et al., 2008). En la enfermedad de Alzheimer en modelo de ratón se ha observado un aumento en la cantidad de proteína Arc (Morín, Díaz-Cintra, Bermúdez-Rattoni, & Delint-Ramírez, 2016). En el Síndrome de Angelman es caracterizada por una debilitación neurobiológica, el cual es causado por la mutación de la Ubiquitina E3 ligasa Ube3A, siendo el principal mecanismo de degradación de Arc, causando un aumento en la cantidad de Arc y por lo tanto la internalización de los receptores AMPA, observando una disminución en las funciones cognitivas (Tomaić & Banks, 2015). La regulación de la proteína Arc es de gran importancia para la modulación de la memoria, siendo una de las protagonistas causantes de deficiencia cognitiva y la adicción.

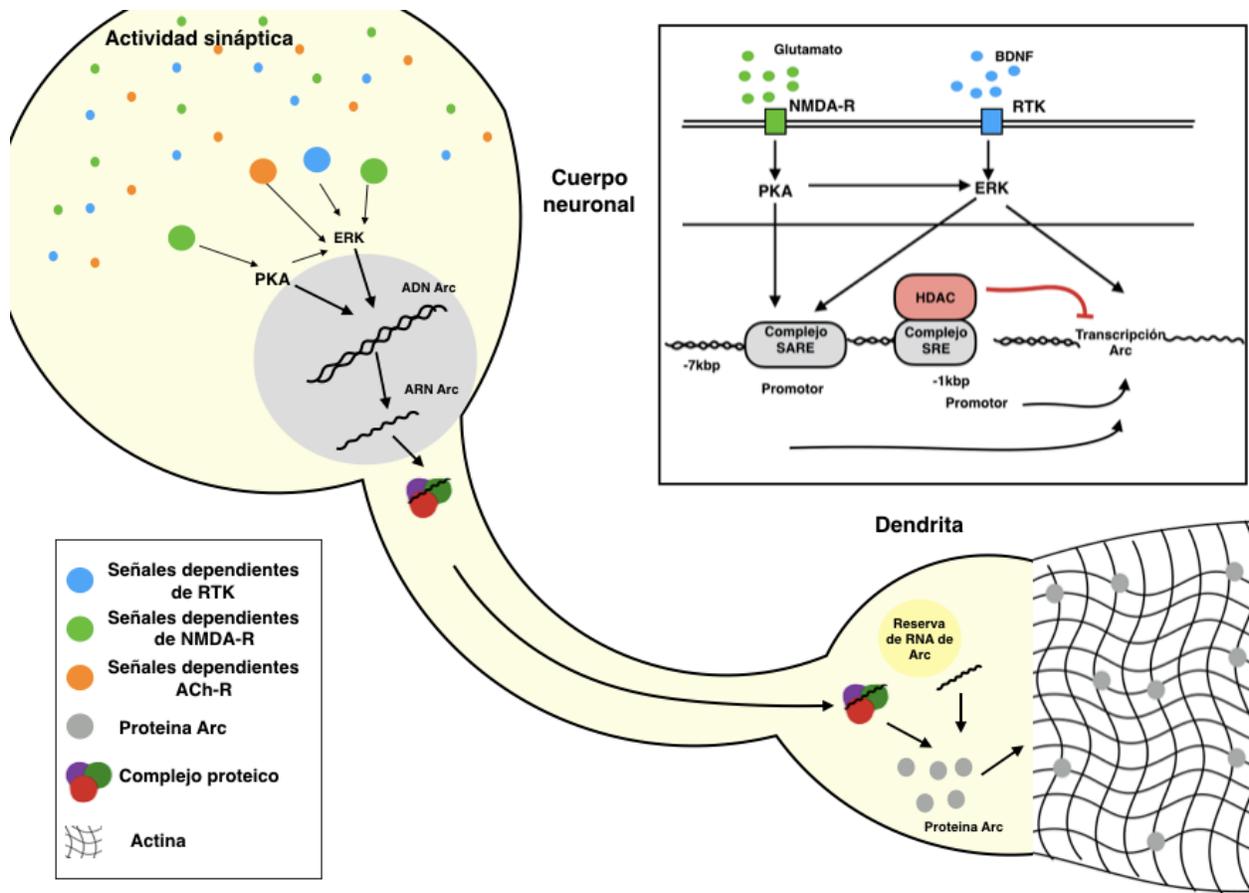


Figura 1. Proteína Asociada a Citoesqueleto Regulada por Actividad. La transcripción de la proteína Arc es dependiente de la activación neuronal, mediante señales dependientes de receptores NMDA, receptores RTK, receptores dopaminérgicos y colinérgicos donde se activan cascadas de señalización dependiente de PKA y ERK favoreciendo la transcripción del mRNA de Arc, posteriormente el mRNA es trasladado por un complejo proteico hasta las dendritas. El mRNA de Arc proveniente del núcleo y las reservas de Arc presentes en las dendritas es traducido para interactuar con actina la cual favorece la formación de espinas dendríticas. El gen de Arc contiene sitios reguladores de la transcripción, donde las proteínas desacetilasas de histona (HDAC) regular negativamente la transcripción de mRNA de Arc mediante la unión a elementos de respuesta a suero (SER) (Fukuchi et al., 2015) (Bramham et al., 2010)

Expresión de Arc en el envejecimiento

La disminución cognitiva observada en el envejecimiento está relacionada con la disminución del mRNA de Arc (Yilmaz-Rastoder et al., 2011), se ha observado mediante la inducción de mRNA de Arc por efecto conductual de memoria espacial, hay una disminución en la cantidad de transcripto de Arc en el envejecimiento, la cual correlaciona con una deficiencia en la memoria espacial (Fletcher et al., 2014), indicando que es indispensable un aumento en la cantidad de mRNA de Arc para favorecer la memoria espacial.

Expresión de la proteína Arc en el Condicionamiento Aversivo al Sabor

La proteína Arc es fundamental en la plasticidad neuronal, la cual es necesaria para la formación de la memoria aversiva en el CAS, se ha observado en ratones deficientes del gen codificante para la proteína Arc no son capaces de generar una memoria a largo plazo y presentan una disminución de la neofobia durante el CAS, destacando que la proteína Arc es esencial en la memoria de asociación aversiva-gustativa (Plath et al., 2006).

Las enzimas desacetilasas de histona y su efecto en la memoria

La acetilación de la lisina en las histonas es un mecanismo reversible y altamente regulable, las denominadas acetiltransferasa de histona (HAT) y desacetilasas de histona (HDAC) son las encargadas de adicionar o remover el grupo acetil respectivamente (Vidali, Gershey, & Allfrey, 1968). Entre las funciones de los HDAC y HAT está regular la señalización, transcripción, traducción, localización, y la estabilidad de las proteínas (Spange, Wagner, Heinzl, & Krämer, 2009), favoreciendo o inhibiendo la unión de la RNA polimerasa II al gen (Matsui, Segall, Weil, & Roeder, 1980), regulando la transcripción (Figura 2). Las HDAC se pueden clasificar en cuatro clases: la clase I, II, IV son dependientes de zinc -, y la Clase III son dependiente de NAD⁺ pertenecientes a la familia de Sirtuinas (de Ruijter, van Gennip, Caron, Kemp, & van Kuilenburg, 2003). La relación entre HAT/HDAC es fundamental en la regulación de diversos procesos fisiológicos y procesos patológicos que contribuyen a la homeostasis (Peserico & Simone, 2010).

Efecto de los inhibidores de los HDAC

La relación entre HAT/HDAC regula diversos procesos, muchos de estas modificaciones están relacionadas con el envejecimiento y diversas patologías como el cáncer, desordenes neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares (Haberland, Montgomery, & Olson, 2009). Los HDAC favorecen diversos estados asociados a enfermedades neurodegenerativas y cáncer por lo que los inhibidores de las HDAC (iHDAC) son utilizados para el tratamiento estos padecimientos. Actualmente se usan dos tipos de iHDAC para el tratamiento: el ácido hidroxámico de suberoylanilida (SAHA) y el MS-275, los cuales aumentan la acetilación de las histonas, disminuyendo los déficits cognitivos y la disminución motora presentes en enfermedades como el Alzheimer, Parkinson y Huntington (Mattson, 2004). Muchas de estas enfermedades están asociadas a la agregación de proteínas interfiriendo con la transcripción, el uso de la iHDAC favorece la transcripción y por lo tanto una disminución en el declive cognitivo.

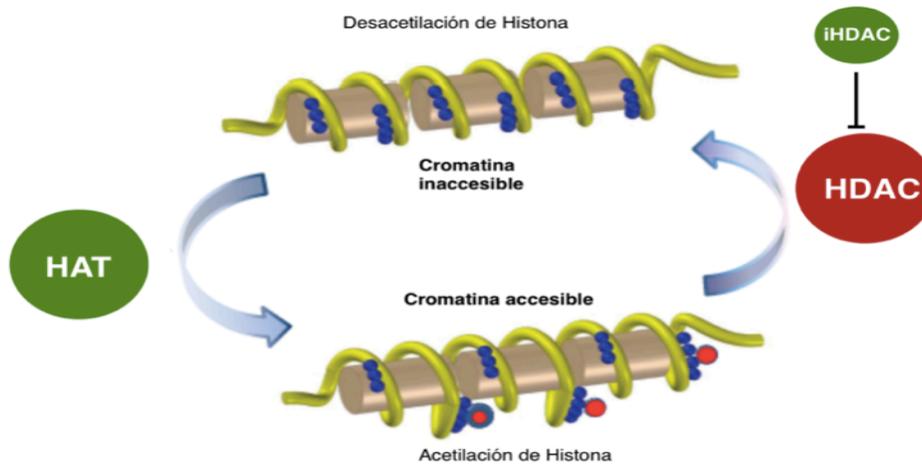


Figura 2. Relación de HAT/HDAC en la regulación de expresión de los genes, los HAT participan activamente favoreciendo la acetilación de las histonas favoreciendo la transcripción de los genes, los HDAC se encargan de remover lisinas de las histonas inhibiendo la transcripción. Los inhibidores de HDAC favorecen la transcripción de los genes (Peserico & Simone, 2010).

Efecto de iHDAC en la regulación de Arc

La transcripción de Arc esta regulada por regiones como los elemento de respuesta a suero (SRE), que están regulados por la activación de receptores NMDA y receptores RTK dependientes de PKA y ERK. Los HDAC se unen a los Factor de respuesta a suero (SFR) los cuales interaccionan con los sitios SRE regulando negativamente la transcripción de Arc (Figura 1). Se ha observado que los iHDAC incrementan las señales dependientes de los receptores RTK, en especial los iHDAC de tipo I /II b como SAHA y los de clase I como MS-275, observando un aumento en la expresión de la proteína Arc. Por lo tanto inhibición de los HDAC mediante el uso de iHDAC está regulando la transcripción de Arc y por lo tanto la modulación de la memoria (Fukuchi et al., 2015).

IV. ANTECEDENTES

El envejecimiento disminuye la expresión de mRNA dependiente de estimulación por memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

Fletcher y colaboradores describen que hay una disminución en la cantidad mRNA de Arc inducido por un paradigma de memoria espacial de laberinto acuático de Morris (WMM) en ratas wistar de 24 meses comparado con el grupo control de ratas de 6 meses, esto mediante la técnica de hibridación in-situ. Se dividió el grupo de ratas de 21 meses en grupos que tiene un buen aprendizaje (AU) y en aquellos que no aprendieron (AI), esto con el fin de evitar variabilidad, observando que en aquellas ratas que no presentaron un buen aprendizaje hay una disminución en la cantidad del transcripto comparado con aquellas que aprendieron la tarea en regiones como el Hipocampo CA3 y CA1 estructuras implicadas en la memoria espacial (Figura 3)(Fletcher et al., 2014). Dicho resultado indica que existe una relación directa entre la cantidad de mRNA y la deficiencia en una memoria espacial como el MWM. Para evaluar si la cantidad del transcripto está relacionada con la cantidad de proteína y por lo tanto una disminución en la capacidad de memoria espacial en el MWM. Fletcher y colaboradores observan que en las ratas de 24 meses que tienen un buen aprendizaje presentan un aumento de la cantidad de la proteína Arc equivalente al aumento en ratas control, sin embargo en aquellas ratas con mal aprendizaje no hay un aumento en la cantidad de la proteína, por otro lado es posible observar que la cantidad de proteína basal es estadísticamente mayor en el grupo de ratas con mal aprendizaje (AI) comparado con el control en regiones de Hipocampo CA1(Figura 4). El aumento en la cantidad de proteína basal podría estar afectando la homeostasis sináptica en el envejecimiento (Diering et al., 2014).

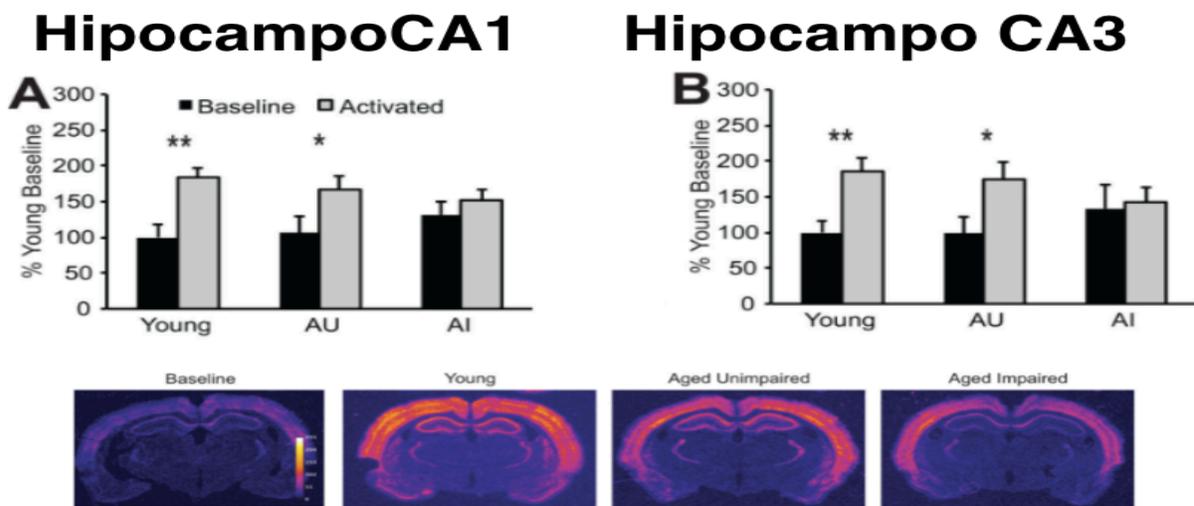


Figura 3. Disminución de mRNA de Arc en el envejecimiento por inducción de memoria espacial. Descripción en siguiente pagina

Figura 3. Disminución de mRNA de Arc en el envejecimiento por inducción de memoria espacial. Ratas wistar de 24 meses presentan una disminución en la capacidad espacial comparado con un grupo de 6 meses, observando una disminución en la cantidad del transcritpo mediante hibridación in situ en regiones A. CA1, B CA3, Las imágenes fueron tomadas en ratas en línea basal o después de 30 minutos del entrenamiento. Distinguiendo entre ratas que presenta un aprendizaje AU y aquellas que no presentan aprendizaje AI . Imagen tomada y modificada (Fletcher et al., 2014)

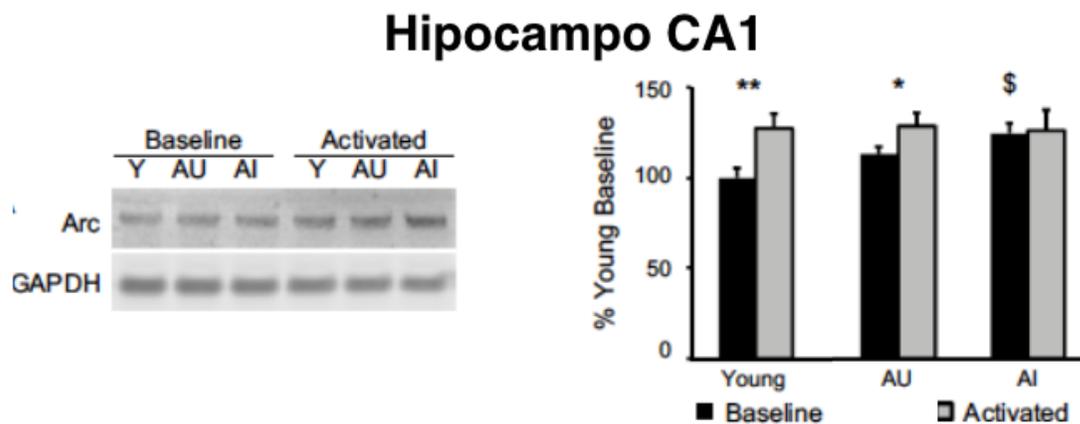


Figura 4. Niveles basales de la proteína Arc. Cantidad de proteína expresada en ratas wistar de 25 meses y 6 meses, en diversas regiones asociadas a la memoria espacial A. CA1 y B. CA3, observando que hay un aumento en la cantidad de proteína basal en el envejecimiento mediante el análisis de SDS-PAGE. (Fletcher et al., 2014)

Efecto del envejecimiento en la actividad neuronal y conductual.

Con base a experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Bermúdez Rattoni y datos de la literatura se observa que el envejecimiento tiene un efecto negativo en actividad neuronal y conductual (Plath et al., 2006). En este caso se establece una estrecha relación entre el envejecimiento y la tarea de memoria del CAS, donde se observa una disminución en la capacidad de memoria a largo plazo 10 meses y exacerbándose con la edad (Figura 5A), es decir la asociación del estímulo aversivo-gustativo es menos fuerte en el envejecimiento observando un mayor consumo de sacarina en la prueba de MLP en ratones con mayor edad (Moreno-Catilla, en preparación).

La plasticidad simpática esta relaciona con la presencia de un estado de LTP, donde datos obtenidos previamente en el laboratorio del Dr. Bermúdez Rattoni mediante la inducción de la LTP por estimulación de alta frecuencia (HFS) mediante 10 trenes de 100Hz/1s/20s inter tren en amígdala y registro del potencial post sináptica excitatorio (EPSP) en corteza insular (CI) se observa que en el envejecimiento deficiencia de la inducción de la LTP después de la estimulación de HFS, a diferencia del grupo control

que presenta LTP después de la estimulación de HFS(Figura 5B)(Moreno-Catilla, en preparación). Indicando que en el envejecimiento se está afectado la inducción y mantenimiento de la LTP, debido a la disminución de la expresión de receptores NMDA y AMPA relacionados en la inducción inducción de la LTP (Wu et al., 2011).

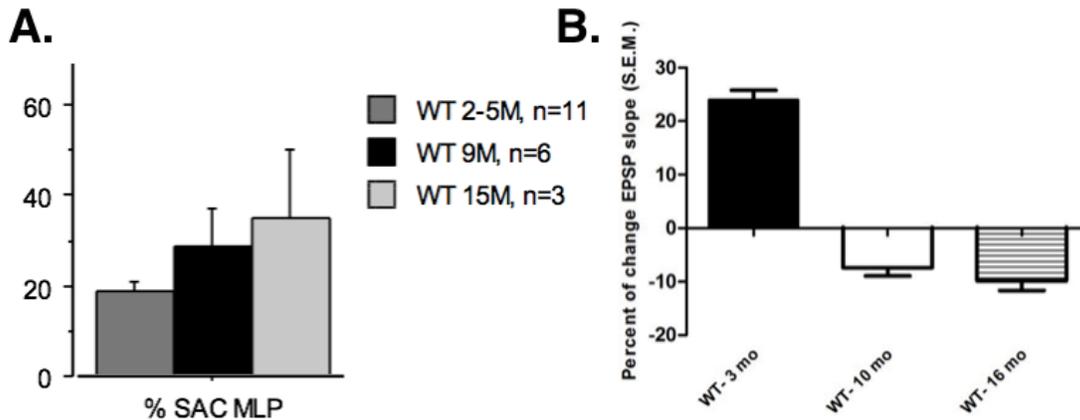


Figura 5 Efecto de envejecimiento en memoria aversiva y efecto en la plasticidad neuronal. Se observa una disminución en la A. Memoria Largo Plazo de la memoria aversiva en la tarea conducta de Condicionamiento Aversivo al Sabor, observando una disminución gradual en la MLP en el envejecimiento en ratones WT de 2 , 9 y 15 meses de edad. B. Inducción de la LTP por HFS 100Hz/1s/20s en amígdala y registro de EPSP en corteza insular en ratones de 3 meses, 10 meses y 16 meses de edad(Moreno-Catilla, en preparación)

Efecto de la administración de los inhibidores de las desacetilasas en la plasticidad neuronal en el envejecimiento.

Con base a lo descrito por literatura, donde determinan que la síntesis *de novo* Arc es esencial para la presencia de un estado de LTP (Guzowski et al., 2000), y estudios más recientes, donde se observa que la regulación de la transcripción de mRNA de Arc tiene impacto directo en la homeostasis sináptica y por lo tanto en la inducción de la LTP (Béïque, Na, Kuhl, Worley, & Huganir, 2011) en el laboratorio del Dr. Bermúdez Rattoni al realizar la inducción de la LTP por HFS mediante 10 trenes de 100Hz/1s/20s inter tren en amígdala y registro de potencial post sináptico excitatorio en CI en ratones de 16 meses se observa que hay deficiencias en la inducción de la LTP, sin embargo al administrar un inhibidor de las desacetilasas de histona MS-275 1.5 h antes de la inducción de la LTP en CI, se observa que se recupera la inducción de la LTP en ratones de 16 meses al registrar el EPSP en CI (Figura 6) indicando que la administración de iHDAC favorecen la plasticidad sináptica y la presencia de las LTP al

ser inducido por HFS, con base en lo descrito por Fukuchi los iHDAC están regulado directamente la transcripción de Arc, pudiendo ser Arc uno de los protagonistas que favorecen la plasticidad sináptica después de la administración de iHDAC (Fukuchi et al., 2015a).

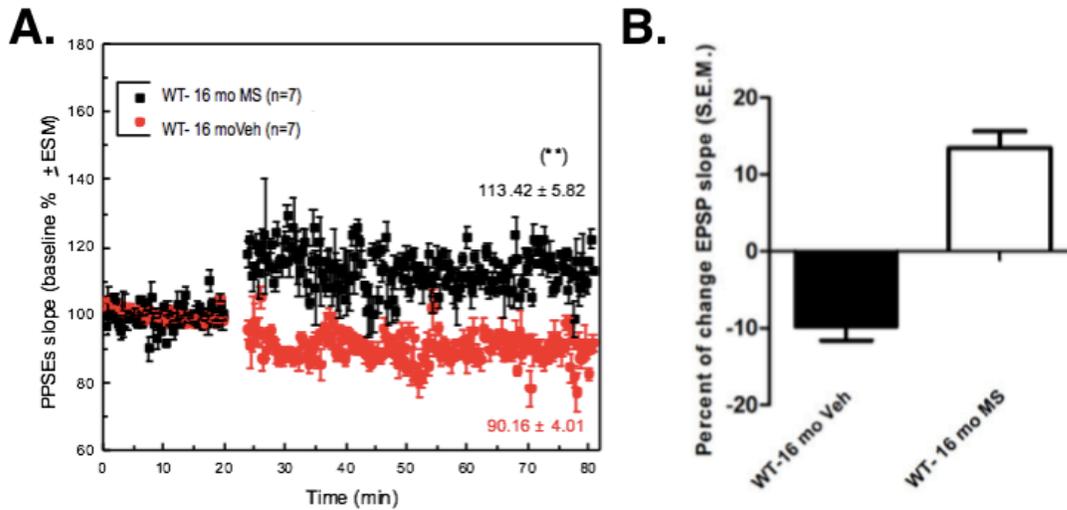


Figura 6. Administración de iHDAC en el envejecimiento. A, B. Efecto de la administración de iHDAC (MS-275) 1.5 h antes de la inducción de la LTP por HFS mediante 10 trenes de 100Hz/1s/20s intertren en amígdala y registro de EPSP en la corteza insular. A. EPSP a través del tiempo en ratones de 16 meses administrados con Vehículo o MS-275 en CI. B. Promedio de EPSP en ratones de 16 meses administrados con Vehículo y MS-275. Modificado Moreno-Catilla, 2016.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el envejecimiento se observa un deterioro cognitivo lo cual es un problema de salud pública, no se ha logrado determinar los cambios que existen en el sistema nervioso central que atribuyen esta deficiencia en la memoria, la búsqueda de mecanismos que ayuden a entender dicha deficiencia ayudará a la búsqueda nuevos blancos moleculares que podrían controlar los déficit cognitivos y para la detección temprana de la aparición de este tipo de problemáticas en la memoria. Se ha reportado que en ratas viejas después de la inducción de la memoria por el paradigma de MWM presentan deficiencia en la memoria, presentando una menor expresión de mRNA de Arc y de la proteína *de novo* de Arc observando también que presentan un aumento en la cantidad basal de la proteína Arc, La expresión de la proteína Arc está relacionada con la inducción de la LTP y en la formación de la memoria, se ha encontrado que en ratones viejos está afectada la inducción de la LTP y la memoria de reconocimiento gustativo desde los 10 meses de edad y exacerbándose con la edad. También se ha encontrado que la administración de la iHDAC pueden revertir los efectos negativos en la inducción de la LTP, sin embargo no se sabe el mecanismo por el cual se está restaurando la inducción de la LTP, ni el efecto que podría tener en la conducta. En estudios in-vitro se ha observado que la administración de la iHDAC promueven la expresión de Arc. Por lo dicho anteriormente se plantea evaluar la expresión de mRNA y la proteína de Arc en ratones en diferentes edades, observando el efecto conductual, también se evaluara si la administración de iHDAC (MS-275) tiene un efecto sobre una prueba conductual, sobre la expresión de mRNA y la proteína de Arc en el envejecimiento, determinando si Arc es uno de los protagonistas causantes de dicha deficiencia en la memoria en el envejecimiento.

VI. HIPÓTESIS

El efecto del aumento de la expresión basal de la proteína Arc en el envejecimiento está regulando negativamente la transcripción *de novo* Arc en presencia de un estímulo, causando una disminución de la memoria de reconocimiento; la administración de iHDAC modulará la expresión positivamente *de novo* Arc en el envejecimiento favoreciendo la memoria de reconocimiento.

VII. OBJETIVOS

GENERALES

Estudiar la función de Arc en animales envejecidos, analizando los niveles de mRNA y proteína de Arc en el envejecimiento, determinando el efecto que tiene sobre una tarea conductual de memoria de reconocimiento, observando si la administración de iHDAC favorece la memoria de reconocimiento y determinar los efectos sobre la expresión de mRNA y la proteína de Arc.

PARTICULARES

1. Estudiar si existe una relación directa entre la cantidad de mRNA y proteína de Arc basal y el envejecimiento, comprobando mediante diferentes metodologías (Western blot, inmunofluorescencia y inmunohistoquímica de diaminobencidina).
2. Estudiar el efecto que tiene el envejecimiento en paradigmas conductuales como CAS y MWM
3. Estudiar el efecto que tiene la administración de iHDAC en paradigmas de memoria como CAS y sus efectos en los niveles de mRNA y proteína de Arc.

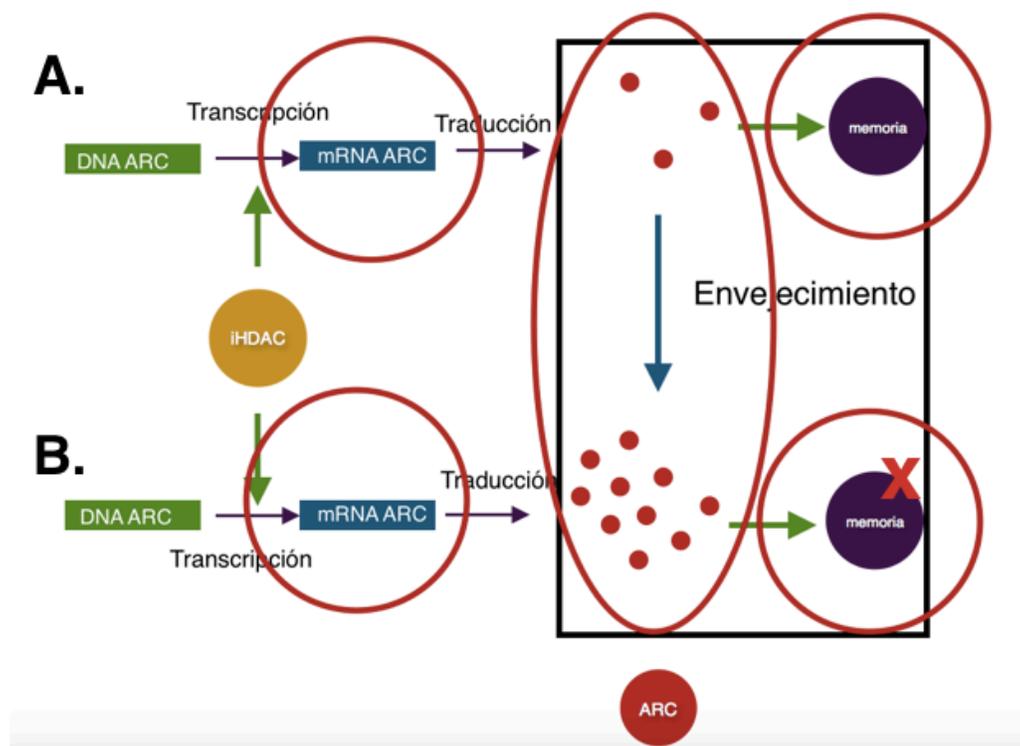


Figura 7. Diagrama de proyecto A. Se observa un proceso normal de transcripción, traducción de proteína de Arc observando un efecto positivo en la formación de la memoria. **B.** Efecto del envejecimiento en los niveles mRNA de Arc y proteína de Arc observando el efecto en negativo en la memoria de reconocimiento. Se realizará la administración de iHDAC en jóvenes y en el envejecimiento observando efecto en los niveles de mRNA de Arc, proteína de Arc y su efecto en la memoria de reconocimiento.

IX. METODOLOGÍA

Animales

Ratones no transgénicos B6129SF2/WT y C57BL/6J machos y hembras, de 2-3 meses, 10 meses y 16-17 meses de edad, en un clima controlado (vivarium) con ciclo de 12:12 h luz: oscuridad con comida y agua ad libitum. Todos los ratones usados en los experimento fueron tratados con base a lo descrito en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales del laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (FBR20-14)(ANEXO 1)

Preparación del tejido

Se indujo anestesia mediante pentobarbital sódico 6.3% a una concentración de 5 mL/kg (Pisabental, México), y se realizó fijación de proteínas mediante la perfusión con Solución Salina Isotónica SSI, posteriormente con solución fijadora de paraformaldehído 4% (Sigma-Aldrich, USA), se extrajo cerebro y se colocó en solución de paraformaldehído 4% durante 48 horas a 4 °C, posteriormente se colocó en sacarosa al 30% (Sigma-Aldrich, USA) durante 48 h a 4°C.

Corte coronarios .

Se realizaron cortes coronarios de 35 µm con criostato Leica CM-1950 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany), colocando los cortes seriados en 0.1 M Trizma base 0.1 M y NaCl 0.9% pH 7.4 (TBS 1X) en cajas de 24 pozos y se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

Preparación de fármacos

El MS-275 0.86 mM en DMSO 28% (Sigma-Aldrich, USA) en solución salina.

Inyecciones e implantación de cánulas guía para micro inyección

Se colocaron cánulas guía para micro-inyección de 0.8 mm guía con ayuda de estereotáxico en ratones B6129SF2/WT en diversas regiones cerebrales Corteza Motora con las siguientes coordenadas AP:+1.1mm ,ML:±1.0mm ,DV: -1.75mm, en Hipocampo CA3 AP:-2.2mm, ML:-2.2 mm±2.75 , DV: -2.5mm, y en Corteza Insular P:+1.1mm ,ML:±3.3 mm, DV: -3.7mm. Se indujo anestesia con Isoflurano (1.5-2.0%) y flujo constante de Oxígeno. Para administración se realizó mediante bomba de micro inyección a un flujo de 0.25 µL/min con uso de jeringa Hamilton (Hamilton Company, Suiza) y uso de agujas dentales (Badiject, Fracia), con ayuda de cánula guía de permitiendo la administración de 0.5 µL bilateral de MS-275 0.86 mM en DMSO 28% a una velocidad de 0.25 µL/min y 0.5 µL vehículo (SSI).

Inmunohistoquímica fluorescencia

Se seleccionaron cortes coronarios aproximadamente AP : +1.1 correspondiente a corteza motora y AP: -2.5 correspondientes a hipocampo, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 , se incubó con anticuerpo primario α -ARC (1:1000, Synaptic Systems, USA) en TBS 1X + Tritón 0.1% pH 7.4 (TBS-T 0.1%) y BSA 5% (Santa Cruz, USA) durante una noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente se lavó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se incubó anticuerpo secundario Rabbit IgG Cy3 (1:250, Gene Tex, USA) en TBS-T 0.1% pH 7.4 y BSA 5%, durante 1 h a temperatura ambiente, cubriendo muestra de la luz, y agitación constante, se lavó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y agregó DAPI al 0.3 μ M por 30 s. Se realizó montaje en laminillas VWR (Aventor, USA) en medio de montaje DAKO (Agilent Technologies, EUA).

Inmunohistoquímica DAB

Se seleccionaron cortes aproximadamente AP : +1.1 correspondiente a corteza motora y AP: -2.5 correspondientes a hipocampo, se inhibió peroxidasa con H₂O₂ 0.3% (Sigma-Aldrich, USA) incubando 30 minutos en reposo, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 , se incubó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y BSA 5% con anticuerpo primario α -ARC (1:1000, Synaptic Systems, USA) durante una noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente se lavó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se agregó anticuerpo secundario Biotinilado goat anti-rabbit (1:500, Vector Labs , USA) en TBS-T 0.1% + BSA 5%, durante 2 h a TA en agitación constante, inmediatamente se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4. Incubando con Solución AB (ABCkit, Vectastain, Vector laboratoriesInc) 1 h en agitación constante a TA. Posteriormente se lavó con TBS 1X pH 7.4, después se colocó por 5 minutos en Kit DAB Peroxidasa Substrato (Vector Laboratories, , Burlingame, U.S.A.), deteniendo reacción con agua, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4, montando en laminillas gelatinizadas, dejando secar durante 24 h. Se realizaron trenes de etanol al 70 %, 80% y 96 % durante 2 minutos, se dejó secar y se montó con medio Permount.

SDS-PAGE

Se obtuvieron diversas regiones cerebrales de ratones B6129SF2/WT mediante dislocación servical (Corteza Insular, Hipocampo CA3, Corteza Motora y Estriado), se realizó disección y se colocó en Buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% SDC y 0.1% Tritón e inhibidor de proteasas (Roche Applied Biosystems, USA). Colocando una cantidad igual al peso de tejido, posteriormente se sonificó mediante 4 pulsos, se centrifugó muestras a 1500 g durante 15 minutos y se almacenaron a -20°C. Para preparación de muestra se adicionó lo equivalente a 10 μ g de la proteína agregando cantidades iguales de solución Laemli 2X, Se realizó corrida en gel de poliacrilamida 12% con SDS 0.1 %, a 60 V durante 15 minutos con Buffer de

corrida (Tris-Glicina, SDS) pH 8.3, posteriormente se aumento a 110 V durante 90 minutos, se transfirió a membrana de PVDF mediante transferencia semi-húmeda durante 45 minutos 25 V y se almaceno en solución TBS-T 0.1% pH 7.4.

NATIVA-PAGE

Se obtuvo diversas regiones cerebrales de ratones WT mediante dislocación servical,(Corteza Insular, Hipocampo CA3, Corteza Motora y Estriado), se realizó disección y se colocó en Buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, e inhibidor de proteasas, Roche Applied Biosystems, USA). Colocando una cantidad igual al peso del tejido, se realizó sonicación de muestra (4 pulsos), almacenando muestra a -20°C. Para preparación de muestra se adicionó lo equivalente a 20 µg de proteína agregando cantidades iguales de buffer de carga (Ácido aminocaprónico 750mM, Bis-Tris 50 mM, Azul de Commassie G-250 5%). Se realizó corrida en gel de poliacrilamida 12% Bis-Tris, a 120 V durante 15 minutos con buffer de cátodo oscuro (Bis-Tris 50 mM, Tricina 50 mM y Azul de Commassie G-250 0.02%) y buffer de ánodo (Bis-Tris 50 mM, Tricina 50 mM), se cambió el buffer a buffer de cátodo claro(Bis-Tris 50 mM, Tricina 50 mM y Azul de Coomassie G-250 0.002%) y se corrió a 120 V durante 90 minutos, se transfirió a membrana de PVDF mediante transferencia semi-húmeda durante 45 minutos 25 V y se almaceno en solución TBS-T 0.1% pH 7.4.

INMUNOBLOT (SDS-PAGE, NATIVE-PAGE)

Se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 , se incubó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y BSA 5% con anticuerpo primario α -ARC (1:2000, Synaptic Systems, USA) durante una noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente se lavó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se agregó anticuerpo secundario HRP-Goat-Anti-rabbit IgG (1:5000, Invitrogen, USA) en TBS-T 0.1% + BSA 5%, durante 1 h a TA en agitación constante. Se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se reveló con Sustrato de Quimioluminiscencia HRP Immobilon Western (Milipore, USA).

Para control de carga, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se incubó anticuerpo primario Anti GAPDH rabbit (1:2000, Sigma Aldrich, USA) en TBS-T 0.1% + BSA 5% durante 2 h a TA en agitación constante, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se agregó anticuerpo secundario HRP-Goat-Anti-rabbit IgG (1:5000, Invitrogen, USA) en TBS-T 0.1% + BSA 5%, durante 1 h a TA en agitación constante. Se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se reveló con Sustrato de Quimioluminiscencia HRP Immobilon Western (Milipore, USA).

Condicionamiento Aversivo al Sabor CAS

Se realizó adecuación mediante privación de consumo de agua y acceso durante 20 min al día de consumo de agua, en donde se colocó a ratón en burbuja con 2 bebederos con agua durante 20 minutos. En el día 6 la adquisición mediante un

estimulo condicionado (sacarina 0.3%) el cual se presenta en un bebedero durante 20 minutos, al minuto 30 se presenta el estimulo incondicionado (LiCl 0.4 M, 7.5 mL/kg en SSI ,IP). El día de la prueba de Memoria a Largo Plazo MLP 24 horas después de la adquisición, se presentan 2 bebederos (agua y sacarina 0.3%) durante 20 minutos, posteriormente se realiza la extinción durante 3 días presentando 2 bebederos (agua y sacarina 0.3%) por 20 minutos.

*Durante todo el experimento el animal se encuentra privado de agua.

RT-PCR

Se extrajo muestra para mRNA de ratón viejo (15 meses) y joven (3 meses) mediante dislocación servical se disectó corteza insular y se extrajo mRNA mediante protocolo de TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) y se cuantificó RNA con nanodrop (Thermo Fisher, USA) ajustando a 500 ng de mRNA total para cada muestra, se realizó transcripción en reversa mediante kit SuperScript III First-Strand Synthesis (Thermo Fisher Scientific, USA). El PCR en tiempo real se realizó mediante el protocolo de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA) midiendo la expresión del gen Arc (Mm.491310, TaqMan, Thermo Fisher) y gen endógeno gadph (Mm99999915, TaqMan, Thermo Fisher).

Laberinto Acuático de Morris (MWM)

La arena del Laberinto Acuático de Morris consiste de un tanque circular de plástico de 110 cm de diámetro y 65 cm altura, lleno con agua a 22°C hasta 1/3 de la capacidad, colocando 2 claves espaciales, los ratones fueron entrenados durante cuatro días con 4 test por día, colocando al ratón en diferentes puntos aleatoriamente siendo diferente en cada día con plataforma oculta a 1 cm sumergida, cada test se coloca al ratón en un punto permitiendo el nado hasta que encuentre la plataforma o máximo 60 segundos, permitiendo explorar la plataforma durante 10 segundos cuando la encuentre o dirigiéndolo hacia ella cuando no lo haga, registrando el tiempo de latencia de llegada a la plataforma. El día de memoria a largo plazo, 48 horas después del ultimo test, se retira la plataforma y se permite al ratón el libre nado durante 60 segundos.

Microscopía

Microscopio confocal Olympus FV-1000 (Olympus, Tokyo, Japón) se tomaron imágenes 4 fotos por ratón en regiones de corteza insular, corteza motora, hipocampo CA3, amígdala, corteza insular con filtro para Cy3 en un aumento de 20x y 60x. microscopio de epi-fluorescencia Leica DM-1000 (Leica, USA) en regiones de Corteza Insular, Corteza Motora, Hipocampo CA3, (exposición 521 ms, ganancia 1.0, Gamma 1.3), con filtro Cy3 con aumento de 20x. Microscopio de campo claro, se tomaron imágenes 4 fotos por ratón en regiones de Corteza Insular, Corteza Motora,

Hipocampo CA3, y Giro dentado a un aumento de 20x.

Análisis de datos

Imágenes de inmunofluorescencia

Se cuantificó en ciego el %Área en diversos grupos de edad, realizando análisis estadístico mediante ANOVA con mediciones repetidas, seguido de análisis post-hoc test de Fisher usando GraphPad Prism version 7.00 Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA. El nivel de significancia de todas las pruebas fue de $p < 0.05$.

Imágenes de DAB

Se realizó análisis en ciego de imágenes tomadas por microscopía de campo claro de ratones de diferentes grupos de edad, mediante cuantificación de conteo de partículas con ImageJ 1.49v (Threshold, Size: 0.08-0.25, circularity= 0.05-1.0). Posteriormente se realizó análisis con GraphPad Prism versión 7.00 de t-student no pareada $p < 0.05$.

Western blot

Se realizó análisis de bandas con ImageJ 1.49v, observando la relación entre Arc/GAPDH, posteriormente se realizó análisis estadístico GraphPad Prism versión 7.00 t-student no pareada $p < 0.05$.

Análisis de curva CAS

Se realizó análisis estadístico de MLP y extinción mediante análisis estadístico GraphPad Prism versión 7.00 t-student no pareada $p < .05$., para comparación de perfiles se realizó análisis de Fisher.

Software:

Image Studio Analysis Software, Versión 4.0, LI-COR UK

Leica Application Suite (LAS), Versión 4.5 [Build:518], Leica Microsystems (Switzerland).

ImageJ 1.49v, Wayne Raband, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>, Java 1.6.0_65 (64-bit)

GraphPad Prism versión 7.00 Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA.

XI. RESULTADOS

I. Efecto del envejecimiento en la acumulación de la proteína Arc

La proteína Arc participa en la formación de la memoria y en la inducción de la LTP, sin embargo en el envejecimiento se observa un aumento en la expresión de la proteína Arc, para comprobar se realizó la medición de la expresión basal de la proteína Arc mediante diversas metodologías en estructuras asociadas a la memoria.

Análisis mediante inmunohistoquímica de fluorescencia

Se realizó análisis de diversos grupos de edad en ratones B6129SF2/WT (WT) de 2, 10 y 17 meses mediante inmunohistoquímica α -Arc (1:1000, Synaptic System) y se analizó tejidos seriados en microscopio de epifluorescencia, observando un aumento gradual en diversas estructuras relacionadas a procesos de memoria (Figura 8). El análisis de proteína basal se realizó mediante la cuantificación de células por porcentaje de área en corteza insular (ANOVA, $F_{(2,10)}=159.2$, $p<0.0001$) (Figura 8A), corteza motora (ANOVA, $F_{(2,10)}=43.6$, $p<0.0001$) (Figura 8B), hipocampo CA3 (ANOVA, $F_{(2,10)}=77.8$, $p<0.0001$) (Figura 9C), amígdala (ANOVA, $F_{(2,10)}=38.6$, $p<0.0001$) (Figura 8D), observando una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de edad en todas las estructuras cerebrales analizadas (Figura 8). Para determinar si este aumento es directamente proporcional a la edad del ratón y no un proceso que ocurre repentinamente en el envejecimiento se realizó un análisis estadístico comparando el grupo de ratones jóvenes (2 meses) y ratones viejos (17 meses) con los ratones adultos (10 meses). Al realizar el análisis estadístico con la prueba de múltiple comparación de Bonferroni, en CI: 10 meses vs 2 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=10.77$, $p<0.0001$), 10 meses vs 17 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=6.419$, $p=0.0002$) (Figura 8A), en CM: 10 meses vs 2 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=5.652$, $p=0.0004$), 10 meses vs 17 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=3.338$, $p=0.015$) (Figura 8B), Amígdala: 10 meses vs 2 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=4.053$, $p=0.0046$), 10 meses vs 17 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=4.488$, $p=0.0023$) (Figura 8C), Hipocampo CA3: 10 meses vs 2 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=9.191$, $p<0.0001$), 10 meses vs 17 meses (Bonferroni, $t_{(1,10)}=2.322$, $p=0.0853$) (Figura 8D). Con base en estos resultados hay evidencia estadística para determinar que el aumento es gradual al paso del tiempo y no un proceso repentino presente en el envejecimiento. El aumento gradual en la cantidad de proteína Arc basal es proporcional en diversas estructuras relacionadas con procesos de memoria como corteza insular, corteza motora, amígdala e hipocampo CA3 (Figura 8).

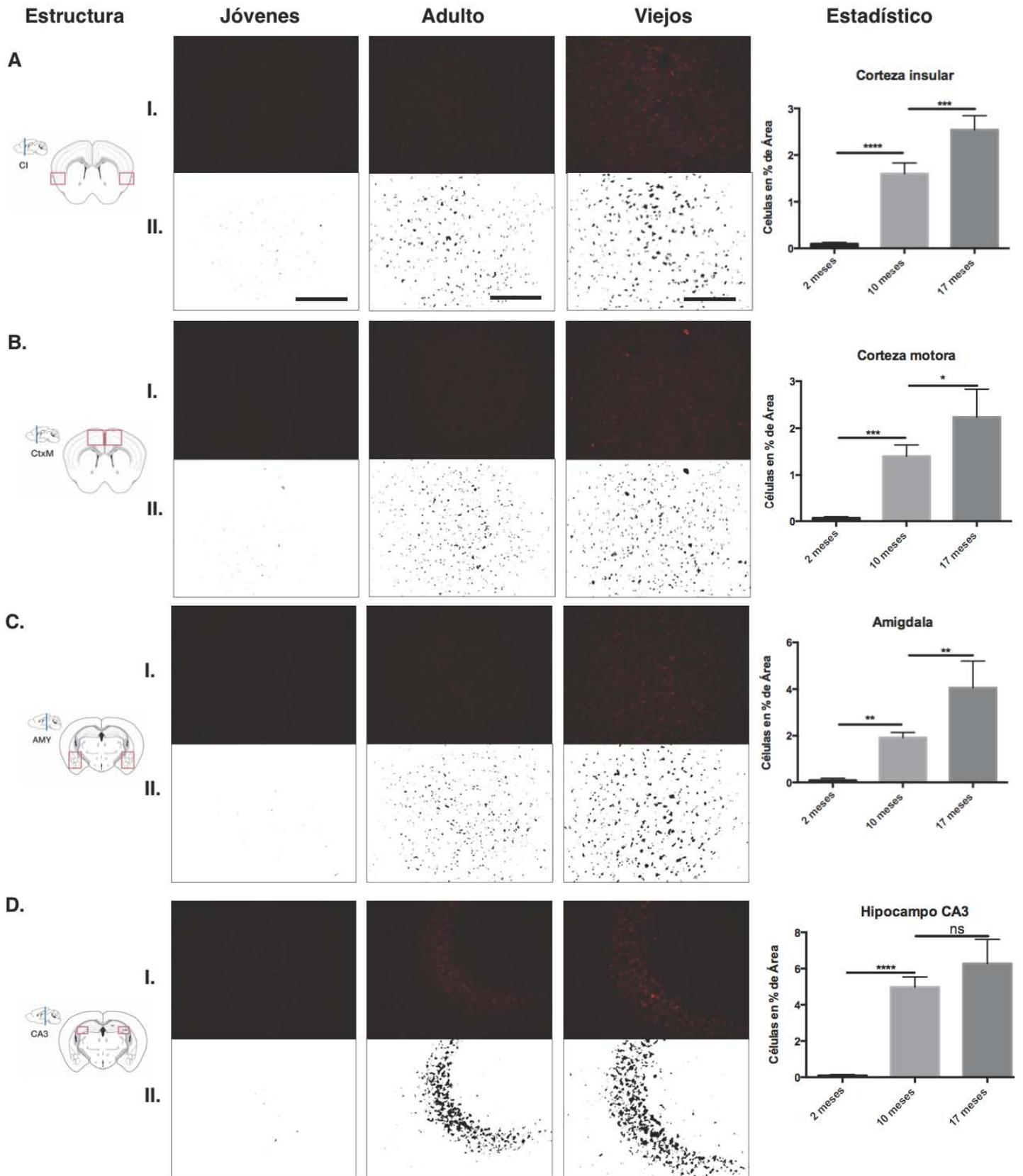


Figura 8. Expresión basal de la proteína. CONTINUA

Figura 8. Expresión basal de la proteína Arc, análisis inmunohistoquímico (α -Arc, 1:1000) de expresión de la proteína Arc en diversas estructuras cerebrales relacionadas a procesos de memoria en ratones B6129SF2/WT , A. Corteza insular (CI) B. Corteza Motora (CtxM) C. Hipocampo CA3 (CA3), D. Amígdala I. imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia II. Imágenes representativas de mascaradas realizadas mediante Image J, en ratones jóvenes (2-3 meses), adultos (10 meses) y ratones viejos (16-17 meses). Análisis estadístico muestra los datos de la Media de % Área \pm DE, n=4 (viejos y jóvenes) n=5 (adultos), múltiple comparación por test Bonferroni, *: p <0.05, **: p <0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001, ns: no significativo. Barra de escala 100 μ m (20x).

Análisis mediante Western blot

Para obtener un resultado más robusto se realizó tratamiento de muestras cerebrales de ratones B6129SF2/WT (WT) para corrimiento en gel de poliacrilamida y posteriormente western blot, en ratones de 17 meses y 3 meses de edad, descartando así cualquier artificio provocado por la técnica de inmunofluorescencia o por la autofluorescencia de otras proteínas. Se observa un aumento significativo en la cantidad de la proteína Arc en los grupos de 17 meses comparado con los ratones de 3 meses (Figura 9). El análisis estadístico del western blot se observa un aumento significativo solo en la corteza insular ($t_{(1,4)}=4.711$, $p=0.0092$)(Figura 9A) y en el hipocampo ($t_{(1,4)}=2.984$, $p=0.040$) (Figura 9C), sin embargo no se observa significancia en la corteza motora ($t_{(1,4)}=2.228$, $p=0.0898$)(Figura 9B). Con base a los datos estadísticos, tenemos evidencia estadísticamente significativa para decir que hay un aumento en la cantidad de proteína en la corteza insular ($p<0.01$) y el hipocampo ($p<0.05$), sin embargo en la corteza motora solo se observa una tendencia, pero no hay evidencia estadística para determinar si hay un aumento en el envejecimiento. Estos resultados confirman el aumento en la expresión de la proteína Arc basal en estructuras como corteza insular y el hipocampo.

Con base a estos resultados el cual correlaciona con las otras metodologías, hay un aumento estadísticamente significativo en la expresión de Arc basal en estructuras cerebrales como corteza insular e hipocampo CA3, sin embargo el resultado podría estar asociado a la sepa del ratón, para descartar esta posibilidad se realizó análisis por inmunohistoquímica de fluorescencia y por inmunohistoquímica de diaminobencidina (DAB) en ratones C57BL/6J para comprobar sí el resultado observado en ratones B6129SF2/WT es consistente en la sepa C57BL/6J.

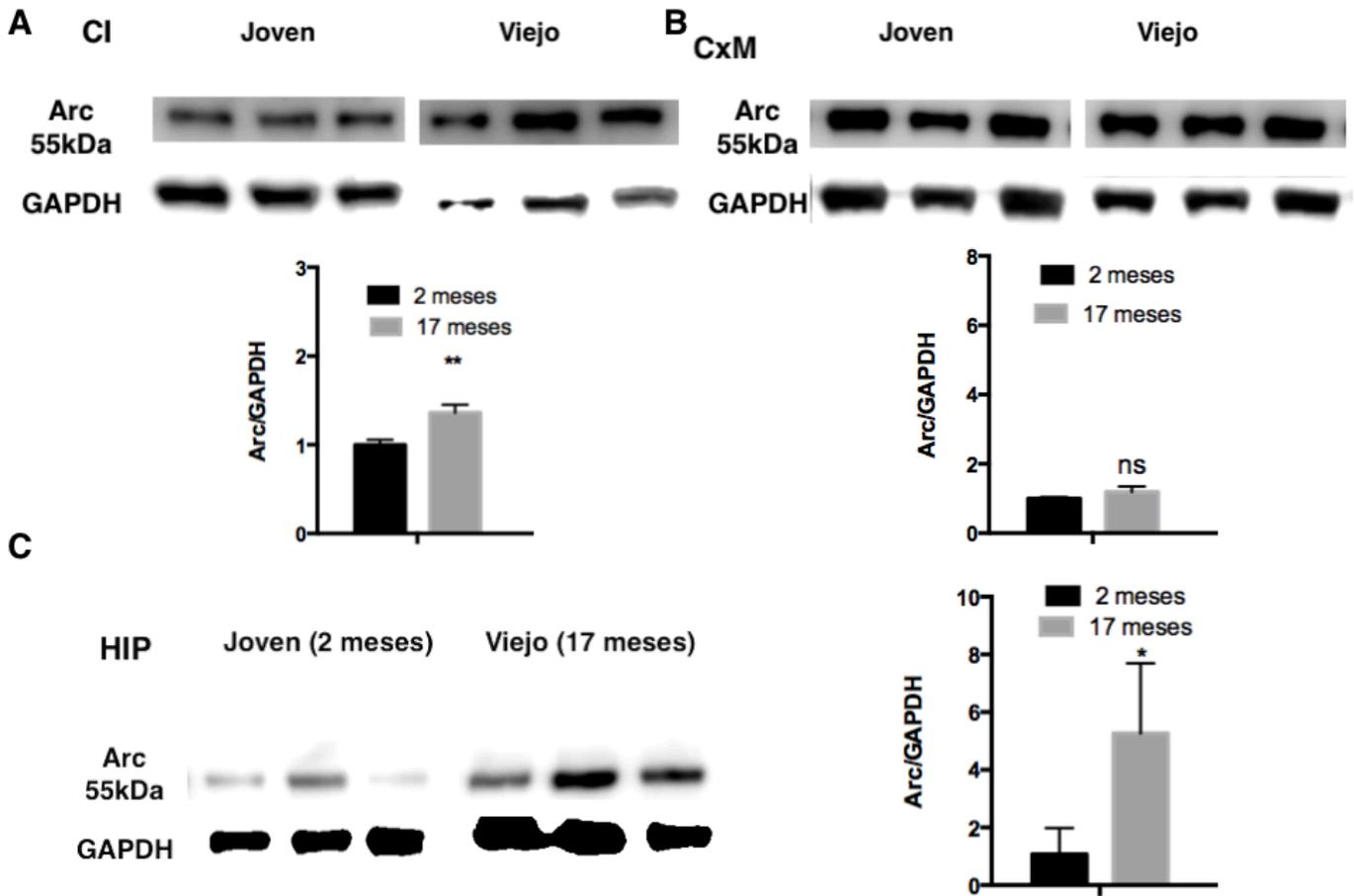


Figura 9. Expresión de la Proteína Arc por western blot, expresión de la proteína Arc en diversas estructuras cerebrales en ratones B6129SF2/WT A. Corteza insular(CI) B. Corteza Motora (CxM), C. Hipocampo (Hip), Análisis mediante SDS-PAGE y western blot, en ratones jóvenes (2-3 meses) y ratones viejos (16-17 meses). Imágenes representativa de bandeo correspondiente a Arc 55 kDa y gen endógeno GAPDH control de carga. Análisis estadístico muestra los datos de la media de Arc:GAPDH \pm DE, n=4 por grupo, análisis estadístico t-no pareada, *:p<0.05, **:p<0.01, ns: no significativo.

Análisis mediante de inmunohistoquímica por fluorescencia en ratones C57BL/6J

Se realizó análisis en ratones C57BL/6J de 2 y 17 meses mediante inmunohistoquímica α -Arc (1:1000) y análisis de tejidos seriados en microscopio de epifluorescencia. Se observa un aumento significativo en la cantidad basal de la proteína Arc en ratones de 17 meses comparado con los de 2 meses, mediante la cuantificación celular de % área, en corteza insular ($t_{(1,4)}=3.916$, $p=0.0173$) (Figura 10.1 AI), corteza motora ($t_{(1,4)}=2.847$, $p=0.0465$) (Figura 10.1 BI), hipocampo CA3 ($t_{(1,4)}=6.424$, $p=0.003$)(Figura 10.2 BI), amígdala ($t_{(1,4)}=5.396$, $p=0.0057$)(Figura 10.2 AI), observando una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de edad en

todas las estructuras cerebrales analizadas (Figura 10). Lo cual confirma lo observado en los ratones B6129SF2/WT.

Análisis mediante Inmunohistoquímica con diaminobencidina en ratones C57BL/6J

Se observa por inmunohistoquímica con diaminobencidina en ratones C57BL/6J un aumento significativo en el grupo ratones de 16-17 meses comparado con los ratones de 2-3 meses de edad, mediante la cuantificación por conteo de células, en corteza insular ($t_{(1,4)}=6.627$, $p=0.027$) (Figura 10.1 AIII), corteza motora ($t_{(1,4)}=5.289$, $p=0.0057$) (Figura 11.1 BIII), amígdala ($t_{(1,4)}=8.077$, $p=0.0013$) (Figura 10.2 AIII), hipocampo CA3 ($t_{(1,4)}=5.871$, $p=0.0042$) (Figura 10.2 BIII). Los resultados confirman que hay un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de Arc basal mediante inmunohistoquímica con diaminobencidina.

Con base a los resultados obtenidos se tiene un resultado más robusto y estadísticamente significativo, donde se presenta un aumento gradual en la cantidad de proteína de Arc basal en diversas estructuras como corteza insular, corteza motora, hipocampo CA3 y amígdala, este resultado es consistente mediante inmunohistoquímica de fluorescencia, inmunohistoquímica por diaminobencidina y mediante por western blot, esto en dos cepas de ratón C57BL/6J y B6129SF2/WT.

Análisis de proteína basal de Arc en el núcleo

Mediante una distinción morfológica por inmunohistoquímica con diaminobencidina y fluorescencia se observa la presencia de la proteína Arc en el núcleo y citoplasma en las estructuras analizadas: corteza insular, corteza motora, amígdala, hipocampo CA3 y giro dentado en la figura 11 se muestra imágenes representativas de giro dentado y amígdala. Mediante un análisis morfológico se realizó comparación entre ratones jóvenes (2-3 meses) y viejos (17 meses), en la cantidad de neuronas con proteína de Arc nuclear y Arc citoplasmático, observando una diferencia significativa solo en la cantidad de proteínas de Arc nuclear mediante la cuantificación de número de células, en giro dentado ($t_{(1,4)}=6.741$, $p=0.0066$) (Figura 11B), corteza insular ($t_{(1,4)}=7.487$, $p=0.0017$) (Figura 11C), corteza motora ($t_{(1,4)}=3.333$, $p=0.029$) (Figura 11D), hipocampo CA3 ($t_{(1,4)}=6.368$, $p=0.0031$) (Figura 11D), amígdala ($t_{(1,4)}=15.199$, $p=0.00011$) (Figura 11.2 AI), sin embargo la proteína Arc citoplasmática no muestra diferencia entre los ratones viejos y jóvenes, solo en hipocampo CA3 ($t_{(1,4)}=4.985$, $p=0.0075$) (Figura 11D).

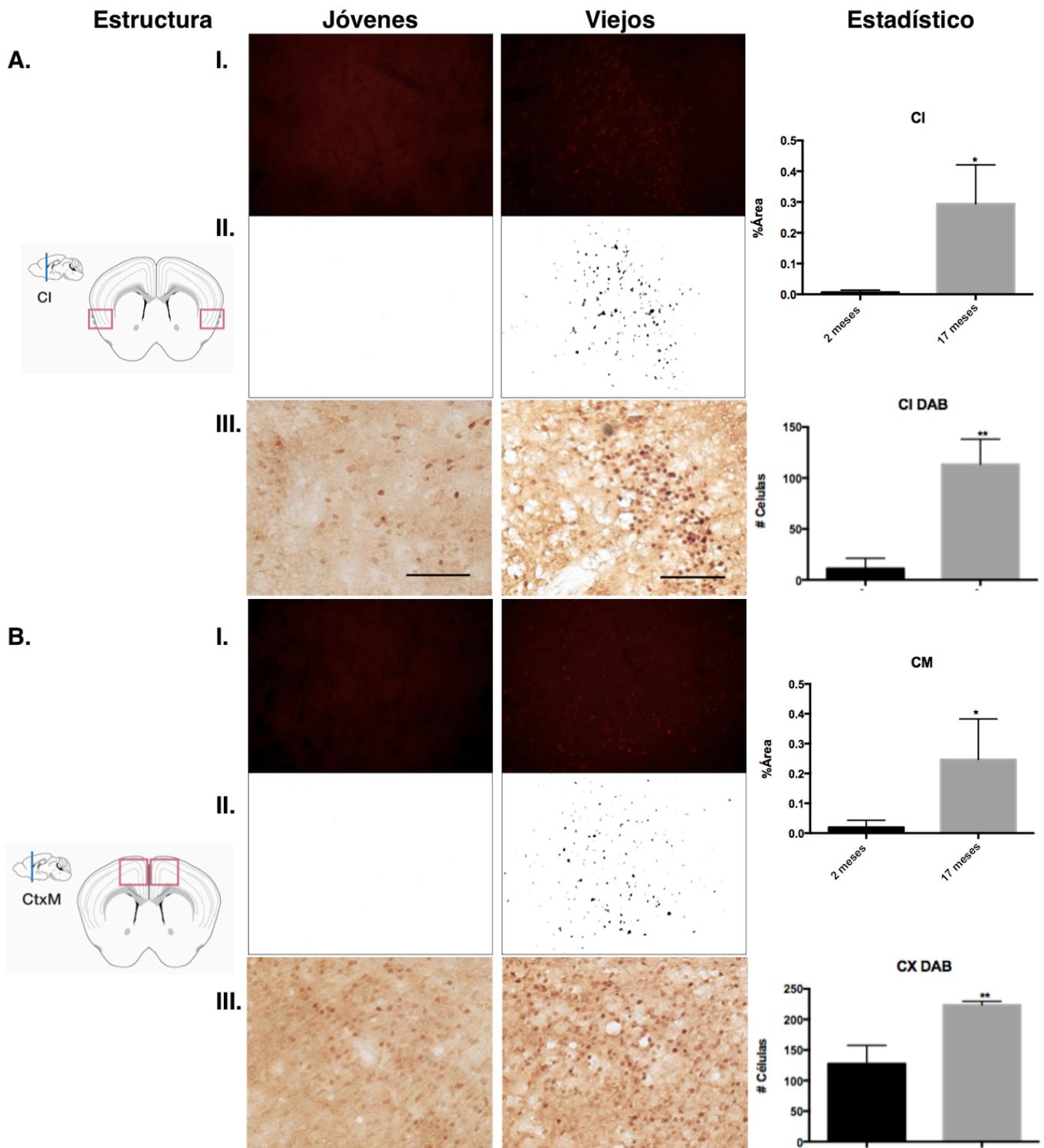


Figura 10.1. Expresión basal de la Proteína Arc en ratones C57BL/6, análisis inmunohistoquímico (α -Arc, 1:1000) de la expresión de la proteína Arc en diversas estructuras cerebrales relacionadas a procesos de memoria en ratones C57BL/6J , A. Corteza insular (CI) B. Corteza Motora (CtxM) I. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de fluorescencia observadas por microscopía de epifluorescencia II. Imágenes representativas de mascarar realizadas mediante Image J, III. Imágenes representativa de inmunohistoquímica con DAB, en ratones jóvenes 2-3 meses y ratones viejos 16-17 meses. Análisis estadístico I,II muestra los datos de la Media de % Área \pm DE, n=4, III. Muestra datos de Numero de células \pm DE, n=4, , estadística t-no pareada, *: p < 0.05, **: p < 0.01. Barra de escala 100 μ m (20x)

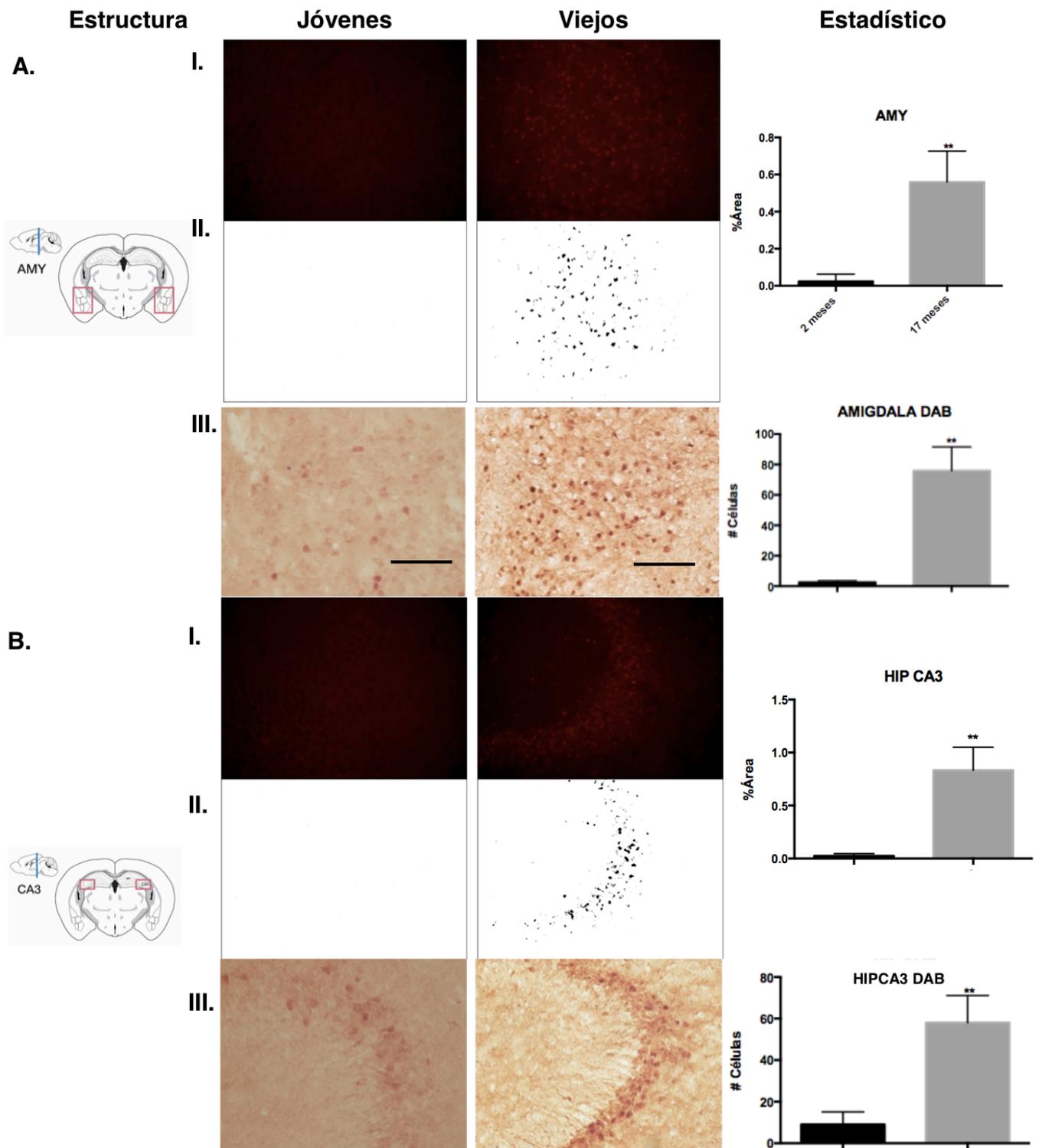


Figura 10.2. Expresión basal de la Proteína Arc en ratones C57BL/6, análisis inmunohistoquímico (α -Arc, 1:1000) de expresión de proteína Arc en diversas estructuras cerebrales relacionadas a procesos de memoria en ratones C57BL/6J, A. Amígdala (AMY) B. Hipocampo CA3 (CA3), I. imágenes representativas de inmunohistoquímica de fluorescencia observadas por microscopía de epifluorescencia II. Imágenes representativas de mascarar realizadas mediante Image J, III. Imágenes representativa de inmunohistoquímica con DAB, en ratones jóvenes 2-3 meses y ratones viejos 16-17 meses. Análisis estadístico I,II muestra los datos de la Media de % Área \pm DE, n=4, III. Muestra datos de Numero de células \pm DE, n=4, t-no pareada, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. Barra de escala 100 μ m (20x).

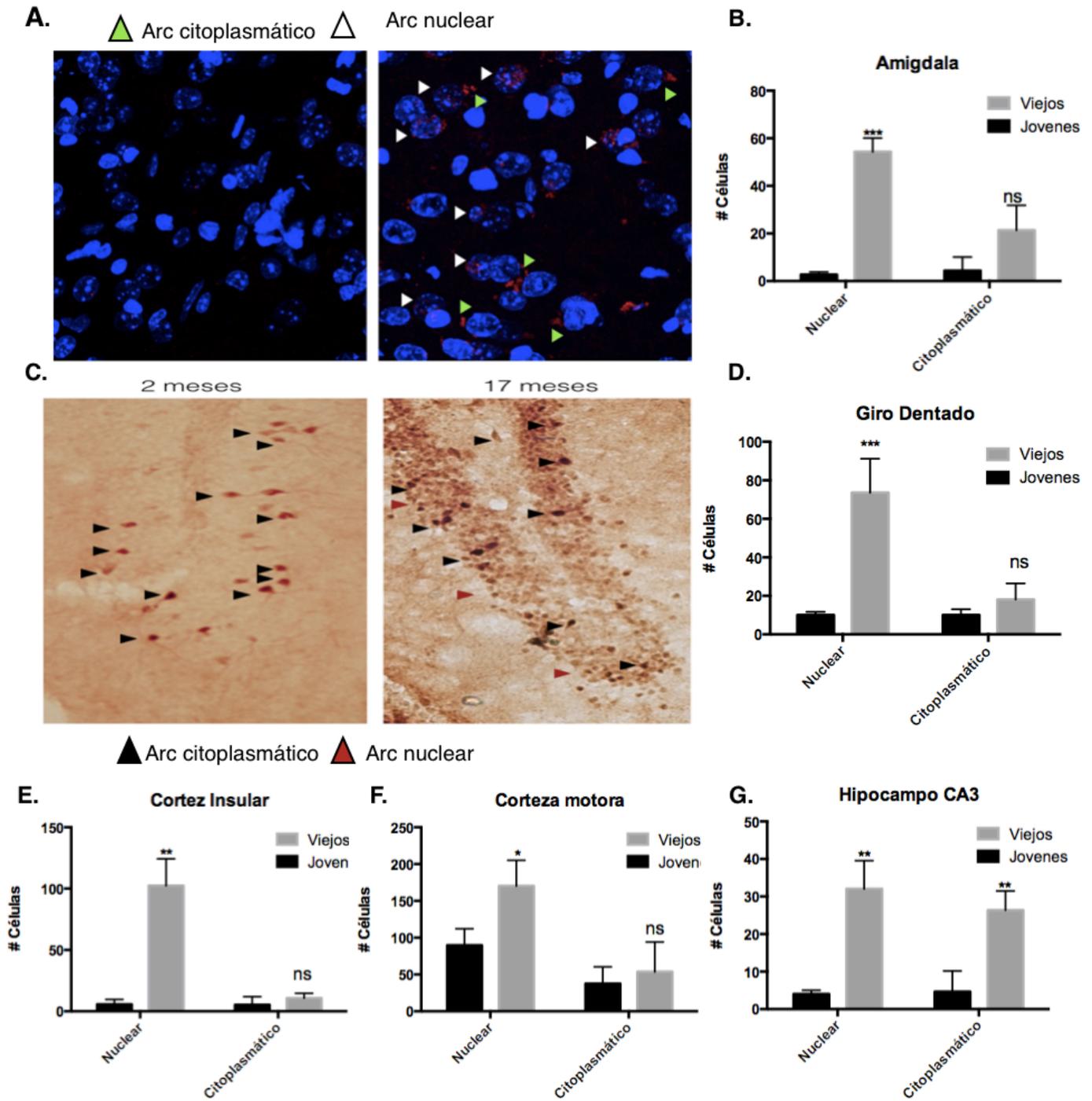


Figura 11. Expresión de proteína Arc en el núcleo y citoplasma, expresión de la proteína Arc en ratones C57BL/6J de 2 meses y 17 meses mediante análisis morfológico se observa una diferencia entre Arc localizado en el citoplasma y Arc nuclear. A. Imagen representativa por inmunohistoquímica de fluorescencia α -Arc (1:1000), Arc (rojo), DAPI (azul), Arc citoplasma (Flecha verde) y Arc nuclear (Flecha blanca) en amígdala. C. Imagen representativa de inmunohistoquímica DAB α -Arc (1:1000) Arc citoplasma (Flecha negra) y Arc nuclear (Flecha roja) en Giro dentado. B,D,E-F. Análisis estadístico en diversas estructuras cerebrales, B. Amígdala C. Giro Dentado, E. Corteza insular F. Corteza Motora G. Hipocampo CA3 (CA3) donde se observa una diferencia en el número de células que presentan Arc nuclear y citoplasmático en ratones viejos y jóvenes mostrando los datos de Número de Células \pm DE, n=3(viejos y jóvenes), comparación de grupos mediante t-no pareada, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001, ns: no significativo.

Con base en la diferenciación morfológica se obtiene que hay un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de proteína de Arc basal nuclear en ratones de 16-17 meses comparada con los ratones de 2 meses, siendo este un probable indicador del declive cognitivo en el envejecimiento, lo cual es congruente con lo observado por Korb y colaboradores donde el Arc nuclear regula la internalización de receptores AMPA y la transcripción de la subunidad GluA1, disminuyendo la plasticidad sináptica (Korb, Wilkinson, Delgado, Lovero, & Finkbeiner, 2013). Con este resultado se tiene una evidencia mas consistente, donde hay aumento gradual de la cantidad de la proteína Arc basal en diversas estructuras asociadas a la memoria.

Efecto del envejecimiento en la cantidad de mARN de Arc

Un aumento en la cantidad de la proteína basal de Arc a causa del envejecimiento podría estar regulando la cantidad de mARN basal de Arc, se realizó un PCR en tiempo real (RT-PCR) para determinar la cantidad de mARN de Arc en ratones jóvenes B6129SF2/WT (2 meses) y ratones viejos B6129SF2/WT (15-17 meses) en estado basal, al realizar el análisis estadístico y la normalización con el gen endógeno GAPDH y mediante el tratamiento de datos por cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), se observa una disminución estadísticamente significativa en ratones viejos comparado con ratones jóvenes en corteza insular ($t_{(1,5)}=6.91$, $p=0.001$)(Figura 12A).

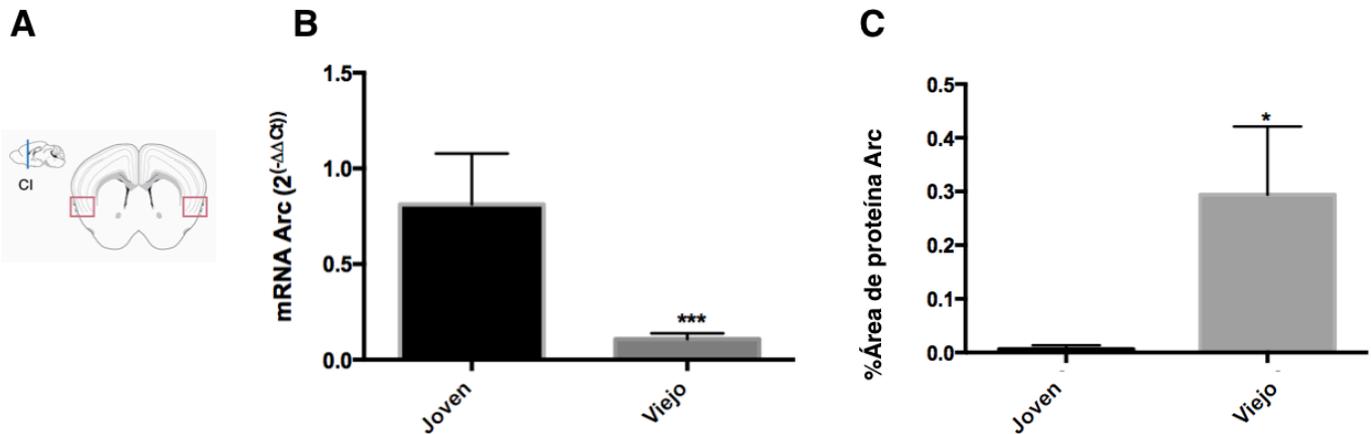


Figura 12. Cantidad de mARN de Arc en el envejecimiento en Corteza Insular, A. Diagrama de localización de Corteza insular B. Nivel de transcritpo en ratones B6129SF2/WT en ratones de 17 meses comparado con ratones de 2 meses mediante PCR-RT en Corteza insular, se observa una diferencia significativa entre la cantidad de transcritpo de Arc de viejos comparado con los jóvenes mediante cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), se realizo normalización con gen endógeno GAPDH, viejos n=4 y jóvenes n=2 comparación de grupos mediante t-no pareada, ***: $p < 0.001$. C. Expresión de la proteína Arc en Corteza insular en ratones C57BL/6J, Análisis estadístico muestra los datos de la Media de % Área \pm DE, n=4 *: $p < 0.05$.

El aumento en la cantidad de la proteína basal de Arc en el envejecimiento (Figura 12B) podría estar regulando la reducción en el mRNA de Arc en el envejecimiento (Figura 12A) y por lo tanto una disminución en la cantidad de novo Arc, teniendo un probable efecto en la memoria y en la plasticidad neuronal ocasionando un deterioro cognitivo el cual es común en el envejecimiento.

Efecto del envejecimiento en actividad conductual

Para observar el efecto que tiene el envejecimiento sobre la actividad conductual se realizó la evaluación de paradigmas que permiten evaluar diversos tipos de memoria, la memoria aversiva y la memoria espacial. Para la evaluación de la memoria aversiva se realizó el protocolo de condicionamiento aversivo al sabor y para evaluar una memoria de tipo espacial se realizó el laberinto acuático de Morris.

Efecto del envejecimiento en el Condicionamiento Aversivo al Sabor

Se realizó el protocolo de CAS, mediante una etapa de adecuación con consumo restringido de agua por 20 minutos al día durante 5 días a ratones B6129SF2/WT de 2 meses y 15 meses, posteriormente el día de la adquisición de la memoria se presentó sacarina (0.3%) durante 20 min, después de 10 minutos finalizado el consumo se administró vía intraperitoneal LiCl (0.4 M, 7.5 mL/Kg), al día siguiente se realizó la prueba de MLP, donde se colocó un bebedero con agua y otro con sacarina 0.3% durante 20 minutos evaluando el consumo de sacarina relacionado con la fuerza de la memoria aversiva consolidada el día de la adquisición. Al realizar el análisis de la prueba de memoria largo plazo no presenta una diferencia significativa entre ratones jóvenes y viejos ($t_{(15)}=1.54$, $p=0.151$), sin embargo se observa una tendencia en la disminución del consumo de sacarina en los ratones jóvenes, siendo mayor la aversión al sabor en los ratones jóvenes comparado con los ratones viejos (Figura 13).

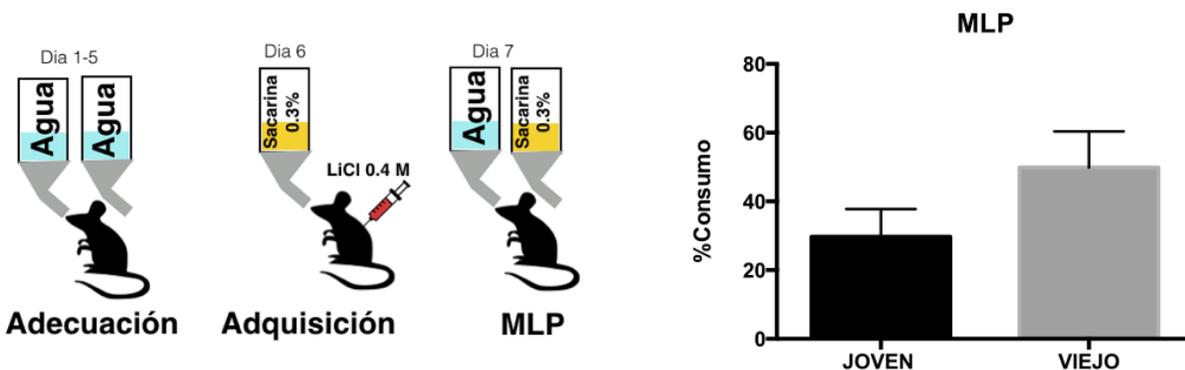


Figura 13. Condicionamiento Aversivo al Sabor A. Protocolo de CAS, adecuación durante 5 días, con acceso a agua por 20 minutos al día, en el día 6 Adquisición se colocó durante 20 minutos un bebedero de Sacarina al 0.3%, después de 10 minutos se administró LiCl intraperitoneal (0.4 M, 7.5 mL/Kg), la Memoria a Largo Plazo fue realizada en el día 7 colocando bebederos con H₂O y sacarina 0.3% durante 20 minutos, B. Consumo de sacarina en % ± DE en MLP en ratones jóvenes 2 meses (n=6) y viejos 15 meses (n=6).

Efecto del envejecimiento en memoria espacial

Para determinar si el envejecimiento tiene efecto sobre otro tipo de memoria, además de la memoria de reconocimiento por CAS, se realizó el laberinto acuático de Morris (MWM) observando el efecto que tiene el envejecimiento en una tarea espacial. Se realizó protocolo, mediante 5 días de entrenamiento con 4 pruebas por día para asegurar que se consolidara la información de la localización de la plataforma en la arena con agua (Figura 14.A-B) en ratones adultos (6 meses) y viejos (14 meses) asegurando que ambos grupos presentaran el mismo grado de aprendizaje en el último entrenamiento (Figura 14.C), sin embargo mediante un análisis de los tiempos de latencia a la plataforma del promedio de los cuatro test por día se obtiene que hay una diferencia significativa en el tiempo de latencia de llegada a la plataforma en el entrenamiento 3 ($t_{(1,0)}=3.437$, $p=0.0264$), observando que hay un aprendizaje más lento en los ratones viejos comparado con los adultos (Figura 14.C). En el día 6 se realizó la prueba de MLP retirando la plataforma y permitiendo nadar al ratón durante 60 segundos, al realizar el análisis estadístico del efecto sobre la MLP después del última prueba se observó una diferencia significativa entre el grupo de adultos (6 meses) y viejos (14 meses) en el número de cruces a la plataforma ($t_{(1,0)}=7.341$, $p<0.0001$) (Figura 14.D) y en el porcentaje de permanencia en cuadrante de la plataforma ($t_{(1,0)}=4.229$, $p=0.0022$) (Figura 14.E), como control de prueba se realizó el análisis de la distancia total de nado ($t_{(1,0)}=0.1756$, $p=0.8645$, no significativo) (Figura 14.F) y velocidad de nado ($t_{(1,0)}=0.2421$, $p=0.8142$, no significativo) (Figura 14.G) en los cuales no se observa diferencia significativa entre los grupos indicando que el efecto observado no se debe a una deficiencia física, sino a la capacidad en la memoria espacial. Con base a estos resultados se tiene una evidencia estadísticamente significativa donde el envejecimiento tiene efecto negativos en la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, siendo una probable causa la acumulación en la proteína Arc en Hipocampo como se observa con anterioridad en el presente trabajo.

En conclusión con estos paradigmas podemos confirmar que la capacidad de memoria tanto gustativa aversiva y una memoria de tipo espacial están afectadas en el envejecimiento, siendo posible utilizar estos paradigmas para evaluar el efecto del aumento en la cantidad de la proteína Arc observado en el envejecimiento. Pudiendo dilucidar el efecto que tiene este aumento en la proteína basal de Arc en la capacidad cognitiva.

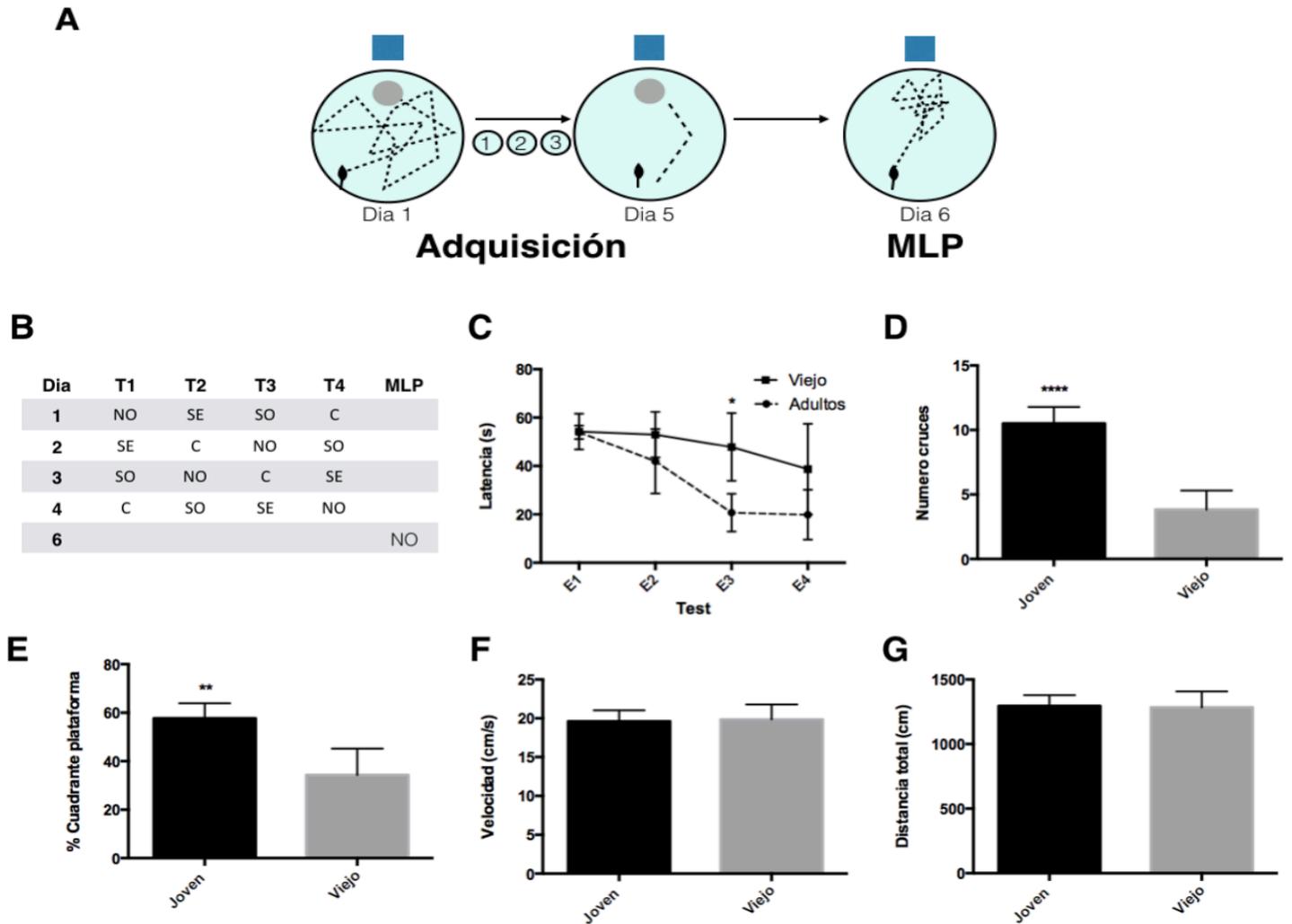


Figura 14. Efecto del envejecimiento en la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. A. Protocolo de Laberinto Acuático de Morris, se realizaron cuatro días de entrenamiento, en cada día se realizaron 4 test colocando al ratón en un cuadrante diferente en cada test con la plataforma sumergida 1 cm dejando un descanso entre cada test de 1 minuto, el día de la Memoria Largo Plazo se retiro la plataforma y se colocó a ratón en el cuadrante opuesto a plataforma y se permitió nadar por 1 minuto. B. Tabla de cuadrantes de inicio en cada día en entrenamiento. C. Tiempo de Latencia (TL) de llegada a plataforma en cada día, datos muestran promedio de latencia de cada test $TL \pm DE$, $n=4$ (jóvenes), $n=6$ (viejos), D-G. Análisis estadístico de MLP, D. Numero de cruces a sitio de plataforma $\pm DE$, E. Porcentaje de permanencia en cuadrante donde se encontraba la plataforma $\pm DE$, F. Promedio de Velocidad de nadar $\pm DE$ G. Distancia total recorrida $\pm DE$, $n=4$ (jóvenes), $n=6$ (viejos), comparación por t-no pareada *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

Expresión de la proteína Arc debido al Condicionamiento Aversivo al Sabor

Para demostrar el efecto conductual de CAS sobre la expresión de la proteína Arc, se realizó el protocolo de CAS en ratones B6129SF2/WT de 5 meses con base en lo reportado por Bures (Bures, Jan et al., 1998), y previamente descrito, el día MLP se realizó el sacrificio 1.5 h después del inicio de la prueba de un grupo de ratones para observar la expresión de Arc por efecto de memoria a largo plazo en CAS, otro grupo continuo con la prueba, donde los días posteriores se realizó la extinción del aprendizaje, colocando 2 bebederos uno con agua y otro con sacarina (0.3%) durante 20 minutos por 3 días, 1.5 horas después de la última extinción se realizó el sacrificio (Rao et al., 2006)(Figura 15). Es posible observar un comportamiento normal en la prueba de Condicionamiento Aversivo al Sabor, observando una disminución del consumo en el día de la MLP debido a la aversión al sabor por efecto de LiCl, observando una extinción de la aversión en cada día de extinción, el cual es reflejado en el aumento de consumo de sacarina (Figura 15.B).

Para comprobar el efecto que tiene la memoria aversiva en la expresión de Arc en la Memoria a Largo Plazo, y en la extinción de la memoria por CAS, se realizó inmunohistoquímica de fluorescencia α -Arc (1:1000) en ratones B6129SF2/WT midiendo la expresión de Arc en tejidos seriados obtenidos de ratones sacrificados en la MLP y en la tercera extinción. Realizando un análisis de los tejidos seriados por microscopio de epifluorescencia se observa un aumento significativo en la expresión de la proteína Arc en ratones B6129SF2/WT de 5-6 meses comparado con grupo control el cual no presentó conducta de CAS en la corteza insular y la amígdala, estructuras asociadas a la formación de la memoria aversiva gustativa, mediante la cuantificación celular de %área en corteza insular: MLP ($t_{(1,8)}=8.116$, $p<0.0001$), Extinción ($t_{(1,4)}=9.983$, $p<0.0001$) (Figura 15 C), Amígdala: MLP ($t_{(1,8)}=2.775$, $p=0.0241$), Extinción ($t_{(1,8)}=3.981$, $p=0.0081$) (Figura 15 D), con base en el análisis estadístico hay evidencia estadística donde la MLP y la extinción por CAS favorecen la expresión de Arc en corteza insular y amígdala estructuras implicadas en la memoria aversiva por CAS esto comparado con un grupo control que no presenta conducta. Sin embargo no hay diferencia significativa en la expresión de la proteína Arc en la MLP comparado con Extinción. Con este resultado aseguramos que el paradigma de CAS favorece la expresión de la proteína Arc, pudiendo ser utilizado para obtener una relación entre la acumulación de proteína basal en el envejecimiento y efecto cognitivo en un modelo de ratón.

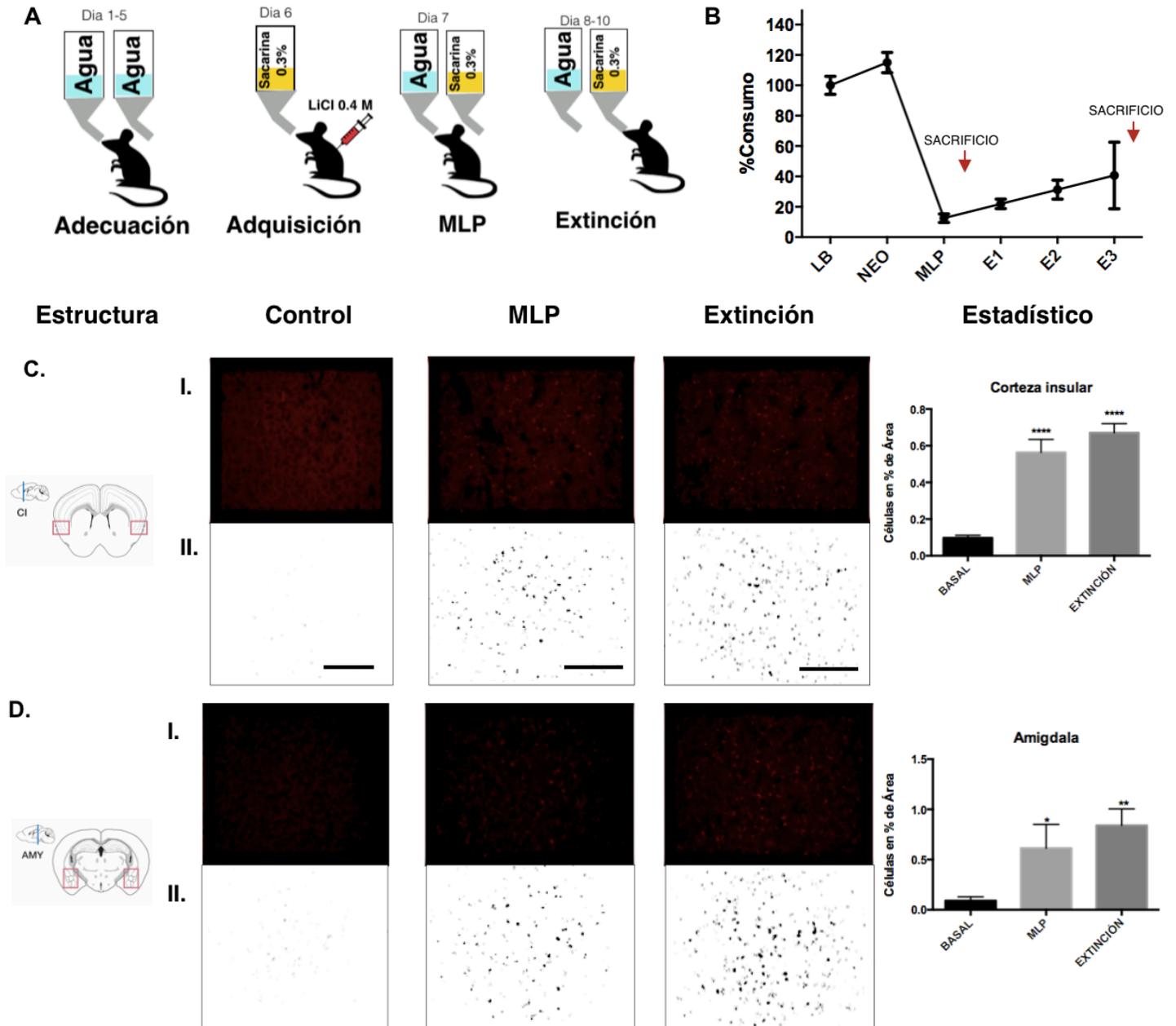


Figura 15. Expresión de Arc por efecto de Condicionamiento Aversivo al Sabor A. Protocolo de CAS, adecuación durante 5 días de condicionamiento con acceso a 20 minutos de agua al día, el día 6 de adquisición se colocó durante 20 minutos sacarina al 0.3% después de 10 minutos se administró LiCl intraperitoneal (0.4 M, 7.5 mL/Kg), el día 7 se evaluó la MLP colocando bebederos con H₂O y sacarina 0.3% durante 20 minutos, los días 8-10 se realizó la extinción colocando bebederos con agua y sacarina 0.3% durante 20 minutos B Curso temporal de %consumo de sacarina ± DE en Línea base (LB), Adquisición (NEO), MLP y Extinción. C, D. Análisis inmunohistoquímico (α-Arc, 1:1000) expresión de proteína Arc en ratones B6129SF2/WT 5-6 meses por efecto del condicionamiento aversivo al sabor en Memoria a Largo Plazo (MLP), en la tercera extinción (EXT) y control sin conducta en C. Corteza insular (CI), D. Amígdala (AMY) I. imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia II. Imágenes representativas de máscaras realizadas mediante Image J para cuantificación. Análisis estadístico muestra los datos de la Media de % Área ± DE, n=5 (control), n=5 (conducta), comparación por t-no pareada *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001, ****: p < 0.0001. Barra de escala 100 μm (20x)

Efecto de la administración de los inhibidores de las desacetilasas de histona en el envejecimiento

La transcripción *de novo* Arc esta regulada por las regiones como los elementos de respuesta a suero (SRE) el cual favorece la transcripción, donde los HDAC actuando como inhibidores de la transcripción mediante la unión en la región SRE (Fukuchi et al., 2015b). Como se ha observado en experimentos recientes donde no hay inducción de la LTP después de una estimulación de alta frecuencia (HFS) en la amígdala y registrando en la CI en ratones de 16 meses, y donde la inducción de la LTP se recupera con la administración intracerebral de iHDAC (MS-275 en DMSO 28%, 0.5 μ L, 0.86 mM) en CI después de la estimulación con HFS en ratones de 16 meses (Moreno-Catilla, 2016). Con base a estos resultado se puede establecer una relación entre los iHDAC y un mejoramiento en la inducción de la LTP relacionada con la formación de la memoria, sin embargo no se conoce el mecanismo por el cual estos iHDAC favorecen la inducción de la LTP, por lo cual con el antecedente donde el gen de Arc contiene un sitio regulable por HDAC (Korb et al., 2013), proponemos que Arc podría ser uno de los protagonistas en este proceso donde se recura la inducción de la LTP. Para determinar el efecto que tiene la administración de HDAC en una primera etapa se realizó la administración de MS-275 (HDAC de clase I) en condiciones basales en el envejecimiento, posteriormente se realizó la evaluación del efecto de la administración de MS-275 en el paradigma conductual de CAS y su efecto en los niveles del mARN de Arc.

Efecto de iHDAC clase I (MS-275) en expresión basal de Arc

Se realizó administración intracerebral de iHDAC (MS-275 en DMSO 28%, 0.5 μ L, 0.86 mM) en corteza motora (AP:+1.1mm, ML: \pm 1.0mm y DV: -1.75mm), en hipocampo CA3 (AP:-2.2mm, ML:-2.2 mm \pm 2.75, DV: -2.5mm) en ratones de 17 meses de edad, siendo el pico máximo de expresión de proteína Arc a las 1.5 horas con base en lo reportado en la literatura (Morin et al., 2015)(Morín, Cerón-Solano, et al., 2016) con base en este dato se realizó sacrificio a las 1.5 h después de administración de MS-275 (Figura 16 A). Se realizó inmunohistoquímica de fluorescencia α -Arc (1:1000), y mediante análisis estadístico t- no pareada en corteza motora e hipocampo CA3 (Figura 16 C,D) no se observan diferencias significativas en la expresión de la proteína Arc comparado con el grupo control que se administró con SSI (Figura 16 B). Se midió los niveles del transcripto de Arc se realizó un PCR en tiempo real (RT-PCR), se administró MS-275 en CI realizando el sacrificio 37 minutos después de la administración intracerebral (Figura 16 F), observando que no hay un aumento en la cantidad del mARN de Arc por la administración de MS-275 (Figura 16 F). Debido a que la metodología utilizada para medir la expresión de la proteína Arc mediante inmunohistoquímica no permite detectar la expresión *de novo* Arc, y con base a lo observado donde la expresión de Arc basal en viejos esta aumentada, es posible que

el efecto de la expresión *de novo* Arc no logre ser cuantificado mediante esta metodología, además de que se ha observado que el aumento de la expresión del mRNA y proteína de Arc esta relacionada la presencia de un estímulo de memoria, por lo cual una administración de iHDAC en ausencia de estímulo no tiene efecto como lo observado .

EXPRESIÓN PROTEÍNA ARC

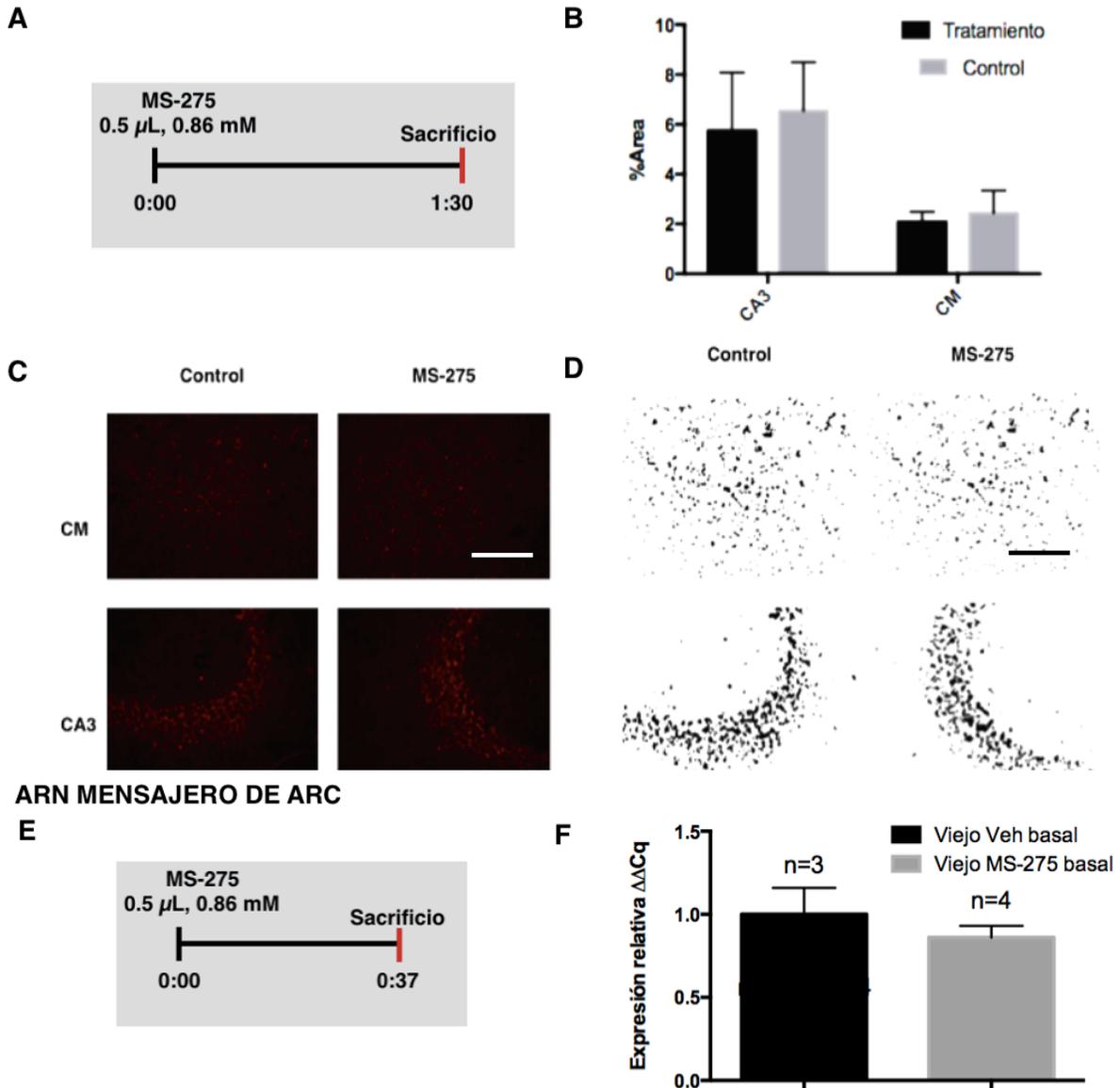


Figura 16. Expresión de Arc por efecto de administración de iHDAC. A Diagrama de administración de iHDAC (MS-275, 0.5 μ L, 0.86 mM) para observar expresión de la proteína Arc en ratones B6129SF2/WT de 17 meses. B. Análisis estadístico muestra los datos de la Media de % Área \pm DE en corteza motora (CM) e hipocampo CA3 (CA3), n=5 (control), n=3 (MS-275), estadístico t-no pareado ns=no significativa. Barra de escala 100 μ m (20x), C,D. Imágenes representativas de ratones administrados con MS-275 y grupo control SSI en corteza motora CM e hipocampo CA3, C. Inmunofluorescencia (α -Arc, 1:1000) D Imágenes

representativas de máscara realizadas en Image J.D Diagrama de administración de MS-275 para observar los niveles de mRNA de Arc F. Nivel de transcritos en ratones B6129SF2/WT en ratones de 17 meses administrados con MS-275 comparado con ratones de 17 meses administrados con SSI, mediante RT-PCR en corteza insular, no hay diferencia significativa entre los grupos mediante cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalización con gen endógeno GAPDH, viejos MS-275 n=4 y viejos SSI n=3 comparación de grupos mediante t-no pareada.

Efecto de iHDAC en Condicionamiento Aversivo al Sabor

Para determinar si la administración de iHDAC clase I (MS-275) tiene efecto positivo sobre memoria de reconocimiento en CAS, se realizó administración de MS-275 (DMSO 28% ,0.5 μ L, 0.86 mM) o solución salina isotónica (SSI) en corteza insular (AP:+1.1mm ,ML: \pm 3.3mm y DV: -3.7mm), 1.5 horas antes de la presentación del estímulo condicionado (sacarina 0.3%), en ratones jóvenes de 3-4 meses y en ratones viejos 15-17 meses que previamente fueron adecuados a consumo durante 20 minutos al día con privación de agua, el día de la adquisición se realizó 1.5 hora después de la administración de MS-275, presentado sacarina (0.3%) durante 20 minutos, después de 10 minutos finalizado el consumo se administró vía intraperitoneal LiCl (0.4 M, 7.5 mL/Kg), al día siguiente se realizó la prueba de MLP, colocando 2 bebederos uno con agua y otro con sacarina 0.3% durante 20 minutos, los días posteriores se realizó la extinción del aprendizaje, colocando 2 bebederos uno con agua y otro con sacarina (0.3%) durante 20 minutos, durante 3 días (Figura 17A).

Se observa un efecto positivo en la MLP debido a la administración de iHDAC (MS-275,0.5 μ L, 0.86 mM) en ratones viejos comparado con aquellos que fueron administrados con el vehículo SSI, observando una extinción de la memoria más lenta en el grupo administrado con iHDAC (Figura 17E), lo cual indica una memoria aversiva más fuerte. Al realizar el análisis estadístico del efecto sobre la memoria a largo plazo y la extinción entre el grupo administrado con MS-275 comparado con el administrado con SSI en ratones viejos se obtuvieron los siguientes resultados MLP ($t_{(1,13)}=1.21$, $p=0.6515$), Extinción 1 ($t_{(1,13)}=2.64$, $p=0.1346$), Extinción 2 ($t_{(1,13)}=2.633$, $p=0.0446$), Extinción 3 ($t_{(1,13)}=2.961$, $p=0.0189$) (Figura 17E), con este resultado se tienen evidencia estadísticamente significativa de que la administración de iHDAC en el envejecimiento tiene efecto positivo en la formación de la memoria aversiva gustativa por CAS.

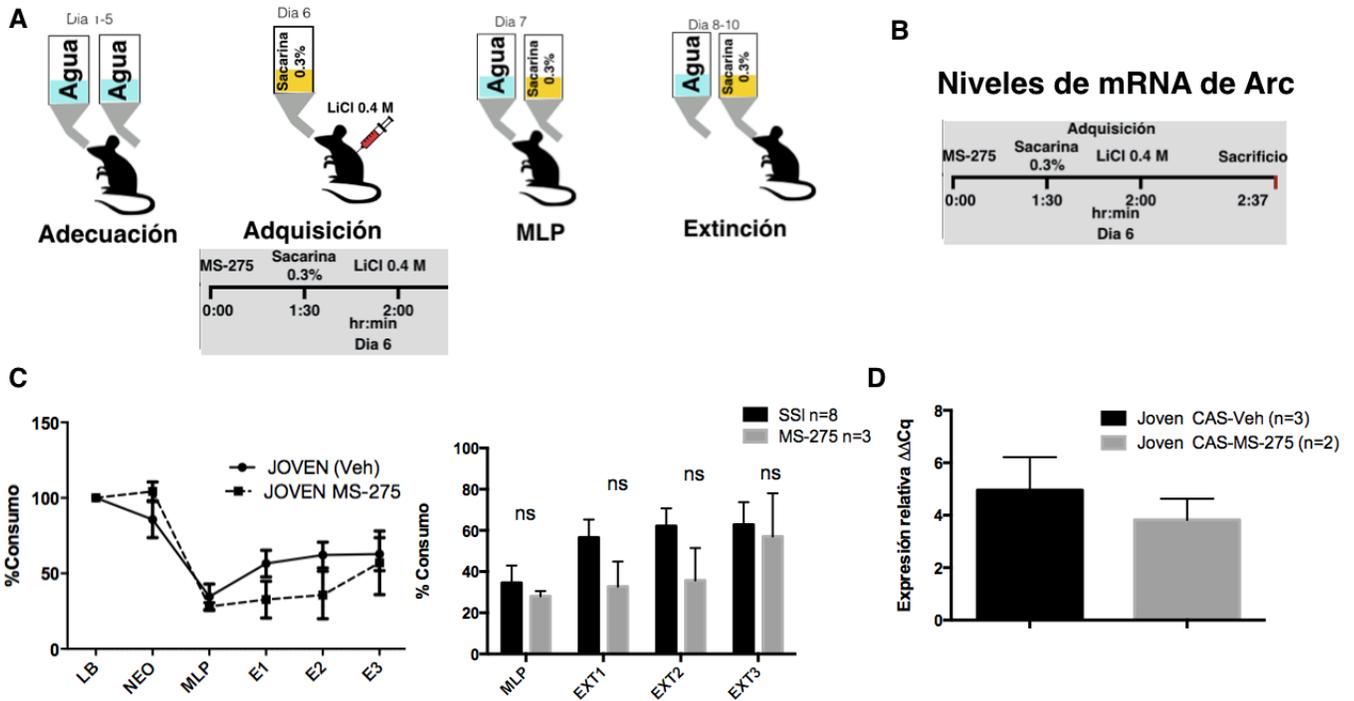
En el grupo de ratones jóvenes administrados con iHDAC no se observa un efecto en la memoria aversiva en ninguna de las etapas del paradigma de CAS comparado con el grupo de ratones jóvenes administrados con SSI (Figura 17C) obteniendo los siguientes datos estadísticos MLP ($t_{(1,10)}=0.369$, $p=0.993$), Extinción 1 ($t_{(1,10)}=1.356$, $p=0.555$), Extinción 2 ($t_{(1,10)}=1.505$, $p=0.455$), Extinción 3 ($t_{(1,10)}=0.327$, $p=0.9958$) (Figura 17 C), con base a estos resultados podemos decir que la administración de

HDAC no tiene efecto en la memoria aversiva gustativa por CAS en jóvenes, comparado con los ratones viejos donde hay un mejoramiento de la memoria.

Sin embargo no sabemos el mecanismo por el cual está actuando el mejoramiento en el desempeño de la memoria, para comprobar si el mARN está implicado en este mecanismo, se realizó la cuantificación del mARN por efecto de CAS y por la administración del iHDAC, se realizó el protocolo de CAS mediante una etapa de adecuación y el día de la adquisición de la memoria se realizó la administración de iHDAC (MS-275, 0.5 μ L, 0.86 mM) en corteza insular 1.5 h antes de la presentación de la sacarina 0.3%, posteriormente se realizó la adquisición de la memoria mediante la exposición de bebedero de sacarina 0.3% por 20 minutos y 10 minutos después se administró LiCl (0.4M, 7.5 mL/Kg), después de 37 minutos se procedió a realizar el sacrificio por dislocación y la extracción de la corteza insular (Figura 17B). Se realizó tratamiento de los tejidos para realizar RT-PCR evaluando la expresión relativa de mARN de Arc, donde es posible observar un aumento en la cantidad de mARN por efecto de la administración de iHDAC en el envejecimiento por la inducción de la memoria gustativa aversiva, observando que este aumento es estadísticamente significativo comparado con el grupo que se administró con SSI, CAS-VEH vs CAS-MS-275 ($t=7.014$, $p<0.0001$) (Figura 17 F), observando que los niveles de mARN no hay cambio en los grupos con administración basal de vehículo y MS-275 comparados con el grupo CAS-vehículo en viejos (Figura 17 F). En ratones jóvenes no se observa un aumento en la cantidad del mARN de Arc por efecto de la administración de iHDAC comparado con aquellos que fueron administrados con vehículo durante el protocolo de CAS, ratones jóvenes CAS-VEH vs CAS-MS-275 ($t=0.67$, $p<0.5146$), dicho resultado va acompañado con los datos conductuales donde no se observa un aumento cognitivo por la administración de iHDAC(Figura 17D)..

Con base a estos resultado se tiene un correlación entre la administración de iHDAC con un aumento en la cantidad mARN de Arc y su efecto positivo en la actividad conductual por CAS en el envejecimiento, que es consistente con lo observado en ratones jóvenes donde no hay un efecto en la actividad conductual pero de igual forma no hay aumento en la cantidad de mARN de Arc por efecto de la administración de iHDAC. Por lo tanto la administración de iHDAC favorece el aumento de mARN en el envejecimiento que en su estado basal se encuentra disminuido comparado con los ratones jóvenes, en consecuencia el efecto positivo observado quizás se debe a que hay una deficiencia probablemente causada por el aumento en la cantidad basal de proteína Arc y al ser administrado el iHDAC favorece el aumento de mARN a una cantidad parecida a los ratones jóvenes, sin embargo en los jóvenes ya no hay aumento de mARN por efecto de iHDAC, quizás por que llega a concentraciones saturantes o concentraciones que están reguladas por otros mecanismos.

Efecto del MS-275 en ratones jóvenes en CAS



Efecto de MS-275 en el envejecimiento en CAS

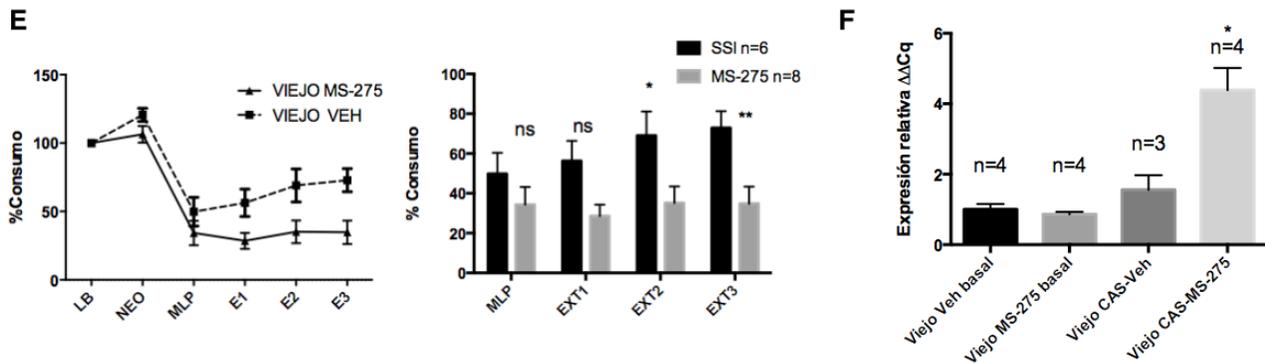


Figura 17. Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histona en la memoria por condicionamiento aversivo al sabor. A. Protocolo de CAS con modificación en la adquisición donde se administró 1.5 horas antes MS-275 (DMSO 28%, 0.5 μ L, 0.86 mM) o SSI (control) en corteza insular el resto del protocolo se continuo con normalidad. B Protocolo para extracción de muestras para RT-PCR, se realizó adecuación durante 5 días, el día de la adquisición de la memoria se administró intracerebral MS-275 o SSI en corteza insular 1.5 horas antes de la adquisición, posteriormente se presentó durante 20 minutos Sacarina al 0.3%, después de 10 minutos se administró LiCl intraperitoneal (0.4 M, 7.5 mL/Kg) y 37 minutos después se realizó sacrificio C, E. Curso temporal de % de consumo de sacarina en Adquisición (NEO), MLP y Extinción 1,2 y 3 (EXT) en ratones C. jóvenes 3-4 y E. viejos 15-17 meses, C, E Análisis estadístico del consumo de sacarina en % \pm DE en MLP y EXT 1, 2 y 3 en ratones C. jóvenes 3-4 meses n=8 (SSI) y n=3 (MS-275) y E. viejos de 15-17 meses n=8 (SSI) y n=8 (MS-275) 15-17 meses, D,F. Efecto de la administración de HDAC en corteza insular en la cantidad de mRNA mediante RT-PCR durante un protocolo de CAS, cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), normalización con gen endógeno GAPDH en D. ratones jóvenes F. Ratones viejos 15-17 meses, datos mostrados en expresión relativa de mRNA \pm DE

Oligomerización e interacción de la proteína Arc

Con los datos antes descritos podemos concluir que existe un aumento gradual en la cantidad de proteína basal de Arc debido al envejecimiento, afectando tareas conductuales como CAS y MWM, aumentando la capacidad de memoria de reconocimiento con la administración de iHDAC en el envejecimiento, encontramos una relación entre la administración de iHDAC y un aumento de mARN durante un paradigma de memoria gustativa aversiva de CAS la cual se ve favorecida en el envejecimiento, sin embargo el mecanismo por el cual se presenta este aumento en la cantidad de proteína Arc basal no se conoce, Myrum y colaboradores recientemente reportaron in-vitro que la proteína Arc puede interactuar formando dímeros u oligómeros (Myrum et al., 2015). Para observar si hay presencia de oligómeros de Arc en el envejecimiento se estableció un protocolo de corrimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (NATIVE-PAGE) y posteriormente un western blot, observando la presencia de Arc de 55 kDa en el envejecimiento y en jóvenes, sin embargo hay presencia de un bandeo en el inicio del gel, lo cual da un indicio que podría presentarse la interacción de Arc con diversas proteínas o su oligomerización de la proteína Arc (Figura 18), al realizar el análisis estadístico de Arc se observa una diferencia significativa entre los ratones viejos B6129SF2/WT (17 meses) y los jóvenes (3 meses), mediante la relación de Arc:GAPDH, en Corteza Insular ($t_{(1,3)}=3.978$, $p=0.0164$) (Figura 19 A), Corteza Motora ($t_{(1,3)}=3.531$, $p=0.0242$) (Figura 19B), en Hipocampo CA3 solo se observa una tendencia pero no hay diferencia estadísticamente significativa ($t_{(1,3)}=2.426$, $p=0.0723$) (Figura 19 C), lo cual es consistente con lo observado por SDS-PAGE en ratones jóvenes y viejos. Sin embargo se encuentra el antecedente de bandeo el cual pudiera ser la interacción de la proteína Arc con otras proteínas o su propia oligomerización.

Con los resultados obtenidos se tiene una evidencia más robusta, donde hay un aumento en la cantidad de la proteína basal de Arc en corteza insular, amígdala, corteza motora e hipocampo CA3 por efecto del envejecimiento, además durante el envejecimiento se ven afectadas la capacidad de memoria en paradigmas como CAS y MWM, donde la administración de iHDAC en corteza insular favorece la memoria de gustativa en el envejecimiento durante un protocolo de CAS mediante el aumento en la cantidad de mARN de Arc, siendo uno de los probables mecanismos por el cual actúan los iHDAC en la formación de la memoria, de igual forma proponemos que el aumento de la cantidad de la proteína Arc basal está regulando la disminución en el mARN de Arc y por lo tanto una deficiencia cognitiva, dicho aumento en la cantidad de proteína podría estar asociada a la formación de oligómeros o interacción de la proteína impidiendo su correcta degradación.

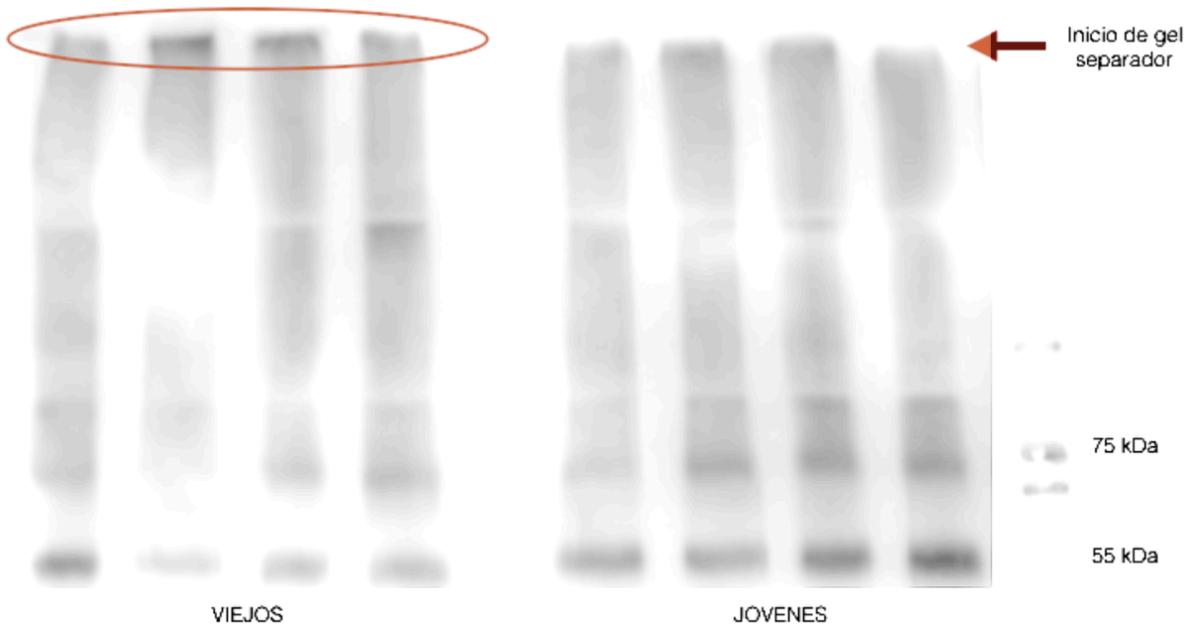


Figura 18. NATIVE-PAGE de Arc en el Hipocampo Imagen representativa de expresión de proteína Arc en hipocampo en ratones B6129SF2/WT jóvenes (2-3 meses) y ratones viejos (16-17 meses), por Western blot NATIVE-PAGE, presencia de Arc 55 kDa, imágenes representativa de bandeo correspondiente a Arc 55 kDa y bandeo al inicio de membrana (flecha), siendo posible la oligomerización de Arc en viejos (circulo).

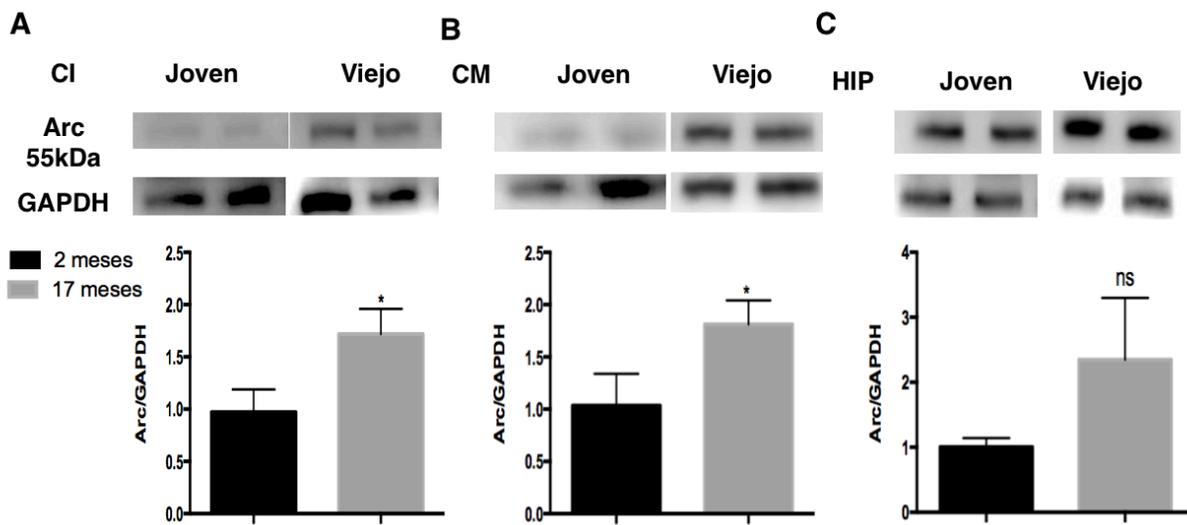


Figura 19. Expresión de la Proteína Arc por Western blot NATIVE-PAGE, expresión de proteína Arc en diversas estructuras cerebrales en ratones B6129SF2/WT A. Corteza insular(CI) B. Corteza motora (CM), C. Hipocampo (HIP), Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot con α -Arc, (1:2000), en ratones jóvenes (2-3 meses) y ratones viejos (16-17 meses). Imágenes representativa de bandeo correspondiente a Arc 55 kDa. Análisis estadístico muestra los datos de la media de Arc:GAPDH \pm DE, n=3 por grupo, análisis estadístico t-no pareada, *:p<0.05, ns: no significativo.

XI. DISCUSIÓN

Acumulación de proteína Arc en el envejecimiento

La proteína Arc es fundamental para la formación de la memoria (Guzowski et al., 2000) (Lyford et al., 1995), sin embargo en el envejecimiento observamos que hay un aumento en la cantidad de proteína basal en ratones B6129SF2/WT siendo el aumento progresivo con la edad, observamos un aumento gradual en la cantidad de la proteína Arc basal en diferentes grupos de ratones viejos en diferentes estructuras asociadas a la formación de la memoria como corteza insular, corteza motora, hipocampo CA3 y amígdala. El aumento en la expresión de la proteína Arc basal también se observa en ratones C57BL/6J envejecidos en las estructuras de corteza insular, corteza motora, hipocampo CA3 y amígdala siendo progresivo el aumento con la edad, el cual podría estar afectando la plasticidad sináptica y la memoria, como lo observado por Fletcher donde hay un aumento en la cantidad basal de proteína Arc en hipocampo CA1 en ratas de 24 meses comparado con ratas de 6 meses el cual correlaciona con una deficiencia en la memoria espacial en el MWM (Fletcher et al., 2014).

Mediante el análisis morfológico de la proteína Arc se detecta la presencia de la proteína Arc en el núcleo y en el citoplasma, donde la cantidad de la proteína Arc nuclear es mayor en ratones viejos C57BL/6J comparado con los ratones jóvenes en corteza insular, corteza motora, hipocampo CA3 y amígdala, observando que la proteína Arc presente en el citoplasma no presenta cambios entre ratones jóvenes y viejos, lo cual indica que la presencia de la proteína Arc nuclear podría estar implicada en la regulación de la formación de la memoria, como lo observado recientemente donde hay un aumento en la cantidad de la proteína Arc nuclear después de la inducción de la LTP por estimulación de HFS donde hay aumento en la expresión de receptores AMPA y una mayor expresión de la proteína Arc citoplasmática (Bloemer, VanDongen, & VanDongen, 2007, Bramham et al., 2010), sin embargo después de un periodo prolongado de estimulación la proteína Arc se traslada al núcleo regulando la expresión de receptores AMPA y reduciendo la transcripción de la subunidad GluA1, favoreciendo la internalización de receptores AMPA (O'Brien et al., 1998). La internalización de Arc en el núcleo promueve la interacción con el complejo de cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (PML-NB), este complejo regula la transcripción disminuyendo la transcripción de GluA1 y favoreciendo la internalización de receptores AMPA (Borden, 2002, Korb, Wilkinson, Delgado, Lovero, & Finkbeiner, 2013). Otro mecanismo por el cual podría estar actuando la proteína Arc es la interacción con endofilina 2 y dinamina 2 que promueven la internalización de receptores AMPA (Chowdhury et al., 2006). Estos datos sugieren que en el envejecimiento el aumento en la cantidad de la proteína Arc basal en el núcleo podría estar regulando la internalización de receptores AMPA, mediante la unión de PML-NB impidiendo la

inducción de la LTP en el envejecimiento como se ha observado recientemente donde en el envejecimiento hay problemas en la inducción de la LTP después de una estimulación de alta frecuencia en corteza insular (Moreno-Castilla, 2016).

La regulación del mRNA de Arc está implicada en la inducción de la LTP y la formación de la memoria, donde observa un aumento de mRNA de Arc después de la inducción favoreciendo la plasticidad sináptica (Lyford et al., 1995^a). Sin embargo hemos encontrado que hay una disminución en la cantidad de mRNA de Arc en el envejecimiento que podría estar implicado en los déficit en la memoria en el envejecimiento, lo cual es consistente con datos recientes donde la regulación de la transcripción de mRNA de Arc está directamente ligada a la presencia de un estado de LTP o LTD dependiendo si hay un aumento o reducción del mRNA de Arc respectivamente (Yilmaz-Rastoder et al., 2011), por lo tanto una disminución de mRNA de Arc estaría asociando al estado de LTD en el envejecimiento, estos resultados se complementan por lo observado por Fletcher y colaboradores donde observan una disminución en la cantidad de mRNA inducido por memoria espacial en hipocampo CA1 en el envejecimiento correlacionando con una disminución en la memoria espacial de MWM (Fletcher et al., 2014). Un mecanismo a destacar por la importancia que tiene en la regulación de la transcripción de mRNA de Arc es la metilación y desmetilación del ADN, que participan activamente en la regulación de la plasticidad sináptica mediante la regulación de la transcripción (Roth & Sweatt, 2009), donde recientemente se ha reportado que hay un aumento en la metilación del gen de Arc en regiones de Hipocampo CA1 y giro dentado ocasionando una disminución en la transcripción del mRNA de Arc, donde ratones viejos presentan una reducción de mRNA de Arc en comparación con jóvenes en regiones de hipocampo CA1 y giro dentado en condiciones basales (Penner et al., 2011), por lo tanto los cambios en la metilación del ADN de Arc en el envejecimiento modulan la transcripción de mRNA de Arc y procesos de memoria. La desregulación en la metilación del ADN contribuye a la presencia de diversas patologías como el retraso mental, la enfermedad de Alzheimer y trastornos neuropsiquiátricos (Gräff & Mansuy, 2008), por lo tanto resulta importante determinar los niveles de mRNA de Arc y la metilación del ADN de Arc en el envejecimiento como posibles marcadores sobre el efecto negativo en la memoria.

Un mecanismo que ayudaría a comprender el aumento observado en la cantidad de proteína basal de Arc en el envejecimiento es ubiquitinación, siendo el principal mecanismo de degradación de Arc, donde la ubiquitin ligasa E3 y la ubiquitina Triad3A son las principales ubiquitinas que participan en la degradación de Arc, donde la pérdida de expresión de Ube3a y Triad3A resulta en el aumento de la expresión de la proteína de Arc basal, sin embargo la sobre expresión de Ube3a y Triad3A resulta en la disminución de la cantidad de proteína Arc, (Kühnle, Mothes, Matentzoglou, & Scheffner, 2013, Mabb et al., 2014), sin embargo en el envejecimiento se ha observado

una disminución en la expresión de Ube3A en la corteza en humanos, afectando la degradación de proteína Arc (K. Williams et al., 2010). Esto tiene relación con lo encontrado por Fletcher y colaboradores en 2014, donde hay una disminución de la expresión de Ube3A en hipocampo CA1 en ratas relacionada con una disminución en la memoria espacial por MWM (Fletcher et al., 2014). El aumento en la cantidad de la proteína Arc debido a la disminución de la ubiquitina causa un aumento en la internalización de receptores AMPA, y por lo tanto la pérdida de receptores necesarios para la sinapsis (Chowdhury et al., 2006), esta desregulación en la Ube3a se ve reflejado en el síndrome de Angelman, en donde hay mutaciones del gen Ube3A inhibiendo la degradación de la proteína Arc por la ubiquitina, observando un aumento de la proteína Arc, este síndrome es caracterizado por la disfunción motora, retraso mental y autismo (C. A. Williams et al., 2006), el aumento en la cantidad de la proteína Arc en las neuronas es un marcador en este síndrome observando una disminución de receptores AMPA de tipo glutamatérgicos, atribuyendo el declive cognitivo al aumento de cantidad de proteína Arc (Greer et al., 2010), por lo tanto el aumento observado en la proteína basal de Arc y la disminución del mRNA en el envejecimiento podría estar implicada en el déficit cognitivo como se observa en el síndrome de Angelman y otras patologías como la enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down (Morin, Cerón-Solano, et al., 2016, Greer et al., 2010, Smith-Hicks, Cai, Savonenko, Reeves, & Worley, 2017).

El aumento en la cantidad de la proteína de Arc y la disminución del mRNA de Arc en el envejecimiento puede ser causada por diversos factores como ya se ha descrito, como la disminución de la degradación de proteína Arc por la disminución de la ubiquitina Ube3a y Triad3A, la regulación por la internalización de receptores AMPA mediante la presencia de la proteína Arc nuclear y la metilación del ADN de Arc reduciendo la transcripción de mRNA, observando un declive cognitivo en el envejecimiento. Por lo tanto la búsqueda de un mecanismo que ayude a comprender el declive cognitivo es de gran importancia para nuevos blanco para el tratamiento o para la detección temprana de enfermedades asociadas al envejecimiento por la importancia que tiene la proteína Arc para la inducción de la LTP (Yilmaz-Rastoder, Miyamae, Braun, & Thiels, 2011) la consolidación de la memoria, la expresión de diversos receptores (Korb, Wilkinson, Delgado, Lovero, & Finkbeiner, 2013), y la disminución de expresión de Ube3a en el envejecimiento (K. Williams, Irwin, Jones, & Murphy, 2010) podría tener un protagonismo como marcador para el envejecimiento cognitivo.

El envejecimiento causa disminución de memoria de reconocimiento

La expresión *de novo* Arc es indispensable para el mantenimiento y la consolidación de la memoria (Guzowski et al., 2000)(Bramham et al., 2008), Plath y colaboradores

observaron la importancia de Arc en la plasticidad sináptica y en el mantenimiento de la memoria en diversas tareas conductuales como MWM, CAS y reconocimiento de objeto, donde los ratones con ausencia del gen de Arc son incapaces de mantener y consolidar la memoria (Plath et al., 2006). La disminución en la capacidad de memoria en diferentes tareas conductuales es una constante en el envejecimiento, como los resultados obtenidos donde hay una disminución en la memoria de reconocimiento por CAS y en la memoria espacial por MWM en el envejecimiento, disminuyendo la capacidad de memoria a largo plazo comparado con ratones jóvenes. Observamos que la expresión de la proteína Arc esta presente durante una prueba de CAS, donde hay aumento de la cantidad de proteína Arc durante la prueba de MLP y la extinción de la memoria. Esta disminución en la capacidad de memoria de reconocimiento en el envejecimiento correlaciona con el aumento de la expresión basal de Arc, la sobreexpresión de Arc presente en el núcleo y la disminución del mARN de Arc.

Se ha observado que la administración de iHDAC clase I favorece la inducción de la LTP en ratones de 17 meses de edad, los cuales presentan deficiencia en la inducción de la LTP después de una estimulación de HFS (Moreno-Castilla, 2016), esto es consistente con los resultados obtenidos donde la administración iHDAC en ratones de 17 meses tienen un aumento en la memoria de reconocimiento por CAS, observando que la extinción de la memoria es más lenta comparado con aquellos que no fueron administrados con iHDAC, sin embargo en los ratones jóvenes no se observa un efecto positivo por la administración de los iHDAC, al realizar la medición de los niveles de mARN después de la inducción de la memoria de reconocimiento por efecto conductual de CAS se observa que hay un aumento del mARN de Arc por efecto de la administración de iHDAC en el envejecimiento, teniendo una correlación entre el aumento del mARN de Arc y el aumento en la memoria de reconocimiento, además observamos un efecto consistente en ratones jóvenes donde no hay aumento en la cantidad de mARN de Arc durante la inducción de la memoria de reconocimiento en el CAS por administración de iHDAC, pero tampoco tiene efecto sobre la memoria de reconocimiento.

Con base en los resultados obtenidos donde hay un aumento de la cantidad basal de Arc y disminución del mARN de Arc, y un efecto positivo en la memoria de reconocimiento por la administración de iHDAC, proponemos que la regulación del mARN y proteína de Arc es uno de los protagonistas de las deficiencias en la memoria en el envejecimiento, siendo consistente con lo observado en modelos in-vitro donde los iHDAC clase I regulan positivamente la transcripción de Arc, mediante un sitio de unión al promotor del gen de Arc en un elemento respuesta al suero (SER) regulando negativamente la transcripción de Arc (Hara et al., 2009), se ha observado que los iHDAC incrementan la transcripción de Arc principalmente los de clase I y II como SAHA y MS-275. La interacción de la proteína Arc con HAT Tip60 que es un complejo

multimérico nuclear esta involucrado en la acetilación de la histona H4K12Ac (Doyon, Selleck, Lane, Tan, & Côté, 2004) induciendo modificaciones en la cromatina favoreciendo la transcripción (Wee et al., 2014), sin embargo en el envejecimiento se ha observado un aumento en la metilación de las histonas H4K20me3 y H3K9me3 asociado a una disminución de la transcripción de los genes, la metilación impide la unión de Tip60 en el gen, por lo tanto la regulación de la transcripción del gen de Arc podría estar asociado a una disminución en la memoria en el envejecimiento, el cual se logra tener una correlación mediante la modulación por iHDAC.

Acumulación de la proteína por posible oligomerización

Logramos identificar que la expresión de la proteína Arc se encuentra aumentada en el envejecimiento, sin embargo se observa la presencia de la proteína aparentemente agregada u oligomerizada en regiones de hipocampo CA3 y corteza insular en ratones de 17 meses en condiciones basales. Con los resultados obtenidos no es claro el tipo de interacción que se presenta o por qué se acumula, no obstante en condiciones in-vitro se ha determinado que la proteína Arc contiene dos dominios de estructura helicoidal donde el dominio N-terminal que tiene la capacidad de interactuar con diversos poli aniones, se ha observado una similitud en la secuencia con la proteína Marlin-1 que interactúa con los microtúbulos implicados en el tráfico de proteínas en las dendritas, esta similitud causa una interacción Arc-microtúbulos (Vidal et al., 2007). Recientemente en condiciones in-vitro se ha determinado que un incremento en la concentración de NaCl en el medio favorece la agregación de Arc, mediante la interacción del dominio C-terminal, el cual contiene motivos homólogos a la espectrosina α , dichos motivos son conocidos como motivos estructurales para formar dímeros y oligómeros (Nicolas, Delalande, Hubert, & Le Rumeur, 2014), por lo tanto la interacción de los dominios C-terminal podrían estar causando la oligomerización (Myrum et al., 2015). Las múltiples interacciones que presenta la proteína Arc regulan la formación de la memoria, sin embargo en el envejecimiento hay un aumento en la cantidad de proteína basal y una disminución en el mRNA de Arc que correlaciona con una disminución en la memoria de reconocimiento, que al favorecer la transcripción de Arc por administración iHDAC se observa que hay un aumento en el mRNA que correlaciona con un aumento en memoria de reconocimiento en el envejecimiento.

XII. CONCLUSIONES

El presente trabajo permite concluir que hay un aumento en la expresión basal de la proteína Arc debido al envejecimiento en corteza insular, corteza motora, amígdala e hipocampo CA3 estructuras importante en la formación de la memoria, también se observó una disminución en la capacidad cognitiva en el envejecimiento en los paradigmas de memoria de reconocimiento por CAS y memoria espacial en MWM. Logramos distinguir que el aumento en la cantidad de la proteína Arc esta localizada principalmente en el núcleo y que existe una disminución de mARN de Arc en el envejecimiento, la cual podría explicar la disminución cognitiva observada en el envejecimiento.

El segundo punto a concluir es el efecto de los iHDAC durante una tarea de memoria de reconocimiento por paradigma de CAS, donde se observa que en ratones envejecidos presentan un aumento en la capacidad cognitiva por administración de iHDAC en corteza insular, la cual correlaciona con un aumento en la cantidad de mARN de Arc en el envejecimiento.

El tercer punto a destacar es la interacción de la proteína Arc con diversas proteínas o su propia oligomerización o dimerización, siendo estos los posibles causantes de la acumulación de proteína Arc en el envejecimiento.

XIII. PERSPECTIVAS

El presente proyecto no permite comprender el verdadero efecto de la acumulación y el efecto que tiene los IHDAC en la memoria de reconocimiento, sin embargo se obtiene una relación entre la cantidad de mRNA, proteína de Arc y la capacidad cognitiva por efecto de la administración de iHDAC. Las perspectivas del proyecto pretenden responder más a fondo las siguientes interrogantes:

-Buscar un posible mecanismo por el cual se esta acumulando la proteína Arc.

-La acumulación de Arc en envejecimiento, ¿Está regulando la disminución de la memoria de reconocimiento?, determinando el efecto que tiene la importación de Arc en el núcleo y su efecto en tareas de memoria.

-Comprobar que la proteína Arc es la causante de un aumento de la capacidad cognitiva por efecto de lo iHDAC en el envejecimiento.

XIV. REFERENCIAS

- Andrews-Hanna, J. R., Snyder, A. Z., Vincent, J. L., Lustig, C., Head, D., Raichle, M. E., & Buckner, R. L. (2007). Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron*, 56(5), 924–935. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.038>
- Béique, J.-C., Na, Y., Kuhl, D., Worley, P. F., & Huganir, R. L. (2011). Arc-dependent synapse-specific homeostatic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 816–821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017914108>
- Belevov, K., Elkobi, A., Kaphzan, H., Nairn, A. C., & Rosenblum, K. (2005). A molecular switch for translational control in taste memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 22(10), 2560–2568. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04428.x>
- Bernstein, I. L. (1999). Taste aversion learning: a contemporary perspective. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 15(3), 229–234.
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529–535. <https://doi.org/10.1038/nature08983>
- Blagosklonny, M. V. (2008). Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(21), 3344–3354. <https://doi.org/10.4161/cc.7.21.6965>
- Bloomer, W. A. C., VanDongen, H. M. A., & VanDongen, A. M. J. (2007). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Research*, 1153, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.079>
- Bloomer, W. A. C., VanDongen, H. M. A., & VanDongen, A. M. J. (2008). Arc/Arg3.1 translation is controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 582–592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702451200>
- Borden, K. L. B. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5259–5269.
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 47–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646>
- Bramham, C. R., Alme, M. N., Bittins, M., Kuipers, S. D., Nair, R. R., Pai, B., ... Wibrand, K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale*, 200(2), 125–140. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1959-2>
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J., & Guzowski, J. F. (2008). The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), 11760–11767. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008>
- Bures, Jan, Bermúdez-Rattoni, Federico, & Yamamoto, Takashi. (1998). Conditioned Taste Aversion. In *Memory of a Special Kind*. Oxford University Press.

- Bürkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 23(9), 795–806. <https://doi.org/10.1002/bies.1115>
- Calderwood, S. K., Murshid, A., & Prince, T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology*, 55(5), 550–558. <https://doi.org/10.1159/000225957>
- Chambers, K. C. (1990). A Neural Model for Conditioned Taste Aversions. *Annual Review of Neuroscience*, 13(1), 373–385. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.13.030190.002105>
- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., ... Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52(3), 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>
- Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R., & Vaupel, J. W. (2009). Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet*, 374(9696), 1196–1208. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61460-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61460-4)
- Cohen, J. E. (2003). Human population: the next half century. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5648), 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.1088665>
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., & Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*, 340(6233), 474–476. <https://doi.org/10.1038/340474a0>
- de Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 737–749. <https://doi.org/10.1042/BJ20021321>
- Diering, G. H., Gustina, A. S., & Hugarir, R. L. (2014). PKA-GluA1 Coupling via AKAP5 Controls AMPA Receptor Phosphorylation and Cell-Surface Targeting during Bidirectional Homeostatic Plasticity. *Neuron*, 84(4), 790–805. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.024>
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., & Côté, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5), 1884–1896.
- Farris, S., Lewandowski, G., Cox, C. D., & Steward, O. (2014). Selective Localization of Arc mRNA in Dendrites Involves Activity- and Translation-Dependent mRNA Degradation. *The Journal of Neuroscience*, 34(13), 4481–4493. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4944-13.2014>
- Fletcher, B. R., Hill, G. S., Long, J. M., Gallagher, M., Shapiro, M. L., & Rapp, P. R. (2014). A fine balance: Regulation of hippocampal Arc/Arg3.1 transcription, translation and degradation in a rat model of normal cognitive aging. *Neurobiology of Learning and Memory*, 115, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.007>
- Fosnaugh, J. S., Bhat, R. V., Yamagata, K., Worley, P. F., & Baraban, J. M. (1995). Activation of arc, a putative “effector” immediate early gene, by cocaine in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 64(5), 2377–2380.
- Foy, MR, & Foy, JG. (2009). Conditioned Taste Aversion, 35–41.

- Fukuchi, M., Nakashima, F., Tabuchi, A., Shimotori, M., Tatsumi, S., Okuno, H., ... Tsuda, M. (2015a). Class I Histone Deacetylase-mediated Repression of the Proximal Promoter of the Activity-regulated Cytoskeleton-associated Protein Gene Regulates Its Response to Brain-derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 6825–6836. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617258>
- Fukuchi, M., Nakashima, F., Tabuchi, A., Shimotori, M., Tatsumi, S., Okuno, H., ... Tsuda, M. (2015b). Class I histone deacetylase-mediated repression of the proximal promoter of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein gene regulates its response to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 6825–6836. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617258>
- Garcia, J., Hankins, W. G., & Rusiniak, K. W. (1974). Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science (New York, N.Y.)*, 185(4154), 824–831.
- Giorgi, C., Yeo, G. W., Stone, M. E., Katz, D. B., Burge, C., Turrigiano, G., & Moore, M. J. (2007). The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell*, 130(1), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.028>
- Gräff, J., & Mansuy, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research*, 192(1), 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.021>
- Greer, P. L., Hanayama, R., Bloodgood, B. L., Mardinly, A. R., Lipton, D. M., Flavell, S. W., ... Greenberg, M. E. (2010). The Angelman Syndrome-associated ubiquitin ligase Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating Arc. *Cell*, 140(5), 704–716. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.026>
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 3993–4001.
- Haberland, M., Montgomery, R. L., & Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 32–42. <https://doi.org/10.1038/nrg2485>
- Hara, D., Fukuchi, M., Miyashita, T., Tabuchi, A., Takasaki, I., Naruse, Y., ... Tsuda, M. (2009). Remote control of activity-dependent BDNF gene promoter-I transcription mediated by REST/NRSF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(4), 506–511. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.007>
- Hasher L, & Zacks RT. (1979). Automatic and effortful processes in memory, 108(3), 356–88.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A., & Evans, D. A. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*, 60(8), 1119–1122. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.8.1119>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England*

Journal of Medicine, 361(15), 1475–1485.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>

- Ichikawa, H., Fujimoto, T., Taira, E., & Miki, N. (2003). The accumulation of arc (an immediate early gene) mRNA by the inhibition of protein synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 91(3), 247–254.
- Jennings, J. M., & Jacoby, L. L. (1993). Automatic versus intentional uses of memory: aging, attention, and control. *Psychology and Aging*, 8(2), 283–293.
- Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.022>
- Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., ... Bito, H. (2009). Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 316–321. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806518106>
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*, 120(4), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Kirkwood, T. B. L. (2008). A systematic look at an old problem. *Nature*, 451(7179), 644–647. <https://doi.org/10.1038/451644a>
- Korb, E., Wilkinson, C. L., Delgado, R. N., Lovero, K. L., & Finkbeiner, S. (2013). Arc in the nucleus regulates PML dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nature Neuroscience*, 16(7), 874–883. <https://doi.org/10.1038/nn.3429>
- Kühnle, S., Mothes, B., Matentzoglou, K., & Scheffner, M. (2013). Role of the ubiquitin ligase E6AP/UBE3A in controlling levels of the synaptic protein Arc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 8888–8893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302792110>
- Lanahan, A., & Worley, P. (1998). Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 70(1–2), 37–43. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3836>
- Lee, B.-H., Lee, M. J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., ... Finley, D. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, 467(7312), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature09299>
- Li, S. C., Lindenberger, U., & Sikström, S. (2001). Aging cognition: from neuromodulation to representation. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(11), 479–486.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5734–5738. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41771/>
- Liu, G., Rogers, J., Murphy, C. T., & Rongo, C. (2011). EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. *The EMBO Journal*, 30(15), 2990–3003. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.195>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., ... Worley, P. F. (1995a). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14(2), 433–445.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., ... Worley, P. F. (1995b). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14(2), 433–445.
- Mabb, A. M., Je, H. S., Wall, M. J., Robinson, C. G., Larsen, R. S., Qiang, Y., ... Ehlers, M. D. (2014). Triad3A regulates synaptic strength by ubiquitination of Arc. *Neuron*, 82(6), 1299–1316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.016>
- Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H. S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., ... Issa, J.-P. J. (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Research*, 20(3), 332–340. <https://doi.org/10.1101/gr.096826.109>
- Marengoni, A., Angleman, S., Melis, R., Mangialasche, F., Karp, A., Garmen, A., ... Fratiglioni, L. (2011). Aging with multimorbidity: a systematic review of the literature. *Ageing Research Reviews*, 10(4), 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.03.003>
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P. A., & Roeder, R. G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 11992–11996.
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631–639. <https://doi.org/10.1038/nature02621>
- McCauley, B. S., & Dang, W. (2014). Histone methylation and aging: lessons learned from model systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1839(12), 1454–1462. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.008>
- Messaoudi, E., Ying, S.-W., Kanhema, T., Croll, S. D., & Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(17), 7453–7461.
- Midkiff, E. E., & Bernstein, I. L. (1985). Targets of learned food aversions in humans. *Physiology & Behavior*, 34(5), 839–841.
- Misanin, J. R., Collins, M., Rushanan, S., Anderson, M. J., Goodhart, M., & Hinderliter, C. F. (2002). Aging facilitates long-trace taste-aversion conditioning in rats. *Physiology & Behavior*, 75(5), 759–764.
- Molero Chamizo, A. (2007). Aprendizaje aversivo gustativo: Características, paradigma y mecanismos cerebrales. *Anales de Psicología*, 23(1). Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=16723108>
- Molteni, R., Calabrese, F., Mancini, M., Racagni, G., & Riva, M. A. (2008). Basal and stress-induced modulation of activity-regulated cytoskeletal associated protein (Arc) in the rat brain following duloxetine treatment. *Psychopharmacology*, 201(2), 285–292. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1276-7>
- Morin, J.-P., Cerón-Solano, G., Velázquez-Campos, G., Pacheco-López, G.,

- Bermúdez-Rattoni, F., & Díaz-Cintra, S. (2016). Spatial Memory Impairment is Associated with Intraneural Amyloid- β Immunoreactivity and Dysfunctional Arc Expression in the Hippocampal-CA3 Region of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 51(1), 69–79. <https://doi.org/10.3233/JAD-150975>
- Morin, J.-P., Díaz-Cintra, S., Bermúdez-Rattoni, F., & Delint-Ramírez, I. (2016). Decreased levels of NMDA but not AMPA receptors in the lipid-raft fraction of 3xTg-AD model of Alzheimer's disease: Relation to Arc/Arg3.1 protein expression. *Neurochemistry International*, 100, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.09.013>
 - Morin, J.-P., Guzmán-Ramos, K., & Bermudez-Rattoni, F. (2015). New Insights on Retrieval-Induced and Ongoing Memory Consolidation: Lessons from Arc. *Neural Plasticity*, 2015, 184083. <https://doi.org/10.1155/2015/184083>
 - Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., ... Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315–329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
 - Myrum, C., Baumann, A., Bustad, H. J., Flydal, M. I., Mariaule, V., Alvira, S., ... Bramham, C. R. (2015). Arc is a flexible modular protein capable of reversible self-oligomerization. *Biochemical Journal*, 468(Pt 1), 145–158. <https://doi.org/10.1042/BJ20141446>
 - Nicolas, A., Delalande, O., Hubert, J.-F., & Le Rumeur, E. (2014). The spectrin family of proteins: a unique coiled-coil fold for various molecular surface properties. *Journal of Structural Biology*, 186(3), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.03.011>
 - Oberdoerffer, P., & Sinclair, D. A. (2007). The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 692–702. <https://doi.org/10.1038/nrm2238>
 - O'Brien, R. J., Kamboj, S., Ehlers, M. D., Rosen, K. R., Fischbach, G. D., & Huganir, R. L. (1998). Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron*, 21(5), 1067–1078.
 - Palmerino, C. C., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1980). Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science (New York, N.Y.)*, 208(4445), 753–755.
 - Pandey, S. C., Zhang, H., Ugale, R., Prakash, A., Xu, T., & Misra, K. (2008). Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(10), 2589–2600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4752-07.2008>
 - Park, D. C., & Reuter-Lorenz, P. (2009). The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annual Review of Psychology*, 60, 173–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093656>
 - Penner, M., Roth, T., Chawla, M., Hoang, L., Roth, E., Lubin, F., ... Barnes, C. (2011). Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 32(12), 2198–2210. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.009>

- Peserico, A., & Simone, C. (2010). Physical and Functional HAT/HDAC Interplay Regulates Protein Acetylation Balance. *BioMed Research International*, 2011, e371832. <https://doi.org/10.1155/2011/371832>
- Pintchovski, S. A., Peebles, C. L., Kim, H. J., Verdin, E., & Finkbeiner, S. (2009). The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate-early gene *Arc/Arg3.1* in neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(5), 1525–1537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5575-08.2009>
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., ... Kuhl, D. (2006). *Arc/Arg3.1* is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.024>
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 959–991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>
- Promislow, D. E. (1994). DNA repair and the evolution of longevity: a critical analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 170(3), 291–300. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1994.1190>
- Rao, V. R., Pintchovski, S. A., Chin, J., Peebles, C. L., Mitra, S., & Finkbeiner, S. (2006). AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene *Arc*. *Nature Neuroscience*, 9(7), 887–895. <https://doi.org/10.1038/nn1708>
- Revusky, S. H., & Bedarf, E. W. (1967). Association of illness with prior ingestion of novel foods. *Science (New York, N.Y.)*, 155(3759), 219–220.
- Richter, J. D., & Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433(7025), 477–480. <https://doi.org/10.1038/nature03205>
- Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2009). Regulation of chromatin structure in memory formation. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(3), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.011>
- Scalera, G. (2002). Effects of conditioned food aversions on nutritional behavior in humans. *Nutritional Neuroscience*, 5(3), 159–188. <https://doi.org/10.1080/10284150290013059>
- Siegmund, K. D., Connor, C. M., Campan, M., Long, T. I., Weisenberger, D. J., Binizskiewicz, D., ... Akbarian, S. (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PloS One*, 2(9), e895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000895>
- Smith-Hicks, C. L., Cai, P., Savonenko, A. V., Reeves, R. H., & Worley, P. F. (2017). Increased Sparsity of Hippocampal CA1 Neuronal Ensembles in a Mouse Model of Down Syndrome Assayed by *Arc* Expression. *Frontiers in Neural Circuits*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00006>
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., & Krämer, O. H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 185–198.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.027>

- Steves, C. J., Spector, T. D., & Jackson, S. H. D. (2012). Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age and Ageing*, 41(5), 581–586. <https://doi.org/10.1093/ageing/afs097>
- Steward, O., Farris, S., Pirbhoy, P. S., Darnell, J., & Driesche, S. J. V. (2015). Localization and local translation of Arc/Arg3.1 mRNA at synapses: some observations and paradoxes. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00101>
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., & Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21(4), 741–751.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Moreau, L. A., Whetstine, J. R., & Price, B. D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1376–1382. <https://doi.org/10.1038/ncb1982>
- Teber, I., Köhling, R., Speckmann, E.-J., Barnekow, A., & Kremerskothen, J. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor stimulation induces expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC). *Molecular Brain Research*, 121(1–2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.11.017>
- Tomaić, V., & Banks, L. (2015). Angelman syndrome-associated ubiquitin ligase UBE3A/E6AP mutants interfere with the proteolytic activity of the proteasome. *Cell Death & Disease*, 6(1), e1625. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.572>
- Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., ... Kasahara, M. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *The American Journal of Pathology*, 180(3), 963–972. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.012>
- Vasto, S., Scapagnini, G., Bulati, M., Candore, G., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., ... Caruso, C. (2010). Biomarkers of aging. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 2, 392–402.
- Vidal, R. L., Ramírez, O. A., Sandoval, L., Koenig-Robert, R., Härtel, S., & Couve, A. (2007). Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 35(3), 501–512. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.04.008>
- Vidali, G., Gershey, E. L., & Allfrey, V. G. (1968). Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *The Journal of Biological Chemistry*, 243(24), 6361–6366.
- Walker, G. A., & Lithgow, G. J. (2003). Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell*, 2(2), 131–139.
- Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., ... Kuhl, D. (2001). Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(15), 5484–5493.
- Wang, Y., Zheng, F., Zhou, X., Sun, Z., & Wang, H. (2009). Converging signal on

- ERK1/2 activity regulates group I mGluR-mediated Arc transcription. *Neuroscience Letters*, 460(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.023>
- Wee, C. L., Teo, S., Oey, N. E., Wright, G. D., VanDongen, H. M. A., & VanDongen, A. M. J. (2014). Nuclear Arc Interacts with the Histone Acetyltransferase Tip60 to Modify H4K12 Acetylation. *eNeuro*, 1(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0019-14.2014>
 - Williams, C. A., Beaudet, A. L., Clayton-Smith, J., Knoll, J. H., Kyllerman, M., Laan, L. A., ... Wagstaff, J. (2006). Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 140(5), 413–418. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31074>
 - Williams, K., Irwin, D. A., Jones, D. G., & Murphy, K. M. (2010). Dramatic Loss of Ube3A Expression during Aging of the Mammalian Cortex. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00018>
 - World Health Organization. (2015). World report on ageing and health. Switzerland. Retrieved from www.who.int
 - Wu, J., Petralia, R. S., Kurushima, H., Patel, H., Jung, M., Volk, L., ... Worley, P. F. (2011). Arc/Arg3.1 Regulates an Endosomal Pathway Essential for Activity-Dependent β -Amyloid Generation. *Cell*, 147(3), 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.036>
 - Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y., & Sakai, N. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioural Brain Research*, 65(2), 123–137.
 - Yilmaz-Rastoder, E., Miyamae, T., Braun, A. E., & Thiels, E. (2011). LTP- and LTD-inducing stimulations cause opposite changes in Arc/Arg3.1 mRNA level in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus*, 21(12), 1290–1301. <https://doi.org/10.1002/hipo.20838>
 - Zhang, C., & Cuervo, A. M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature Medicine*, 14(9), 959–965. <https://doi.org/10.1038/nm.1851>
 - Zhang, W., Wu, J., Ward, M. D., Yang, S., Chuang, Y.-A., Xiao, M., ... Worley, P. F. (2015). Structural Basis of Arc Binding to Synaptic Proteins: Implications for Cognitive Disease. *Neuron*, 86(2), 490–500. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.030>

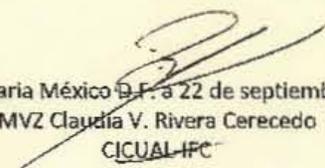
XV. ANEXO I



DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI
Investigador del Departamento de
Neurociencia Cognitiva
Presente.

Por este conducto me permito informar a Usted que su Protocolo Número **FBR30-14**,
"Alteraciones de los mecanismos de la memoria en la patología relacionada a la
enfermedad de Alzheimer" ha sido aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado
y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular con una vigencia al
mes de agosto de 2017.

Atentamente



Cd. Universitaria México D.F. a 22 de septiembre de 2014.
MVZ Claudia V. Rivera Cerecedo
CICUAL-IFC

c.c.p. archivo